

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Teste de Ames para avaliação do potencial mutagênico de plantas
medicinais e novas moléculas com atividades biológicas**

FABIANA GOMES DA SILVA DANTAS

**Dourados – MS
2019**

FABIANA GOMES DA SILVA DANTAS

**Teste de Ames para avaliação do potencial mutagênico de plantas
medicinais e novas moléculas com atividades biológicas**

Área do CNPq: Microbiologia Aplicada (2.12.02.00-1)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Doenças Crônicas e Infecto-Parasitárias

Orientador: Prof^a. Dr^a. Kelly Mari Pires de Oliveira

**Dourados – MS
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

D192t Dantas, Fabiana Gomes Da Silva

Teste de Ames para avaliação do potencial mutagênico de plantas medicinais e novas moléculas com atividades biológicas [recurso eletrônico] / Fabiana Gomes Da Silva Dantas. -- 2019.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Kelly Mari Pires de Oliveira.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Ensaio de Salmonella/microsoma. 2. Ensaio pré-clínicos. 3. Plantas medicinais. 4. Medicamentos. I. Oliveira, Kelly Mari Pires De. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO APRESENTADA PELA CANDIDATA FABIANA GOMES DA SILVA DANTAS, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "DOENÇAS CRÔNICAS E INFECTO - PARASITÁRIAS".

Ao décimo oitavo dia do mês de março do ano de dois mil e dezenove (18/03/2019), às 14h, em sessão pública, realizou-se, na Sala 103/05 do Bloco C da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal Grande Dourados, a Defesa de Tese de Doutorado intitulada "Teste de Ames para avaliação do potencial mutagênico de plantas medicinais e novas moléculas com atividades biológicas" apresentada pela doutoranda FABIANA GOMES DA SILVA DANTAS, do Programa de Pós-Graduação Doutorado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira (Presidente/orientador), Dra. Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi (membro titular/externo), Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo (membro titular/interno), Dra. Andréia Sangalli (membro titular/externo), Dr. Eduardo José de Arruda (membro titular/externo), Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski (membro suplente/externo) e Dr. Alessandro Minillo (membro suplente/externo). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer a candidata e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Tese. Após a candidata ter apresentado a sua Tese, no tempo previsto de 40 até 50 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa da candidata, no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido a candidata considerada **APROVADA**, fazendo *jus* ao título de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 18 de março de 2019.

Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira _____ *Kelly Pires*

Dra. Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi _____ *Melyssa*

Dr. Pablo Christiano Barboza Lollo _____ *Pablo*

Dra. Andréia Sangalli _____ *Sangalli*

Dr. Eduardo José de Arruda _____ *Eduardo*

ATA HOMOLOGADA EM: ___/___/___, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Lázaro e
Nair e ao meu esposo Márcio por todo
amor, apoio e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por me dar sabedoria para superar todas as dificuldades. Obrigada Pai por todas as bênçãos concedidas em minha vida e por sua infinita misericórdia.

Aos meus pais Lázaro Gomes da Silva e Nair Oliveira Gomes pelo amor incondicional, dedicação e palavras de incentivo. Obrigada por terem me guiado para que eu tornasse a pessoa que sou hoje.

Ao meu amado esposo Márcio Dantas de Souza, pelo companheirismo, paciência e dedicação. Foram muitos dias de trabalho nos quais nós choramos, sorrimos e agora juntos comemoramos a realização desse sonho.

Aos meus irmãos Fernando Gomes da Silva e Francielle Gomes da Silva Zanette pelo amor, companheirismo e amizade.

Ao meu sobrinho Guilherme Gomes da Silva Zanette por tornar meus dias mais felizes.

À minha orientadora Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira pela oportunidade de realizar esse sonho. Obrigada pela amizade, ensinamentos, palavras de ânimo, incentivo, pelo exemplo de profissionalismo e conselhos para a vida. Muito obrigada.

Às minhas amigas e parceiras de laboratório Adriana Araújo de Almeida-Apolonio e Renata Pires de Araújo pela imensurável ajuda ao longo dessa jornada. Dri, obrigada pelo exemplo de vida e por todos os ensinamentos e conselhos. Rê, obrigada por encarar comigo o desafio de padronizar o teste de Ames no nosso laboratório e pela parceira em todos os momentos. Vocês tornaram essa jornada mais leve, muito obrigada meninas.

À minha amiga e parceira laboratório Pâmella de Castilho Fukuda pela imensa ajuda na na construção do banco de dados do artigo de revisão sistemática.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Microbiologia Aplicada pela ajuda nos experimentos, momentos de descontração e alegria. Obrigada por me permitirem viver momentos tão especiais ao lado de vocês.

À minha querida prima/irmã Ana Paula de Oliveira que mesmo de longe sempre esteve presente me aconselhando e comemorando cada etapa desta jornada. Obrigada pela sua amizade e companheirismo.

Às minhas amigas e parceiras de vida Ana Beatriz Rigueti Zanardo, Lucimara de Araújo Ramos e Suéllen Machado de Paula pela amizade de longa data, pelos conselhos, incentivo e torcida.

Aos servidores da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais que sempre me apoiaram durante o doutorado. Em especial as minhas amigas Lívia, Luana, Mara, Suéllen e Renata que me deram todo suporte durante o período do meu afastamento. Muito obrigada, sem vocês eu não teria conseguido.

À Profa. Dra. Melyssa Negri e a Brenda Kischkel por sempre nos receber tão bem na Universidade Estadual de Maringá e por nos ensinar com paciência e dedicação os ensaios de citotoxicidade. Muito obrigada.

À Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski e Prof. Dr. Gleyson Antônio Casagrande pela parceria nos artigos, correções e ensinamentos.

À Profa. Dra. Alexeia Baruffati, Profa. Dra. Claudia Cardoso, Prof. Dr. Eduardo Arruda, e Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto pela realização dos trabalhos em parceria.

À Universidade Federal da Grande Dourados por me conceder afastamento das minhas atividades como servidora técnica de laboratório permitindo a realização do doutorado.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

Muito obrigada!

“Todas as coisas cooperam para o bem
daqueles que amam a DEUS”.

Romanos 8:28

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: Bateria de testes para avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de produtos farmacêuticos utilizados em humanos de acordo com a EMA (2008), FDA (2012), BRASIL (2013). 21

ARTIGO 1

Figura 1. Seleção dos artigos a partir da busca realizada nas bases bibliográficas utilizando os termos “*genotoxicity tests*” OR “*mutagenicity tests*” OR “*Ames test*” AND “*medicinal plants*” no período de 1975 a maio de 2018. 36

Figura 2. Banco de dados gerado a partir das buscas nas bases de dados eletrônicas, *Medline* (via *Pubmed*), *Science Direct*, *Scopus* e *Web of Science* no período de 1975 a maio de 2018 utilizando os termos “*genotoxicity tests*” OR “*mutagenicity tests*” OR “*Ames test*” AND “*medicinal plants*”. 37

Figura 3. Percentual de plantas avaliadas frente as linhagens de *S. Typhimurium* TA97a, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1537, TA1538, YG1024 e *E. coli* WP2 uvrA pelo teste de Ames. 48

Figura 4. Percentual de plantas com potencial mutagênico detectado pelas linhagens de *S. Typhimurium* TA97a, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1537 e TA1538. 48

Figura 5. Relação entre as seis espécies avaliadas frente a uma sequência de 5 linhagens e a frequência de plantas que tiveram o potencial mutagênico detectado por essas linhagens. 50

Figura 6: Frequência das plantas que apresentaram potencial mutagênico em função da utilização do sistema de metabolização exógena (fração S9). 52

ARTIGO 2

Figura 1 / Figure 1. Estruturas propostas para os complexos 1 e 2. / *Proposed structures for the complexes 1 and 2.* 109

- Figura 2 / Figure 2.** Espectros de absorção do complexo 1 e do ligante livre, 109
medidos a 298 K, utilizando a mesma concentração (1×10^5 M H₂O/DMSO
(95/05%). / *Absorption spectra of the complex 1 and free ligand measured at 298 K
using the same concentration (1×10^5 M H₂O/DMSO (95/05%).*
- Figura 3 / Figure 3.** Espectros de absorção do complexo 2 e do ligante livre, 110
medidos a 298 K, utilizando a mesma concentração (1×10^5 M H₂O/DMSO
(95/05%). / *Absorption spectra of the complex 2 and free ligand measured at 298 K
using the same concentration (1×10^5 M H₂O/DMSO (95/05%).*
- Figura 4 / Figure 4.** Efeito do complexo 1 [CuCl₂ (Bipy) (L1)] durante a formação 111
de biofilme e em biofilmes pré-formados de espécies de *Candida* * p <0.05; ** p
<0.01; *** p <0.001 (ANOVA). / *Effect of complex 1 [CuCl₂(Bipy)(L1)] during
biofilm formation and on preformed biofilms of Candida species. * p <0.05; ** p
<0.01; *** p <0.001 (ANOVA).*
- Esquema 1 / Scheme 1.** Rota de reação para a obtenção do complexo 1. / *Reaction 114
route for the obtention of the complex 1.*
- Figura S1 / Figure S1.** Espectro ESI-HRMS do complexo 1. / *ESI-HRMS spectrum 123
of the complex 1.*
- Figura S2 / Figure S2.** Espectro ESI-HRMS do complexo 2. / *ESI-HRMS spectrum 124
of the complex 2.*
- Figura S3 / Figure S3.** Cubetas contendo as soluções do complexo 1 (verde claro) 125
e ligante (incolor). Foto tirada durante o experimento. O complexo 2 e o respectivo
ligante apresentaram comportamento semelhante. / *Cuvettes containing the
solutions of the complex 1 (light green) and ligand (colorless). Picture taken during
the experiment. Complex 2 and respective ligand have been presented similar
behavior.*
- Figura S4 / Figure S4.** Espectros de absorção no UV-Vis do complexo 1 e 126
respectivo ligante medido a 298 K. Esta experiência foi realizada 36 h após a
preparação das soluções. / *UV-Vis absorption spectra of the complex 1 and
respective ligand measured at 298 K. This experiment was performed 36 h after
preparing the solutions.*
- Figura S5 / Figure S5.** Espectro de absorção UV-Vis do complexo 2 e respectivo 127
ligante medido a 298 K. Esta experiência foi realizada 36 h após a preparação das
soluções. / *UV-Vis absorption spectra of the complex 2 and respective ligand*

measured at 298 K. This experiment was performed 36 h after preparing the solutions.

Figura S6 / Figure S6. Sólido verde do complexo 1 obtido após filtração. / *Green solid of the Complex 1 obtained after filtration.* 128

Figura S7 / Figure S7. Sólido verde do complexo 2 obtido após filtração. / *Green solid of the Complex 2 obtained after filtration.* 128

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Características genéticas das linhagens de *Salmonella* Typhimurium mais utilizadas no teste de Ames. 26

ARTIGO 1

Tabela 1: Plantas que apresentaram potencial mutagênico pelo teste de Ames de acordo com a busca nas bases de dados eletrônicas utilizando os termos “*genotoxicity tests*” OR “*mutagenicity tests*” OR “*Ames test*” AND “*medicinal plants*” no período de 1975 a maio de 2018. 40

Tabela 1S: Plantas medicinais avaliadas pelo teste de Ames de acordo com as buscas nas bases de dados eletrônicas utilizando os termos “*genotoxicity tests*” OR “*mutagenicity tests*” OR “*Ames test*” AND “*medicinal plants*” no período de 1975 a maio de 2018. 63

ARTIGO 2

Tabela 1 / Table 1. Modos e frequências vibracionais de Bipyridina, ligantes L1 e L2 e complexos 1 e 2. / *Modes and vibrational frequencies of Bipyridine, ligands L1 and L2, and complexes 1 and 2.* 108

Tabela 2 / Table 2. Atividade anti-*Candida* do complexo 1 [CuCl₂ (Bipy) (L1)] em células planctônicas por microdiluição em caldo (µg/mL). / *Anti-Candida activity of the complex 1 [CuCl₂(Bipy)(L1)] in planktonic cells by microdilution in broth technique (µg/mL).* 111

Tabela 3 / Table 3. Atividade mutagênica expressa pela média de revertentes/placa e índice de mutagenicidade (IM) do complexo 1 [CuCl₂(Bipy)(L1)] das linhagens de *S. Typhimurium* TA98 e TA100 na presença (+ S9) e ausência (- S9) de ativação metabólica. / *Mutagenic activity expressed by the mean of revertant/plate index of mutagenicity (IM) of complex 1 [CuCl₂(Bipy)(L1)] in the TA98 and TA100 strains of S. Typhimurium in the presence (+ S9) and absence (- S9) of activation metabolic.* 112

Tabela S1 / Table S1. Atividade anti-*Candida* do complexo 2 [CuCl₂Bipy (L2)], 121
ligantes livres (2-tiouracil e 6-metil-2-tiouracil) e cloreto de cobre (II) em células
planctônicas por microdiluição em caldo (µg / mL). / *Anti-Candida activity of the
complex 2 [CuCl₂Bipy(L2)], free ligands (2-thiouracil and 6-methyl-2-thiouracil)
and cooper(II) chloride in planktonic cells by microdilution in broth technique
(µg/mL).*

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AmB	Anfotericina B / <i>Anfotericin B</i>
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária / <i>National Health Surveillance Agency</i>
UFC / CFU	Unidade formadora de colônia / <i>Colony forming units</i>
CLSI	Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais / <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido / <i>Dimethyl sulfoxide</i>
EMA	Agência Europeia de Medicamentos / <i>European Medicines Agency</i>
EROs / ROS	Espécies reativas de oxigênio / <i>Oxygen-reactive species</i>
FCL	Fluconazol / <i>Fluconazole</i>
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos / <i>Food and Drug Administration</i>
ICH	Conferência Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano / <i>International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical Products for Human Use</i>
LPS	Lipopolissacarídeo / <i>Lipopolysaccharide</i>
CFM / MFC	Concentração fungicida mínima / <i>Minimum fungicidal concentration</i>
CIM / MIC	Concentração inibitória mínima / <i>Minimum inhibitory concentration</i>
NADP	β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato / <i>β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NPD	4-nitro-o-fenilenediamino / <i>4-nitro-o-phenylenediamine</i>
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico ou Económico / <i>Organization for Economic and Economic Cooperation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde / <i>World Health Organization</i>
PMDA	Agência de Produtos Farmacêuticos e Dispositivos Médicos / <i>Pharmaceuticals and Medical Devices Agency</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada / <i>Resolution of the collegiate board of directors</i>

SDA	Agar Sabouraud Dextrose / <i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
2-ANTR	2-aminoantraceno / <i>2-aminoanthracene</i>
Δ	Indica deleção do gene / <i>Indicates gene deletion</i>

Teste de Ames para avaliação do potencial mutagênico de plantas medicinais e novas moléculas com atividades biológicas

RESUMO

O teste de Ames faz parte da bateria de ensaios pré-clínicos utilizados na avaliação do potencial mutagênico de novos fármacos e fitoterápicos. Esse ensaio detecta compostos capazes de provocar mutações gênicas do tipo substituição de pares de bases e deslocamento do quadro de leitura por meio de linhagens de *Salmonella* Typhimurium. Nesse sentido, o presente estudo objetivou avaliar as aplicações do teste de Ames no estudo do potencial mutagênico de plantas medicinais e novas moléculas com atividades biológicas. No primeiro artigo foi realizado um levantamento das plantas medicinais estudadas pelo teste de Ames a partir da pesquisa bibliográfica nas bases de dados eletrônicas, *Medline* (via Pubmed), *Science Direct*, *Scopus* e *Web of Science*, no período de 1975 a maio de 2018, utilizando os seguintes termos: “*genotoxicity tests*” OR “*mutagenicity tests*” OR “*Ames test*” AND “*medicinal plants*”. A pesquisa resultou na seleção de 293 artigos, os quais analisaram 695 plantas medicinais, sendo que dessas 14 % (98/695) apresentaram potencial mutagênico. Das 597 espécies que não apresentaram potencial mutagênico, 32 % (195/597) apresentaram atividade antimutagênica. Além de evidenciar um número expressivo de espécies com potencial mutagênico, a análise do banco de dados também demonstrou que muitos estudos não são realizados de acordo com as diretrizes recomendadas para a realização do teste, sendo assim, os resultados apontados não garantem a segurança quanto ao potencial mutagênico das espécies estudadas. No segundo artigo, dois novos complexos de cobre(II) foram sintetizados e testados quanto o seu potencial antifúngico, frente a 21 isolados de espécies de *Candida* e quanto o seu potencial mutagênico pelo teste de Ames utilizando as linhagens de *Salmonella* Typhimurium TA98 e TA100. O complexo 1, Cu(bipy)Cl₂(tiouracila), apresentou atividade antifúngica frente a todos os isolados testados e não apresentou potencial mutagênico, por isso pode ser proposto na terapia anti-*Candida*. Diante dos resultados encontrados em ambos estudos é possível concluir que o teste de Ames é uma ferramenta promissora na detecção do potencial mutagênico durante as etapas de ensaios pré-clínicos e rastreio de candidatos a novos medicamentos, bem como na investigação do potencial mutagênico de plantas medicinais utilizadas pela medicina popular.

Palavras-chaves: Ensaio de *Salmonella*/microsoma. Ensaios pré-clínicos. Plantas medicinais. Medicamentos.

Ames test for the evaluation of the mutagenic potential of medicinal plants and new molecules with biological activities

ABSTRACT

The Ames test is part of the pre-clinical trial battery to determine the mutagenic potential of new drugs and herbal medicines. This assay detect substances capable of inducing genic mutations such as base pair substitution and frameshift by means of *Salmonella* Typhimurium strains. In this sense, the present study has been realize to evaluate the potential mutagenic of the plants used in folk medicine and in the process of development of new molecules with biological activities using Ames test. In the first study was do to lifting of medicinal plants studied AMES test through bibliografic search in eletronic database Medline (via Pubmed), Science Direct, Scopus and Web of Science, from 1975 to may of 2018, using the terms “genotoxicity tests” OR “mutagenicity tests” OR “Ames test” AND “medicinal plants”. The research recorded a total of 293 articles, where was analysed 695 medicinal plants these 14 % (98/695) presented mutagenic potential. From among 597 species that no showed mutagenic potential, 32 % (195/597) showed antimutagenic activity. Thus, with the database analysis was possible demonstrate an expressive number of species with mutagenic potential. In addition, evidenced many these studies have not been performed in accordance with the recommended guidelines for the test, and therefore, the indicated results do not guarantee pharmacological safety as to the mutagenic potential. In the second study, two new copper(II) complexes were synthesized and tested for their antifungal potential against 21 clinical isolates of *Candida* species and their mutagenic potential by the Ames test using *Salmonella* Typhimurium TA98 and TA100. The complex 1 Cu(Bipy)Cl₂(thiouracil) presented antifungal activity against all the tested isolates and no exhibited mutagenic potential, it could be proposed as a potential new drug for anti-*Candida* therapy. In view of the results found in both studies, it is possible to conclude that the Ames test is a promising tool in the detection of mutagenic potential during the pre-clinical and screening stages of new drug candidates as well as in the investigation of the mutagenic potential of medicinal plants used by folk medicine.

Keywords: *Salmonella*/microsome assay. Pre-clinical trials. Medicinal plants. Drugs

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Contextualização histórica do processo de desenvolvimento de novos medicamentos	18
2.2 Agências reguladoras	19
2.2.1 Diretrizes que regulamentam o desenvolvimento de novos medicamentos quanto a avaliação da genotoxicidade	20
2.2.2 Diretrizes que regulamentam o desenvolvimento de fitoterápicos	22
2.3 Teste de Ames	22
2.3.1 Princípio do teste de Ames	24
2.3.2 Linhagens empregadas nos ensaios	25
2.3.3 Sistema de metabolização exógena	26
3 OBJETIVOS	27
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
5 APÊNDICES	32
5.1 Artigo 1: Potencial mutagênico de plantas medicinais pelo teste de Ames <i>Salmonella</i> /microsoma: Revisão Sistemática	33
5.2 Artigo 2: A Promising copper(II) complex as antifungal and antibiofilm drug against yeast infection	105
6 CONCLUSÃO	131
7 ANEXOS	132

1 INTRODUÇÃO

No processo de desenvolvimento de um novo medicamento é esperado que o mesmo apresente três requisitos essenciais, eficácia, qualidade e segurança farmacológica (HAMDAM et al., 2013). Assim, segundo as agências reguladoras, *Food and Drug Administration* (FDA), *European Medicines Agency* (EMA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) os ensaios pré-clínicos devem ser o ponto de partida no processo de desenvolvimento de um novo medicamento. Essa etapa garante a segurança farmacológica, além de reduzir os gastos na fase de ensaios clínicos com candidatos a novos fármacos que não são seguros para o consumo humano (CORVI e MADIA, 2017).

Os ensaios de genotoxicidade estão entre os ensaios pré-clínicos requeridos no processo de desenvolvimento de um novo medicamento e são responsáveis por detectar o potencial de causar mutações gênicas e/ou cromossômicas do mesmo (OUEDRAOGO et al., 2012; SPONCHIADO et al., 2016). Para a realização desses ensaios, as agências reguladoras indicam baterias de testes que incluem ensaios *in vitro* e *in vivo*, sendo que a opção mais comum inclui, um teste de mutação gênica em bactérias (teste de Ames), um teste *in vitro* para avaliação de aberrações cromossômicas e teste *in vivo* em mamíferos (EMA, 2008, FDA, 2012, BRASIL, 2013). Entre os testes sugeridos pela bateria de ensaios, o teste de Ames é o único que detecta mutações gênicas e, por isso sempre deve ser realizado durante a fase de ensaios pré-clínicos.

O teste de Ames consiste na utilização de linhagens de *Salmonella* Typhimurium, auxotróficas para histidina, que são capazes de detectar mutações gênicas do tipo substituição de pares de bases ou deslocamento do quadro de leitura, *frameshift*, nas substâncias avaliadas (MARON e AMES, 2000). Esse ensaio vem sendo utilizado desde a década de 1970 para detecção de mutágenos químicos, porém nos últimos anos pesquisas tem evidenciado que o teste de Ames tem sido muito utilizado na detecção do potencial mutagênico de produtos naturais para o desenvolvimento de novos fitoterápicos e, por isso pode ser considerado uma importante ferramenta da genética toxicológica do século XXI (CLAXTON et al., 2010; SPONCHIADO et al., 2016).

A obtenção de um resultado positivo pelo teste de Ames, durante a fase de ensaios pré-clínicos, representa um obstáculo significativo, uma vez que pode indicar que a amostra analisada apresenta potencial carcinogênico (CORVI et al., 2017). Em contrapartida, resultados negativos são considerados o suficiente para dar suporte a todos os estudos de genotoxicidade pré-clínicos de administração única (BRASIL, 2013).

Nesse sentido, dada a importância e sensibilidade do teste de Ames em detectar compostos mutagênicos, essa pesquisa objetivou avaliar as aplicações desse ensaio na avaliação do potencial mutagênico de plantas medicinais utilizadas pela medicina popular e no processo de desenvolvimento de novas moléculas com atividades biológicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A busca por recursos terapêuticos é uma prática milenar, desde os primórdios da civilização a população faz uso de plantas, minerais e animais para o tratamento das doenças (KINCH e HOYER, 2015). Com o passar dos anos foram descobertos compostos que revolucionaram a indústria farmacêutica e fomentaram o desenvolvimento desse setor.

A partir de então, a busca por novas moléculas e plantas medicinais com atividades biológicas se difundiu, a fim de se obter compostos com melhores potenciais de biodisponibilidade, segurança e mecanismos de ação mais eficazes para o tratamento das doenças. Nesse sentido, novos compostos e plantas medicinais estão sendo evidenciados com variadas atividades biológicas, como, antimicrobiana (CAAMAL-HERRERA et al., 2018; DANTAS et al., 2018, QASIM et al., 2018), anti-inflamatória (XIAO et al., 2018; ABU-SERIE et al., 2018), antiproliferativa (MOLINA-ROMO et al., 2018, PETRI et al., 2018), antioxidante (KOCOT et al., 2018; SHANG et al., 2018), entre outras.

2.1 Contextualização histórica do processo de desenvolvimento de novos medicamentos

A população faz uso de produtos naturais para o tratamento de doenças há muitos anos, no entanto, somente no século XIX foi iniciada a busca pelos princípios ativos das plantas para o desenvolvimento dos medicamentos (KINCH e HOYER et al., 2015).

Em 1806, a descoberta dos alcaloides, como a morfina isolada da papoula, *Papaver somniferum*, impulsionou a busca de medicamentos a partir das plantas. Anos mais tarde, 1939, a descoberta da salicina a partir da planta *Salix alba* e sua modificação estrutural originando o ácido salicílico, foram considerados um grande marco no processo de desenvolvimento de medicamentos pela indústria farmacêutica (DUTRA et al., 2016).

Outro marco importante nessa época foi a descoberta dos mecanismos de ação dos medicamentos pelo médico e pesquisador Paul Erlich em 1908, o qual ganhou o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia por esse feito. A partir de então, Paul Erlich continuou com suas pesquisas e discorreu sobre os receptores farmacológicos, sendo que esse achado impulsionou o desenvolvimento de muitos fármacos utilizados até hoje. Após a síntese de 606 compostos,

foi descoberto o quimioterápico *salvarsan*, o qual era derivado de arsênio e efetivo contra sífilis. Diante dessa descoberta, Erlich inovou ainda mais estabelecendo as primeiras noções de pesquisa clínica para avaliar a eficácia do *salvarsan* (CALIXTO et al., 2008).

Ainda no início do século XX, a descoberta da sulfanilamida e, mais tarde da penicilina por Alexander Fleming em 1928, marcaram a história da humanidade, uma vez que a produção em grande escala da penicilina, durante a Segunda Guerra Mundial, salvou a vida de muitas pessoas. No entanto, apesar desses avanços, ainda não existiam nessa época muitos critérios que norteavam o processo de desenvolvimento de novos fármacos (KINCH e HOYER et al., 2015).

O incidente ocorrido nos Estados Unidos, devido a utilização do elixir de sulfanilamida que levou a morte de muitas pessoas, impulsionou a criação de critérios para avaliação do possível efeito tóxico dos compostos. Assim, em 1938, Ceiling e Cannon sugeriram a realização de ensaios pré-clínicos para novos medicamentos, fato este que culminou com o Código de Nuremberg que estabeleceu que os novos medicamentos deveriam apresentar as seguintes características antes de serem administrados aos seres humanos: composição química e pureza bem estabelecidos, testes de toxicidade aguda e prolongada em diferentes animais, análises histopatológica de órgãos vitais como, rins e fígado, conhecimento sobre concentração nos tecidos e interação com outros medicamentos e alimentos (CALIXTO et al., 2008). Assim, a partir da Segunda Guerra Mundial surgiram grandes indústrias farmacêuticas na Europa e nos Estados Unidos que impulsionaram o desenvolvimento dos medicamentos (PATRIDGE et al., 2015).

2.2 Agências reguladoras

Paralelamente aos acontecimentos históricos, agências reguladoras foram criadas com o intuito de normatizar o processo de desenvolvimento dos medicamentos. Em 1906, foi criada nos Estados Unidos a *Food and Drug Act* que mais tarde (1951) foi transformada em *Food and Drug Administration* (FDA), a fim de supervisionar e regulamentar a maioria dos produtos alimentares, cosméticos e medicamentos humanos e veterinários. Em 1962, após os incidentes ocorridos devido ao uso da sulfanilamida e da talidomida, a FDA adotou critérios mais rigorosos quanto a segurança dos medicamentos (KINCH e HOYER, 2015). A partir de então, todos os medicamentos passaram a ser avaliados por ensaios pré-clínicos antes da administração em humanos e agências reguladoras passaram a ser instituídas em todo mundo (PATRIDGE et al., 2015).

Em 1995 foi criada na Europa a *European Medicines Agency* (EMA) com o intuito de promover a eficácia e segurança de medicamentos para o uso humano e veterinário em toda a União Europeia (EMA, 2018). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) foi criada em 1999 com o objetivo de promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e consumo de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária (ANVISA, 2018). No Japão, no ano de 2004, também foi criada a *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency* (PMDA) a fim de normatizar o processo de desenvolvimento de novos medicamentos.

Com a criação dessas agências reguladoras surgiram os regulamentos e orientações para a avaliação da eficácia, qualidade e segurança dos novos medicamentos em todos os países. A comercialização desses produtos no mercado internacional despertou o interesse da harmonização dos testes pelas agências reguladoras. Em 1990, durante uma conferência da Organização Mundial da Saúde (OMS), representantes da Europa, Estados Unidos e Japão decidiram criar a *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical Products for Human Use* (ICH), a fim de estabelecer diretrizes comuns entre as agências que garantam que os medicamentos sejam desenvolvidos e registrados de maneira mais eficiente e com alta qualidade (SINGH et al., 2015).

A partir de então, todos os países pertencentes a ICH passaram a seguir as mesmas diretrizes. Além da FDA, EMA e PMDA, o Brasil participa, atualmente, como membro regular da ICH com mais 6 membros reguladores *Health Canadá*, Canadá; *Swissmedic*, Suíça; *Ministry of Food and Drug Safety*, Coreia do Sul; *Health Sciences Authority*, Singapura; *China Food and Drug Administration*, China; *Taiwan Food and Drug Administration*, Taiwan e 6 indústrias farmacêuticas (ANVISA, 2018; ICH, 2018).

2.2.1 Diretrizes que regulamentam o desenvolvimento de novos medicamentos quanto a avaliação da genotoxicidade

No processo de desenvolvimento de novos medicamentos são requeridos ensaios pré-clínicos e clínicos que garantam a eficácia, qualidade e segurança desses produtos. Por isso, agências reguladoras em todo mundo estabelecem diretrizes para garantir a autorização e registro dos novos medicamentos.

Os ensaios pré-clínicos de segurança incluem, estudos de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade, além de estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (HANDAM et al., 2017).

As principais agências reguladoras do mundo (FDA, EMA e Anvisa) estabeleceram as suas diretrizes, quanto aos ensaios pré-clínicos, com base na regulamentação da ICH, “S2(R1) *Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use*”. Assim, de acordo com essas agências, as diretrizes para avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de novos medicamentos deve adotar uma bateria de testes que inclui ensaios *in vitro* e *in vivo* que avaliam mutações gênicas e cromossômicas estruturais e numéricas (EMA, 2008; FDA, 2012; BRASIL, 2013), conforme esquematizado na Figura 1.

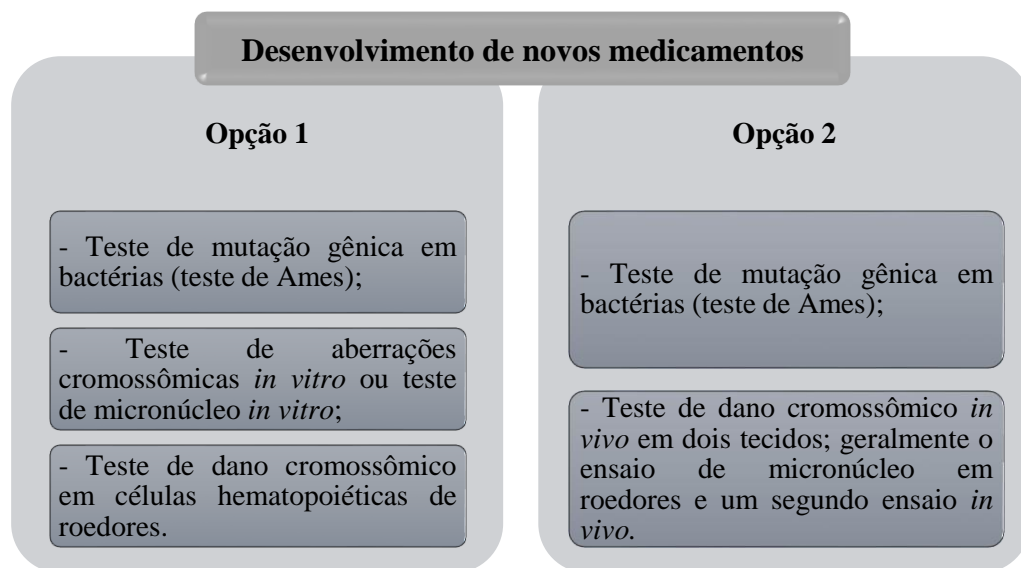


Figura 1: Bateria de testes para avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de produtos farmacêuticos utilizados em humanos de acordo com a EMA (2008), FDA (2012), BRASIL (2013).

A avaliação típica de um novo medicamento consiste na realização de em um ensaio de mutação gênica em bactérias (OECD TG 471), um ensaio *in vitro* em mamíferos para avaliação de aberrações cromossômicas (OCDE TG 473) e um ensaio *in vivo* para avaliação de mutações cromossômicas (OECD TG 474 ou 475) (EMA, 2008; ICH, 2012; BRASIL, 2013). Assim, de acordo com os órgãos reguladores independente da bateria de ensaios escolhida, o teste de Ames deverá ser realizado, pois é o único preconizado para avaliar o potencial de induzir mutações gênicas, uma vez que os demais ensaios recomendados avaliam somente mutações cromossômicas. Além do mais, estudos tem evidenciado a correlação entre os resultados apresentados pelo teste de Ames e ensaios com roedores, demonstrando a sensibilidade deste teste *in vitro* em detectar compostos mutagênicos e carcinogênicos (AMES et al., 1973a; ESCOBAR et al., 2013, CORVI e MADIA, 2017).

2.2.2 Diretrizes que regulamentam o desenvolvimento de fitoterápicos

O processo de desenvolvimento e regulamentação dos fitoterápicos ainda difere conforme o país, pois não há uma harmonização de ensaios para avaliação da eficácia, qualidade e segurança como acontece com os medicamentos sintéticos (AHN, 2017).

No Brasil, a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 26/2014 dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. O Art. 18 dessa resolução prevê que os ensaios pré-clínicos devem seguir a última versão publicada pela Anvisa do “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos” (BRASIL, 2014). A partir de 2018, a Anvisa também estabeleceu regulamentação específica para os suplementos alimentares, como no caso dos probióticos que a RDC nº 241/2018 também prevê a realização de ensaios pré-clínicos como estabelecido para os fitoterápicos e medicamentos sintéticos (BRASIL, 2018).

Nos Estados Unidos, os produtos a base de plantas medicinais são conhecidos como “*botanical drug*” e podem ser utilizados para cura, mitigação, tratamento ou prevenção de doenças em humanos ou como suplementos alimentares. As preparações botânicas destinadas ao tratamento de doenças são registradas pela FDA e devem seguir diretrizes específicas, como a orientação “*Botanical Drug Development Guidance for Industry*” publicada pelo *Center for Drug Evaluation and Research* (CDER) (FDA, 2016). Essa orientação prevê que os ensaios pré-clínicos devem seguir as diretrizes da ICH S2(R1) para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos. Em contrapartida, as preparações que especificam no rótulo a utilização somente como suplemento alimentar não precisam passar pela bateria de ensaios pré-clínicos que atestem a segurança desses produtos (FALZON e BALABANOVA, 2017).

Com base nas regulamentações das agências reguladoras para avaliação do potencial genotóxico e mutagênico dos fitoterápicos é necessário seguir as diretrizes que regulamentam o desenvolvimento de novos medicamentos. Sendo assim, o teste de Ames também é um dos ensaios pré-clínicos para avaliação da segurança dos fitoterápicos.

2.3 Teste de Ames

Ao longo da vida, o DNA é exposto a agentes químicos e físicos que podem provocar danos na sua estrutura e composição. Esses danos podem ser reversíveis caso sejam reparados e irreversíveis caso se instalem como um erro permanente, estabelecendo uma mutação gênica e/ou cromossômica (CORVI e MADIA, 2017). Assim, as mutações ao mesmo tempo que

promovem a variabilidade genética entre as espécies, também estão associadas ao desenvolvimento de várias doenças devido a essas mutações, como por exemplo o câncer.

Os primeiros relatos de mutagênese iniciaram em 1927 por Herman Muller que constatou que a radiação ionizante causava mutações em *Drosophila melanogaster*. Anos mais tarde, em 1942, Auerbach e Rosbson relataram que o gás mostarda utilizado como bomba química durante Primeira Guerra Mundial também induzia mutações em *D. melanogaster*. Apesar desta importante descoberta no campo da mutagênese, nessa época a maior preocupação era o estudo de mutágenos químicos para elucidação de processos genéticos e celulares, sendo que o estudo sobre o desenvolvimento do câncer e de outras doenças em decorrência da exposição a compostos potencialmente mutagênicos era deixado de lado (ZEIGER, 2017).

Após a Segunda Guerra Mundial, com o avanço da Revolução Industrial, surgiu o interesse de estudar os mutágenos químicos que eram lançados no meio ambiente e com isso iniciou a busca por testes que esclarecessem esse processo. Neste sentido, em meados do século XX foi desenvolvido um ensaio com linhagens de *Escherichia coli*, o qual se tornou o teste pioneiro de mutagenicidade *in vitro* (DEMAREC et al., 1951; SZYBALSKI, 1958). Posteriormente, em 1966 estudos sobre o mapeamento de genes responsáveis pela biossíntese da histidina deram origem a vários mutantes espontâneos de *Salmonella Typhimurium* LT-2. Assim, Ames e Whitfield (1966) aproveitaram essas linhagens para realizar um rastreamento de mutágenos químicos pelo *Spot Test*. Esse teste foi previamente utilizado nos ensaios com mutantes de *E. coli* (IYER e SZYBALSKI, 1958; SZYBALSKI, 1958) e consistiu em semear o microrganismo em uma placa contendo ágar seletivo e em seguida a aplicação do composto teste no centro da mesma para observar a formação de um gradiente de concentração. Desta forma, se o composto apresentasse potencial mutagênico iria reverter a condição do microrganismo e voltaria a crescer e formar colônias (AMES, 1971).

Apesar deste grande avanço na detecção de compostos mutagênicos, o teste ainda possuía limitações, uma vez que bactérias não são capazes de replicar o metabolismo dos mamíferos identificando mutágenos de ação indireta (CLAXTON et al., 2010), e por isso ainda existia uma lacuna na correlação de mutágenos químicos e o processo de carcinogenicidade. Assim, em 1971 Malling propôs utilizar homogenato de fígado de rato como processo de metabolização exógena no ensaio de mutagenicidade com *S. Typhimurium* e verificou mutágenos de ação indireta. Diante deste progresso, Ames et al. (1973a) propuseram a combinação entre as linhagens, o composto teste e o homogenato de fígado de rato (fração S9) ou tampão fosfato. Esse ensaio comprovou a ação de mutágenos indiretos e diretos e permitiu

reforçar a relação entre mutagenicidade e carcinogenicidade (CLAXTON et al., 2010) e por isso, o teste de Ames é considerado um marco da toxicologia genética até os dias de hoje.

Conforme relatado, primeiramente o teste de Ames foi empregado para avaliação do potencial mutagênico de produtos químicos, porém, nos últimos anos tem aumentado o número de pesquisas que utilizam esse teste para avaliar o potencial mutagênico de extratos de plantas. Claxton et al. (2010) em um estudo sobre o emprego do teste em diferentes amostras ambientais, evidenciaram que a utilização do teste de Ames na avaliação de produtos naturais aumentou em meados da década de 1990, provavelmente, devido a busca de plantas com propriedades terapêuticas. Sponchiado et al. (2016) também evidenciaram que o ensaio de reversão bacteriana com *Salmonella*/microsoma tem sido um dos modelos mais empregados para avaliar o potencial mutagênico de plantas medicinais. Assim, o teste de Ames é referência na avaliação do potencial mutagênico de amostras ambientais e produtos naturais para o desenvolvimento de novos medicamentos.

2.3.1 Princípio do teste de Ames

O Teste de Ames ou Ensaio *Salmonella*/microsoma ou Ensaio de reversão bacteriana é um ensaio de mutagenicidade *in vitro* que foi desenvolvido para detectar compostos químicos capazes de induzir mutações gênicas (AMES et al., 1975). Basicamente, as mutações gênicas podem ser subdivididas em substituição de pares de bases e deslocamento do quadro de leitura, *frameshift* (GRIFFITHS et al., 2006).

O teste emprega linhagens de *Salmonella* Typhimurium derivadas da parental LT-2 que possuem caráter de auxotrofia para histidina (*His⁻*), e por isso são incapazes de crescer e formar colônias na ausência deste aminoácido. Na presença de compostos capazes de induzir danos no DNA surgem novas mutações que restauram a função do gene e permitem a síntese de histidina. Assim, as células mutadas são capazes de crescer e formar colônias na ausência de histidina, aminoácido essencial para o seu desenvolvimento (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Para a realização do teste, traços de histidina e biotina são adicionados ao meio permitindo um crescimento inicial, o qual é facilmente visualizado pela presença constante de revertentes espontâneos (MARON e AMES, 1983). O teste também pode ser realizado na presença (+ S9) e ausência (- S9) de sistema de metabolização exógena, permitindo a identificação de compostos de ação direta e indireta (AMES et al., 1973b). Assim, um composto é considerado mutagênico quando, (i) a razão de mutagenicidade (RM) for igual ou maior a 2 em pelo menos uma das concentrações testadas, (ii) os dados apresentarem diferença estatística significativa e apresentarem uma relação de dose-resposta positiva entre as concentrações

testadas e o número de revertentes induzidos (OECD, 1997). As concentrações que apresentam um RM inferior a 0,7 são consideradas citotóxicas (KUMMROW et al, 2006).

2.3.2 Linhagens empregadas nos ensaios

Um conjunto de linhagens foram desenvolvidas para serem empregadas no Teste de Ames, na Tabela 1 estão descritas as mais utilizadas nos ensaios. As linhagens variam quanto ao tipo de mutação em vários genes do *operon* da histidina, sendo possível detectar mutágenos que apresentam diferentes mecanismos de ação (MORTELMANS e ZEIGER, 2000). Além da mutação no *operon* da histidina foram realizadas mutações adicionais para garantir maior sensibilidade das linhagens na detecção dos mutágenos:

- **Mutação *rfa* e *gal*:** Essas mutações causam deformidade nos lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa das bactérias. Essa camada atua como uma barreira impedindo a penetração de mutágenos, por isso essa mutação interfere na permeabilidade da membrana (AMES et al., 1973b).

Deleção *uvrB-bio*: O gene *uvrB* é um dos responsáveis pelo reparo por excisão, a deleção desse gene levou a eliminação desse mecanismo, fazendo com que essas lesões no DNA sejam reparadas pelo sistema de reparo *error-prone* (passível a erros). A deleção do gene *uvrB* se estendeu e afetou também o gene responsável pela síntese de biotina, tornando-se também biotina dependente (AMES et al., 1973b).

Inserção *pkM101*: Neste plasmídeo há o gene *mucAB*, que aumenta o sistema de reparo do tipo *error-prone* (passível de erro). O plasmídeo também confere resistência a ampicilina, que se torna um vantajoso marcador para detectar se a adição do plasmídeo foi efetiva (MORTELAMAS e STOCKER, 1979).

Inserção *paQ1*: A adição desse plasmídeo confere a linhagem uma ampliação do número de sítios específicos para a mutagênese, em adição, possui resistência a tetraciclina, tornando-se também um marcador (MARON e AMES, 1983).

Assim, todas linhagens apresentam a mutação *rfa* que provoca modificações na camada de lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa aumentando a permeabilidade a moléculas grandes que antes não conseguiriam passar por essa barreira. Com exceção da linhagem TA102 as demais também apresentam a deleção do gene *uvrB* que é um dos responsáveis pelo reparo por excisão, e por isso não desempenham esse mecanismo fazendo com que essas lesões no DNA sejam reparadas pelo sistema de reparo *error-prone* (passível de erro).

Tabela 1: Características genéticas das linhagens de *Salmonella* Typhimurium mais utilizadas no teste de Ames.

Linhagens	Genótipo	Alvo no DNA	Tipo de mutação	Mutações adicionais		
				<i>bio</i> , <i>uvrB</i>	LPS	
TA1537	<i>hisC3076</i>	GC	<i>frameshifts</i>	Δ <i>uvrB</i> , Δ <i>bio</i>	<i>rfa</i>	-
TA98	<i>hisD3052</i>	GC	<i>frameshifts</i>	Δ <i>uvrB</i> , Δ <i>bio</i>	<i>rfa</i>	pKM101 ^a
TA1538		GC	<i>frameshifts</i>	Δ <i>uvrB</i> , Δ <i>bio</i>	<i>rfa</i>	-
TA97	<i>hisD6610</i>	GC	<i>frameshifts</i>	Δ <i>uvrB</i> , Δ <i>bio</i>	<i>rfa</i>	pKM101 ^a
TA1535	<i>hisG46</i>	GC	substituição de pares de bases	Δ <i>uvrB</i> , Δ <i>bio</i>	<i>rfa</i>	-
TA100		GC	substituição de pares de bases	Δ <i>uvrB</i> , Δ <i>bio</i>	<i>rfa</i>	pKM101 ^a
TA102	<i>hisG428</i>	AT	substituição de pares de bases	+	<i>rfa</i>	pKM101 ^a e pAQ1 ^b
TA104		AT	substituição de pares de bases	Δ <i>uvrB</i> , Δ <i>bio</i>	<i>rfa</i>	-

Δ indica deleção do gene; + indica gene tipo selvagem; ^a confere resistência a ampicilina; ^b confere resistência a tetraciclina.

2.3.3 Sistema de metabolização exógena

As linhagens de *S. Typhimurium* são incapazes de metabolizar compostos químicos via citocromo P450, como acontece nos mamíferos, sendo assim, foi necessária a inclusão de um sistema de metabolização exógena no teste de Ames para permitir a detecção de compostos que precisam ser metabolizados para se tornarem ativos, como as aminas aromáticas, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e aflatoxinas (AMES et al., 1973b). As enzimas do citocromo P450 geralmente são expressas no fígado, por isso, Malling em 1971, propôs a utilização de um homogenato de fígado de rato para realizar metabolização de compostos químicos que são reativos com o DNA somente após esse processo.

Assim, o sistema de metabolização exógena comumente utilizado é a fração microsossomal S9, proveniente de fígado de rato Sprague Dawley previamente tratado com a solução de bifenil policromida (Aroclor 1254) para induzir um aumento de enzimas neste órgão. Para o preparo da fração são acrescentados co-fatores como glicose-6-fosfato e β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP), além de tampão fosfato, água, cloreto de potássio e cloreto de magnésio (MORON e AMES, 1983). Com a utilização da fração S9 o teste de Ames

passou a detectar compostos de ação direta e indireta e por isso é utilizado até os dias de hoje para avaliação do potencial mutagênico de diversos tipos de amostras.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a aplicação do teste de Ames no estudo do potencial mutagênico de plantas medicinais e novas moléculas com atividades biológicas.

3.2 Objetivos específicos

- Relatar a aplicação do teste de Ames na avaliação do potencial mutagênico de plantas medicinais;
- Listar as espécies de plantas utilizadas na medicina popular que já foram avaliadas pelo teste de Ames;
- Investigar o potencial mutagênico de dois novos complexos de cobre(II) com ligantes 2-tiouracil;
- Avaliar a atividade antifúngica dos dois novos complexos de cobre(II).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SERIE, M. M., HABASHY, N.H., ATTIA, W.E. *In vitro* evaluation of the synergistic antioxidant and anti-inflammatory activities of the combined extracts from Malaysian *Ganoderma lucidum* and Egyptian *Chlorella vulgaris*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, p. 1-13, 2018.

AHN, K. The worldwide trend of using botanical drugs and strategies for developing global drugs. **BMB Reports**, v. 50, p. 111-116, 2017

AMES, B.N. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: *Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection* (Hollaender A, ed). **New York: Plenum Press**, v. 1, p. 267–282, 1971.

AMES, B.N., DURSTON, W.E., YAMASAKI, E., LEE, F.D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v, 70, p. 2281–2285, 1973a.

AMES, B.N., LEE, F.D., DURSTON, W.E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, p. 782–786, 1973b.

AMES, B.N., WHITFIELD, H.J. Frameshift mutagenesis in *Salmonella*, Cold Spring Harbor Symp. **Quantitative Biology**, v. 23, p.221–225, 1966.

AMES, B.N., MCCANN, J., YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 31, p. 347–364.

ANVISA. Agência de Vigilância Sanitária. Anvisa é novo membro do ICH. Notícia, 2018. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/com-o-inicio-da-reforma-do-ich-a/219201?inheritRedirect=false. Acesso em 15 de novembro de 2018.

BRASIL. Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), Brasília, DF, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 26, de 14 de Maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília, DF, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 241, de 26 de Julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Brasília, DF, 2018.

CAAMAL-HERRERA, I.O., CARRILLO-COCOM, L.M., ESCALANTE-RÉNDIZ, D.Y., ARÁIZ-HERNÁNDEZ, D., AZAMAR-BARRIOS, J.A. Antimicrobial and antiproliferative activity of essential oil, aqueous and ethanolic extracts of *Ocimum micranthum* Willd leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.18, p. 1-9, 2018.

CALIXTO, J.B., JUNIOR, J.M.S. The Drug Development in Brazil: Challenges. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p 98-106, 2008.

CLAXTON, L.D, UMBUZEIRO, G.A, DEMARINI, D.M. The *Salmonella* Mutagenicity Assay: The Stethoscope of Genetic Toxicology for the 21st Century. **Environmental Health Perspectives**, v.118, p. 1515-1522, 2010.

CORVI, R., MADIA, F. *In vitro* genotoxicity testing - Can the performance be enhanced? **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, p. 600-608, 2017.

DANTAS, F.G.S., ALMEIDA-APOLONIO, A.A., ARAUJO, R.P., FAVARIN, L.R.V., CASTILHO, P.F., GALVÃO, F.O., SVIDZINSKI, T.I.E., CASAGRANDE, G.A., OLIVEIRA, K.M.P. A Promising Copper(II) Complex as antifungal and antibiofilm drug against yeast infection. **Moléculas**, v. 23, p. 1856, 2018.

DEMEREK, M., BERTANI, G., FLINT, J. A survey of chemicals for mutagenic action on *E. coli*. **The American Naturalist**, v. 85, p. 119-136, 1951.

DUTRA, R.C., CAMPOS, M.M., SANTOS, A.R.S., CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

EMA. Agência Europeia de Medicamentos. Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals, CPMP/ICH/286/95, 2008.

EMA. European Medicines Agency. History of EMA, 2018. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/about-us/history-ema>. Acesso em: 19 de Agosto de 2018.

ESCOBAR, P.A., KEMPER, R.A., TARCA, J., NICOLETTE, J., KENYON, M., GLOWIENKE, S., SAWANT S.G., CHRISTENSEN, J., JOHNSON, T.E., MCKNIGHT, C., WARD, G., GALLOWAY, S.M., CUSTER, L., GOCKE, E., O'DONOVAN, M.R., BRAUN, K., SNYDER, R.D., MAHADEVAN, B. Bacterial mutagenicity screening in the pharmaceutical industry. **Mutation Research**, v. 752, p. 99–118, 2013.

FALZON, C.C., BALABANOVA A. Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 44, p. 217-227, 2017.

FDA. International Conference on Harmonisation. Guidance on S2 (R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use; Availability. Notice. Food and Drug Administration. Federal Register, v. 77, p. 33748–33749, 2012.

FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Botanical Drug Development Guidance for Industry. Food and Drug Administration. Federal Register, v. 81, 96018-96020, 2016.

GRIFFITHS, A. J.F., WESSLER, S.R., CARROLL, S.B., DOEBLEY, J. **Introdução a Genética**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 780 p.

HAMDAM, J., SETHU, S., SMITH, T., ALFIREVIC, A., ALHAIDARI, M., ATKINSON, J., AYALA, M., BOX, H., CROSS, M., DELAUNOIS, A., DERMODY, A., GOVINDAPPA, K., GUILLON, J.M., JENKINS, R., KENNA, G., LEMMER, B., MEECHAM, K., OLAYANJU, A., PESTEL, S., ROTHFUSS, A., SIDAWAY, J., SISON-YOUNG, R., SMITH, E., STEBBINGS, R., TINGLE, Y., VALENTIN, J.P., WILLIAMS, A., WILLIAMS, D., PARK, K., GOLDRING, C. Safety pharmacology - current and emerging concepts. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 273, p. 229-241, 2013.

ICH. Conferência Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos para o Registro de Produtos Farmacêuticos para Uso Humano Current Members and Observers, 2018. Disponível em: <https://www.ich.org/about/members-observers.html>. Acesso em: 18 de setembro de 2018.

IYER, V.N, SZYBALSKI, W. Two simple methods for the detection of chemical mutagens, **Journal of Applied Microbiology**, v 6, p. 23–29, 1958.

KINCH, M S., HOYER, D. A history of drug development in four acts. **Drug Discovery Today**, v. 20, p. 1163-1168, 2015.

KOCOT, J., KIEŁCZYKOWSKA, M., LUCHOWSKA-KOCOT, D., KURZEPA, J., MUSIK, I. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 7074209, 2018.

KUMMROW, F, MAGALHÃES, D, FRANCO, A, UMBUZEIRO, GA. Blue rayon e teste *Salmonella*/microsoma na avaliação da qualidade de águas costeiras. **Revista Saúde Pública**, v. 40, p. 90-897, 2006.

LEVIN, D.E., YAMASAKI, E., AMES, B.N. A new *Salmonella* tester strain for the detection of frameshift mutagens: a run of cytosines as a mutational hot-spot. **Mutation Research**, v. 94, p. 315-330, 1982.

MALLING, H.V. Dimethylnitrosamine: formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsomes. **Mutation Research**, v. 13, p. 425–429, 1971.

MARON, D., AMES, B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173–215, 1983.

MOLINA-ROMO, E. D., GARIBAY-ESCOBAR A.; VALENZUELA-ANTELO O.; RUIZ-BUSTOS, E.; MARTÍNEZ, J. H., VÉLAZQUEZ, C.; RASCÓN-VALENZUELA, L.A.; ROBLES-ZEPEDA, R. E. Antiproliferative and Apoptotic Activities of the Medicinal Plant *Ziziphus obtusifolia*. **Pharmacognosy Research**, v. 10, p. 55–59, 2018.

MORTELMANS, K., STOCKER, B.A.D. Segregation of the mutator property of plasmid R46 from its ultraviolet-protection properties. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 167, p. 317–327, 1979.

MORTELMANS, K., ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29–60, 2000.

OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals No.471: Bacterial Reverse Mutation Test [the Ames test]. (Original Guideline, adopted 21st July 1997). Organisation for Economic Co-operation and Development, 1997a.

OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test [in vivo micronucleus test]. (Original Guideline, Adopted 21st July 1997). Organisation for Economic Co-operation and Development, 1997b.

OECD. Guideline for the testing of chemicals No. 473: *In vitro* mammalian chromosomal aberration test. Organisation for Economic Co-operation and Development, 2014a.

OECD. Guideline for the testing of chemicals No. 475: Mammalian bone marrow chromosomal aberration test. Organisation for Economic Co-operation and Development, 2014b.

OUEDRAOGO, M., BAUDOUX, T., STÉVIGNY, C., NORTIER, J., COLET, J.M., EFFERTH, T., QU, F., ZHOU, J., CHAN, K., SHAW, D., PELKONEN, O., DUEZ, P. Review of current and "omics" methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 492– 512, 2012.

PATRIDGE, E.V., GAREISS, P.C., KINCH, M.S., HOYER, D.W. An analysis of original research contributions toward FDA-approved drugs. **Drug Discovery**, v. 20, p. 1182-1187, 2015.

PRETI, D., ROMAGNOLI, R., RONDANIN, R., CACCIARI, B., HAMEL, E., BALZARINI, J., LIEKENS, S., SCHOLS, D., ESTEVEZ-SARMIENTO, F., QUINTANA, J., ESTEVEZ, F. Design, synthesis, *in vitro* antiproliferative activity and apoptosis-inducing studies of 1-(30,40,50-trimethoxyphenyl)-3-(20-alkoxycarbonylindolyl)-2-propen-1-one derivatives obtained by a molecular hybridisation approach. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 33, p. 1225–1238, 2018.

QASIM, M., UDOMLUCK, N., CHANG, J., PARK, H., KIM, K. Antimicrobial activity of silver nanoparticles encapsulated in poly-N-isopropylacrylamide-based polymeric nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 235–249, 2018.

SHANG, H.M., ZHOU, H.Z., YANG, J.Y., RAN LI, R, SONG, H., WU, H.X. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activities of inulin. **Plos One**, v. 2, p. 1-12, 2018.

SINGH, B., SINGH, J.P., KAURB, A., SINGH, N. Phenolic composition and antioxidante potential of grain legume seeds: A review. **Food Research International**, v. 101, p. 1–16, 2017.

SPONCHIADO, G., ADAM, M.L, SILVA, C.D, SOLEY, B.S, MELLO-SAMPAYO, C., CABRINI, D.A, CORRER, C.J, OTUKI, M.F. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A Systematic review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 289-296, 2016.

SZYBALSKI W. Special microbiological systems. II. Observations on chemical mutagenesis in micro organisms. **Ann NY Acad Sci**, v. 76, p. 475–489, 1958.

XIAO, S., ZHANG, W., CHEN, H, FANG, B., QIU, Y., CHEN, X., CHEN, L., SHU, S., ZHANG, Y., ZHAO, Y., LIU, Z., LIANG, G. Design, synthesis, and structure–activity relationships of 2-benzylidene-1-indanone derivatives as anti-inflammatory agents for treatment of acute lung injury. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 887–899, 2018.

ZEIGER, E. Reflections on a career and on the history of genetic toxicity testing in the National Toxicology Program. **Mutation Research**, v. 773, p. 282-292, 2017.

5 APÊNDICES

5.1 Artigo 1: Potencial mutagênico de plantas medicinais pelo teste de Ames *Salmonella/microsoma*: Revisão Sistemática

Manuscrito nas normas para submissão no periódico “*Journal of Ethnopharmacology*” (Qualis A2 em Medicina II, Fator de impacto 3.115).

Link para as normas da revista: <https://www.elsevier.com/journals/journal-of-ethnopharmacology/0378-8741/guide-for-authors>

Potencial mutagênico de plantas medicinais pelo teste de Ames

Salmonella/microssoma: Revisão Sistemática

Fabiana Gomes da Silva Dantas^a, xxx, xxx, xxx, Kelly Mari Pires de Oliveira^{ab*}

^a Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.

^b Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.

*Autor correspondente

Endereço: Universidade Federal da Grande Dourados

Rodovia Dourados - Itahum, Km 12

CEP 79804-970, Dourados, MS, Brazil.

E-mail: kellyoliveira@ufgd.edu.br

Resumo

O teste de Ames tem sido um dos ensaios mais empregados para avaliação do potencial mutagênico das plantas medicinais nos últimos anos. As plantas medicinais apresentam diversas atividades biológicas devido a presença de substâncias bioativas e por isso, vem sendo utilizadas na medicina popular e como fonte de matéria-prima para indústria farmacêutica. Nesse sentido, essa revisão tem por objetivo relatar a utilização do teste de Ames na avaliação do potencial mutagênico de plantas medicinais. O banco de dados foi construído a partir da pesquisa bibliográfica nas bases de dados eletrônicas, *Medline* (via Pubmed), *Science Direct*, *Scopus* e *Web of Science*, no período de 1975 a maio de 2018, utilizando os seguintes termos: “*genotoxicity tests*” OR “*mutagenicity tests*” OR “*Ames test*” AND “*medicinal plants*”. A busca nas bases bibliográficas resultou em 1930 artigos, dos quais foram selecionados 293 para compor o nosso banco de dados. Nós verificamos que 695 espécies de plantas medicinais foram avaliadas pelo teste de Ames, sendo que dessas 14 % (98/695) apresentaram potencial mutagênico. Também observamos que as linhagens TA97a, TA98 e TA102 se destacaram na detecção do potencial mutagênico das plantas analisadas e que a realização do teste na presença e ausência do sistema de metabolização exógena é importante pois, garante a detecção de mutágenos de ação indireta e direta. Esses resultados indicam que algumas plantas utilizadas pela medicina popular apresentaram características mutagênicas e, por isso a realização de ensaios de mutagenicidade/genotoxicidade, como o teste de Ames, são necessários a fim de

garantir que a população tenha acesso a informação quanto a segurança das plantas medicinais utilizadas.

Palavras-chaves: Genotoxicidade, teste de Ames, medicina popular, ensaios pré-clínicos.

1 Introdução

O Teste de Ames foi padronizado na década de 1970 (Ames et al. 1975) para a avaliação do potencial mutagênico de produtos químicos. Porém, nos últimos anos tem aumentado o número de pesquisas que utilizam este ensaio para avaliar o potencial mutagênico de extratos de plantas. Sponchiado et al. (2016), em um estudo sobre os principais testes utilizados na avaliação do potencial mutagênico de plantas medicinais, verificaram que o teste de Ames tem sido um dos ensaios mais empregados, seja para comprovação do uso seguro das plantas ou como item da bateria de ensaios pré-clínicos para a produção de um fitoterápico. O teste de Ames emprega linhagens de *Salmonella* Typhimurium, auxotróficas para histidina, para detectar mutações gênicas do tipo substituição de pares de bases e deslocamento do quadro de leitura, *frameshift* (Umbuzeiro e Zeiger, 2017)

Para o processo de produção e registro dos fitoterápicos é recomendado a utilização das mesmas diretrizes que regulamentam o desenvolvimento de novos medicamentos (Falzon e Balabanova, 2017), conforme preconização das agências *Food and Drug Administration* (FDA), a *European Medicines Agency* (EMA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Essas agências estabelecem critérios para realização de ensaios pré-clínicos que garantem a segurança toxicológica dos medicamentos, além da eficácia e qualidade.

Para avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de novos medicamentos é necessário adotar uma bateria de testes que inclui ensaios *in vitro* e *in vivo* que avaliam mutações gênicas e cromossômicas estruturais ou numéricas. Sendo que uma avaliação típica de um novo medicamento consiste na realização de um ensaio de mutação gênica em bactérias teste de Ames (OECD TG 471), um ensaio *in vitro* (OCDE TG 473) e um ensaio *in vivo* (OECD TG 474 ou 475) em mamíferos para avaliação das mutações cromossômicas (EMA, 2008; FDA, 2012; Brasil, 2013).

Assim, de acordo com os órgãos reguladores independente da bateria de ensaios escolhida, o teste de Ames deverá ser realizado, pois é o único preconizado para avaliar o potencial de induzir mutações gênicas, uma vez que os demais ensaios recomendados avaliam somente mutações cromossômicas. Além do mais, estudos tem evidenciado a correlação entre

os resultados apresentados pelo teste de Ames e ensaios com roedores, demonstrando a sensibilidade deste teste *in vitro* em detectar compostos mutagênicos e carcinogênicos (Ames et al., 1973a; Escobar et al., 2013, Corvi e Madia, 2017).

Nesse sentido, essa revisão sistemática pretende relatar a aplicação do teste de Ames na avaliação do potencial mutagênico de plantas medicinais e realizar um levantamento das espécies que já foram avaliadas pelo teste.

2 Metodologia

2.1 Estratégia da pesquisa bibliográfica

A revisão sistemática foi realizada a partir de uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados eletrônicas, *Medline* (via Pubmed), *Science Direct*, *Scopus* e *Web of Science* no período de 1975 a maio de 2018. Foram utilizados os seguintes termos: “*genotoxicity tests*” OR “*mutagenicity tests*” OR “*Ames test*” AND “*medicinal plants*”.

A triagem dos artigos foi realizada em duas etapas, primeiro o título e resumo dos artigos foram analisados, posteriormente os artigos foram baixados para análise minuciosa de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Ainda nesta etapa, os textos considerados elegíveis para a revisão (ou em caso de dúvida) foram selecionados para leitura do arquivo completo.

2.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos os artigos que atenderam os seguintes critérios de inclusão: (i) estudos que avaliaram o potencial mutagênico e/ou antimutagênico de extratos de plantas utilizando o teste de Ames, (ii) estudos que apresentaram as diferentes variações do teste de Ames, (iii) artigos escritos em português, espanhol e inglês, (iv) publicações no período de 1975 a maio de 2018.

Para a construção do banco de dados também foram considerados os seguintes critérios de exclusão: (i) estudos com compostos isolados, formulações envolvendo mais de uma planta e fitoterápicos, (ii) artigos de revisão, teses e dissertações e resumos publicados em anais de eventos, (iii) artigos duplicados.

2.3 Extração dos dados

A extração dos dados foi realizada de acordo com os critérios de elegibilidade estabelecidos. Após a seleção foram extraídos os seguintes dados dos artigos para análise: (i) espécies e famílias avaliadas pelo teste de Ames, (ii) linhagens empregadas, (iii) utilização ou não do sistema de metabolização exógena (fração S9) e (iv) resultados obtidos. Os dados

extraídos foram plotados em uma tabela previamente definida pelos autores para proceder a discussão destas informações.

3 Resultados e Discussão

A pesquisa nas bases de dados eletrônicas utilizando os termos “*genotoxicity tests*” OR “*mutagenicity tests*” OR “*Ames test*” AND “*medicinal plants*” recuperou 1930 registros. Após a análise destes, com base nos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 293 artigos para compor o banco de dados (Figura 1).

A análise dos 293 artigos selecionados para o banco de dados revelou que no período de 1975 a maio de 2018, 695 espécies de plantas medicinais (Tabela S1) foram avaliadas quanto o seu potencial mutagênico e/ou antimutagênico pelo teste de Ames. Essas espécies compreendem 139 famílias botânicas, sendo as mais frequentes Fabaceae, Asteraceae e Lamiaceae. Estudos etnobotânicos têm demonstrado a importância econômica e medicinal dessas famílias, devido as suas variadas propriedades terapêuticas e aplicações na alimentação e ornamentação (McClatchey et al., 2010; Bieski et al., 2012; Ahmed, 2016; Faruque et al., 2018).

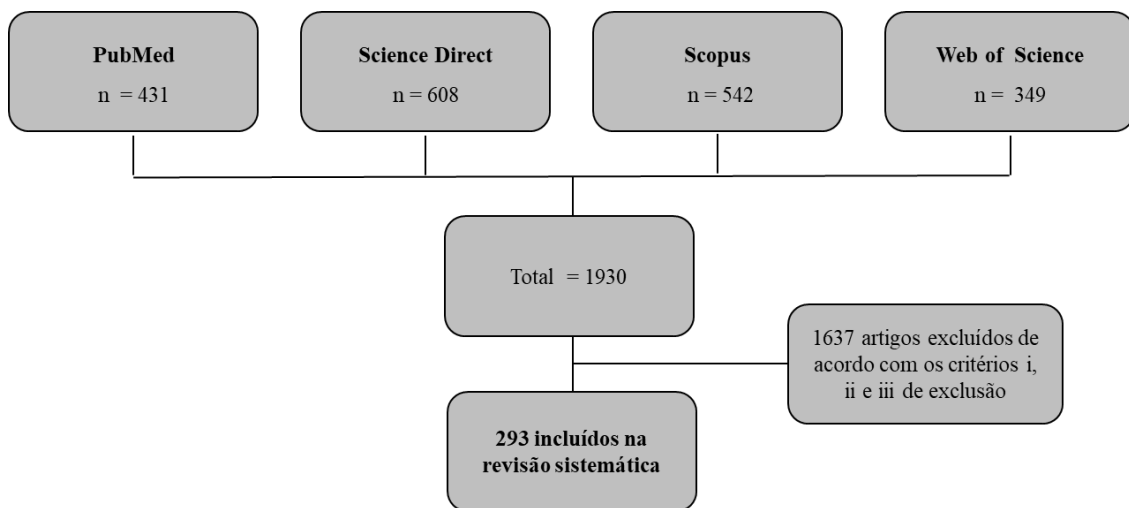


Figura 1: Seleção dos artigos a partir da busca realizada nas bases bibliográficas utilizando os termos “*genotoxicity tests*” OR “*mutagenicity tests*” OR “*Ames test*” AND “*medicinal plants*” no período de 1975 a maio de 2018.

Das espécies avaliadas, 597 não apresentaram potencial mutagênico frente as linhagens, concentrações e frações dos extratos testados (Figura 2). Sendo assim, plantas medicinais com variadas atividades biológicas e popularmente conhecidas, como *Camellia*

sinensis, “chá-da-índia” (Li et al., 2011; Tatsuzaki et al., 2014), *Dipteryx alata*, baru (Esteves-Pedro et al., 2012) e o óleo essencial de *Salvia officinalis* (Vukovic'-Gac'ic' et al., 2006; Ferrer et al., 2009) foram avaliadas pelo teste de Ames e não apresentaram potencial mutagênico, evidenciando a segurança toxicológica quanto aos parâmetros genotóxicos e mutagênicos.

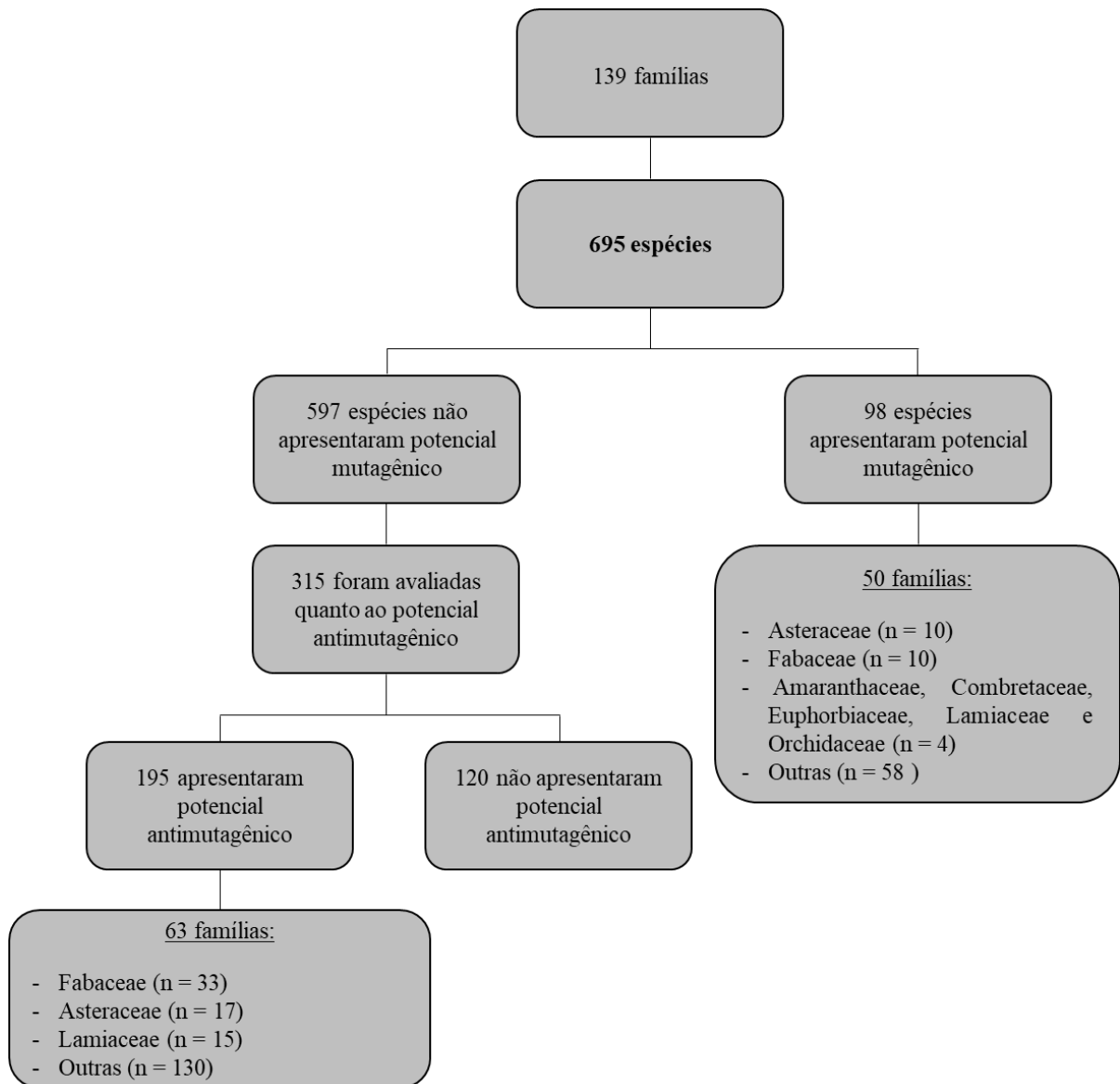


Figura 2: Banco de dados gerado a partir das buscas nas bases de dados eletrônicas, *Medline* (via Pubmed), *Science Direct*, *Scopus* e *Web of Science* no período de 1975 a maio de 2018 utilizando os termos “genotoxicity tests” OR “mutagenicity tests” OR “Ames test” AND “medicinal plants”.

Entre as espécies que não apresentaram potencial mutagênico um número expressivo de plantas, 195 (32%, 195/597), apresentaram potencial antimutagênico, ou seja, espécies que auxiliam na proteção do DNA contra danos provocados por agentes mutagênicos. Essas espécies compreendem 72 famílias botânicas, sendo Fabaceae, Asteraceae e Lamiaceae as mais representativas. A família Lamiaceae merece destaque, pois das 30 espécies avaliadas pelo teste de Ames 14 (46 %) apresentaram potencial antimutagênico.

Lamiaceae possui grande importância econômica, pois compreende a família de especiarias e óleos essenciais muito utilizados na medicina e na culinária como alimentos aromatizantes. As espécies “manjeriço” *Ocimum basilicum* (Lópes et al., 2000; Stajkovic et al., 2007; Beric et al., 2008; Ferrer et al., 2009), “alfavaca” *Ocimum gratissimum* (Obaseiki-Ebor et al., 1993; Gontijo et al., 2014), “orégano” *Origanum vulgare* (Ozbek et al., 2008; Mirzaei et al., 2013) e “hortelã” *Mentha longifolia* (Alkofahi et al., 1990; Al-Ali et al., 2014) são exemplos de especiarias que tiveram o seu potencial antimutagênico evidenciado pelo teste de Ames de acordo com o nosso banco de dados. Essas espécies, além de outras atividades biológicas, são descritas como antioxidantes naturais, sendo que essa atividade está relacionada na maioria das espécies a presença de compostos fenólicos (Makhafola et al., 2016; Guldiken et al., 2018). Assim, nos últimos anos vários trabalhos (Makhafola et al., 2016; Insuan et al., 2017; Ntuli et al., 2018) têm evidenciado os antioxidantes naturais como uma das principais fontes de propriedades antimutagênicas, as quais entre outras características, atuam na eliminação das espécies reativas de oxigênio (ERO) antes que as mesmas reajam com o DNA e causem uma mutação (Ślarczyńska et al., 2014).

Uma vez que a mutagenicidade possui um papel muito importante no processo de carcinogenicidade (Prinsloo et al., 2018), nos últimos anos tem aumentado o número de estudos que visam a busca de produtos naturais com propriedades antimutagênicas a fim de serem incluídos na dieta como alimentos nutraceuticos. Nesse sentido, o teste de Ames é uma ferramenta que pode ser empregada tanto na detecção de compostos potencialmente mutagênicos como também no rastreamento de agentes quimiopreventivos.

3.1 Plantas com potencial mutagênico

A análise dos artigos selecionados revelou que 98 espécies (14%, 98/695) apresentaram potencial mutagênico pelo teste de Ames frente as linhagens, extratos e concentrações testadas (Figura 2). Essas espécies compreendem 50 famílias botânicas, sendo Fabaceae, Asteraceae, Amaranthaceae, Combretaceae, Euphorbiaceae e Orchidaceae as mais representativas.

Dentre essas famílias, Amaranthaceae também merece destaque, uma vez que das seis espécies avaliadas pelo teste de Ames, quatro apresentaram potencial mutagênico nas condições avaliadas. Amaranthaceae compreende a família de ervas e arbustos muito utilizados na alimentação e na medicina popular, como é o caso da “quinoa”, “esfinafre” e “ginseng brasileiro”. No entanto, o nosso banco de dados evidenciou que espécies popularmente conhecidas dessa família apresentaram potencial mutagênico pelo teste de Ames, como o extrato das folhas de *Beta vulgaris* “beterraba” (Alkofahi et al., 1990), extrato das folhas de *Teloxys ambrosioides* “erva de santa maria” (Ferrer et al., 2009) e extrato das raiz de *Pfaffia irsinoides* e folhas de *Pfaffia paniculata* “ginseng brasileiro” (Rivera et al., 1994). A Tabela 1 apresenta a lista completa das espécies que apresentam potencial mutagênico pelo teste de Ames.

As plantas medicinais possuem variadas aplicações, as ervas e especiarias podem ser utilizadas na culinária, bem como no preparo de infusões, decocções, tinturas e banho de assento para o tratamento de doenças com base no conhecimento popular. Além dessas aplicações, as plantas também são usadas como fonte de matéria-prima para o desenvolvimento de fitoterápicos e, por isso são necessários testes que assegurem não só a eficácia e qualidade como também a segurança desses produtos. No entanto, muitas plantas medicinais e fitoterápicos são comercializados como suplementos alimentares e, nestes casos não precisam de registro e supervisão dos órgãos reguladores (Falzon e Balabanova, 2017), expondo a população a produtos que não possuem a sua segurança comprovada por ensaios pré-clínicos e clínicos como os demais medicamentos.

Nesse sentido, além do teste de Ames ser um dos ensaios pré-clínicos requeridos para o registro e comercialização de fitoterápicos, é importante a utilização do mesmo para avaliação de plantas usadas pela medicina popular e na avaliação de suplementos alimentares, a fim de garantir a segurança dos mesmos

Tabela 1: Plantas que apresentaram potencial mutagênico pelo teste de Ames de acordo com a busca nas bases de dados eletrônicas utilizando os termos “*genotoxicity tests*” OR “*mutagenicity tests*” OR “*Ames test*” AND “*medicinal plants*” no período de 1975 a maio de 2018.

Espécie	Família	Parte	Extrato	Linhagem	Ativação metabólica	Concentrações com potencial mutagênico	Referência
<i>Acokanthera oppositifolia</i>	Apocynaceae	R	EM 50%	TA1535	- S9	5000 µg/placa	Aremu et al., 2013
<i>Acacia salicina</i>	Fabaceae	F	EA, EM	TA98, TA102	+ S9	250, 500 µg/placa	Boubaker et al., 2012
<i>Acer tegmentosum</i>	Sapindaceae	NE	EA	TA98	- S9, + S9	5000 µg/placa	Hwang et al., 2013
<i>Achillea falcata</i>	Asteraceae	F	EA	TA98, TA100	- S9	10000 µg/placa	Alkofahi et al., 1990
<i>Alchornea castaneaefolia</i>	Euphorbiaceae	F	EM	TA98	- S9, + S9	14520, 21780, 29040 µg/placa	Santos et al., 2010
<i>Alchornea glandulosa</i>	Euphorbiaceae	F	EM	TA98, TA97a	- S9, + S9	17020, 22700 µg/placa	Santos et al., 2010
<i>Aloe vera</i>	Asphodelaceae	F	EF 50%	TA1537	NE	5000 µg/placa	Ferrer et al., 2009
<i>Anacardium occidentale</i>	Anacardiaceae	F	EE 70%	TA98, TA102	- S9, + S9	560, 830 µg/placa	Konan et al., 2007
<i>Anastatica hierochuntica</i>	Brassicaceae	NE	EA	NE	NE	40, 200 µg/placa	Zin et al., 2018
<i>Anethum graveolens</i>	Apiaceae	NE	EM	TA98	- S9, + S9	780, 1560, 3130, 6250, 12500, 25000 µg/placa	Abudayyak et al., 2015
<i>Ansellia africana</i>	Orchidaceae	F, H, R	EDC, EE	TA98	- S9	50, 500, 5000 µg/placa	Chinsamy et al., 2014
<i>Aristolochia manshuriensis</i>	Aristolochiaceae	H	EA	TA98, TA100, TA1537	- S9, + S9	313, 625, 1250, 2500, 5000 µg/placa	Hwang et al., 2012
<i>Arrabidaea brachypoda</i>	Bignoniaceae	F, R, T	EHE	TA98	- S9, + S9	12000, 18000, 24000 µg/placa	Resende et al., 2017
<i>Baccharis anomala</i>	Asteraceae	F	EE 90%	TA98	+ S9	100000 µg/placa de material seco	Alice et al., 1991
<i>Balanites aegyptiaca</i>	Cucurbitaceae	F	EE 95%	TA98, TA100	- S9	10000 µg/placa	Alkofahi et al., 1990
<i>Barlerii randii</i>	Acanthaceae	PLT	EA	TA102	- S9, + S9	70, 80 µL/placa	Sohni et al., 2000
<i>Bathysa cuspidata</i>	Rubiaceae	CCC, F	EE	TA100	- S9, + S9	510, 2000, 4000 µg/placa	Sánchez-Lamar et al., 2008, Gontijo et al., 2012

<i>Bauhinia forficata</i>	Fabaceae	F, FL	EA	TA98, TA100	- S9, + S9	5000 µg/placa, extrato puro (liquido)	Bresolin e Vargas, 1993, Rivera et al., 1994
<i>Beta vulgaris</i>	Amaranthaceae	F	EE	TA98, TA100	- S9	10000 µg/placa	Alkofahi et al., 1990
<i>Brosimum gaudichaudii</i>	Moraceae	R	EM	TA100, TA102	- S9, + S9	3370, 6750, 10120, 13500, 20250 µg/placa	Varanda et al., 2012
<i>Bulbophyllum scaberulum</i>	Orchidaceae	R	EE	TA98	- S9	500, 5000 µg/placa	Chinsamy et al., 2014
<i>Byrsonima coccolobifolia</i>	Malpighiaceae	F	EHE	TA98	- S9, + S9	2000, 4000, 8000, 16000 µg/placa	Espanha et al., 2014
<i>Byrsonima Crassa</i>	Malpighiaceae	F	EM	TA98	- S9	15900, 21200 µg/placa	Cardoso et al., 2006
<i>Byrsonima ligustrifolia</i>	Malpighiaceae	F	EHE	TA98	- S9	13500 e 18000 µg/placa	Espanha et al., 2014
<i>Carthamus tinctorius</i>	Asteraceae	NE	EA	TA98	- S9	780, 1560, 3130, 6250, 12500 e 25000 µg/placa	Abudayyak et al., 2015
<i>Catharanthus roseus</i>	Apocynaceae	F	EDC, EM 90%	TA98	+ S9	50, 500, 5000 µg/placa	Elgorashi et al., 2013
<i>Cecropia pachystachya</i>	Urticaceae	F	EA	TA97a, TA102	- S9	2000 e 5000 µg/placa	Mendonça et al., 2016
<i>Ceratonia siliqua</i>	Fabaceae	F	EE 95%	TA98, TA100	- S9	10000 µg/placa	Alkofahi et al., 1990
<i>Chaetacme aristata</i>	Ulmaceae	F	EDC	TA98	- S9	50 µg/placa	Elgorashi et al., 2013
<i>Citrullus colocynthis</i>	Cucurbitaceae	F	EE 95%	TA98, TA100	- S9	10000 µg/placa	Alkofahi et al., 1990
<i>Citrus aurantium</i>	Rutaceae	F	EA	TA98	- S9	780, 1560, 3130, 6250, 12500 e 25000 µg/placa	Abudayyak et al., 2015
<i>Cocos nucifera</i>	Arecaceae	NE	EC	TA98	- S9	780, 1560, 3130, 6250, 12500 e 25000 µg/placa	Abudayyak et al., 2015
<i>Combretum erythrophyllum</i>	Combretaceae	R	EA	TA100, TA102	- S9, + S9	50, 60, 70, 80 µL/placa	Sohni et al., 1994
<i>Combretum mkhzenze</i>	Combretaceae	G	EDC	TA98	+ S9	5000 µg/placa	Elgorashi et al., 2013

<i>Coriandrum sativum</i>	Apiaceae	F	EA	TA97a, TA98, TA102	- S9, + S9	0.8 a 8 µg/placa	Reyes et al., 2010
<i>Coutarea hexandra</i>	Rubiaceae	F	EE	TA98	+ S9	4120, 8250 e 16500 µg/placa	Nunes et al., 2012
<i>Crataegus oxyacantha</i>	Rosaceae	FR	EM	TA98	+ S9	2.5, 5, 10, 100, 250, 500 µg/plate	Quadros et al., 2017
<i>Crinum macowanii</i>	Amaryllidaceae	B	EDC	TA98	- S9, + S9	500, 5000 µg/placa	Elgorashi et al., 2013
<i>Crotalaria pallida</i>	Fabaceae	F	EE 70%	TA98	- S9	9000 e 13500 µg/placa	Boldrin et al., 2013
<i>Croton lechleri</i>	Euphorbiaceae	SV	EA	TA98, TA1535	- S9, + S9	10, 30, 50, 80 uL/mL	Rossi et al., 2013
<i>Cymbopogon citratus</i>	Poaceae	F	EA	TA104	- S9	Extrato puro (liquido)	Rivera et al., 1994
<i>Daphne linearifolia</i>	Thymelaeaceae	F, H	EE 95%	TA98, TA100	- S9	10000 µg/placa	Alkofahi et al., 1990
<i>Davilla elliptica</i>	Dilleniaceae	F	EM, EM 80%	TA97a, TA98	+ S9, - S9	1000, 8400 µg/placa	Biso et al., 2010
<i>Davilla nitida</i>	Dilleniaceae	F	EM, EM 80%	TA97a, TA98	+ S9, - S9	500 a 13000 µg/placa	Biso et al., 2010
<i>Diospyros whyteana</i>	Ebenaceae	F	EDC	TA98	+ S9	50 µg/placa	Elgorashi et al., 2013
<i>Echinodorus macrophyllus</i>	Alismataceae	F	EA	TA98	- S9	150000 µg/placa	Vidal et al., 2010
<i>Ekebergia capensis</i>	Meliaceae	C	EA	TA98	+ S9	50, 5000 µg/placa	Mulaudzi et al., 2013
<i>Eriocaulon ligulatum</i>	Eriocaulaceae	CP	EM, EDC	TA97a, TA98, TA100, TA102	- S9, + S9	2300 µg/placa	Silva et al., 2007
<i>Eulophia petersii</i>	Orchidaceae	F, PB	EDC, EEP	TA98	- S9	500, 5000 µg/placa	Chinsamy et al., 2014
<i>Gnaphalium sp.</i>	Asteraceae	I	EDC:EM	TA98	- S9, + S9	250, 500, 1000 µg/placa	Déciga-Campos et al., 2007
<i>Gnidia kraussiana</i>	Thymelaeaceae	R	EA	TA102	- S9, + S9	70, 80 uL/mL	Sohni et al., 1998
<i>Helichrysum herbaceum</i>	Asteraceae	PLT	EM, EM 90%	TA98	+ S9	5000 µg/placa	Reid et al., 2006
<i>Helichrysum rugulosum</i>	Asteraceae	PLT	EM 90%	TA98	+ S9	5000 µg/placa	Reid et al., 2006
<i>Helichrysum simillimum</i>	Asteraceae	PLT	EM 90%	TA98, TA100	- S9, + S9	50, 500, 5000 µg/placa	Reid et al., 2006, Verschaeve e Van Staden, 2008
<i>Hidrocotyle asiatica</i>	Araliaceae	PLT	EA	TA98	+ S9	Extrato puro (liquido)	Rivera et al., 1994

<i>Indigofera suffruticosa</i>	Fabaceae	F	EF 30%, EHE	TA98, TA1535 e TA1537	- S9, + S9	500, 1500, 5000 µg/placa	Ferrer et al., 2009
<i>Kalanchoe laciniata</i>	Crassulaceae	PLT	EH, EM 70%	TA98, TA102	- S9, + S9	9375, 18750, 37500, 75000, 150000 µg/placa	Sharif et al., 2017
<i>Limonium globuliferum</i>	Plumbaginaceae	C, F, R	EA, EM	TA100, TA98	- S9	0,1, 1, 100, 1000, 10000 µg/placa	Eren et al., 2006, Eren e Ozata, 2014
<i>Luehea divaricata</i>	Malvaceae	F	EE 90%	TA98	+ S9	100000 µg/placa de material seco	Alice et al., 1991
<i>Melissa officinalis</i>	Lamiaceae	NE	EA	TA98, TA100	- S9, + S9	780, 1560, 3130, 6250, 12500 e 25000 µg/placa	Abudayyak et al., 2015
<i>Mentha longifolia</i>	Lamiaceae	F	EA 95%	TA98, TA100	- S9	10000 µg/placa	Alkofahi et al., 1990
<i>Mimosa bimucronata</i>	Fabaceae	F	EA	TA98, TA102	+ S9	5000 µg/placa	Bresolin e Vargas, 1993
<i>Moringa oleifera</i>	Moringaceae	S	EA	TA97a, TA98, TA100, TA102	- S9, + S9	0,6, 0,8, 1 e 1,5 µg/placa	Rolim et al., 2011
<i>Nigella arvensis</i>	Ranunculaceae	NE	EC	TA98	- S9	780, 1560, 3130, 6250, 12500 e 25000 µg/placa	Abudayyak et al., 2015
<i>Ocimum basilicum</i>	Lamiaceae	F	EF 70%, EE 70%	TA98, TA100, TA1535	- S9, + S9	50, 150, 500, 1500, 5000 µg/placa	García-Lopez, 2000, Ferrer et al., 2009
<i>Ocotea duckei</i>	Lauraceae	F	EHE	TA97a, TA102	- S9, + S9	12000, 24000, 48000 µg/placa	Marques et al., 2003
<i>Paullinia cupana</i>	Sapindaceae	S	EA	TA97a	- S9	30000 µg/placa	Fonseca et al., 1994
<i>Peganum harmala</i>	Nitrariaceae	F, H	EE 95%	TA98, TA100	- S9	10000 µg/placa	Alkofahi et al., 1990
<i>Pfaffia iresinoides</i>	Amaranthaceae	R	EA	TA98	- S9	Extrato puro (liquido)	Rivera et al., 1994
<i>Pfaffia paniculata</i>	Amaranthaceae	F	EA	TA100	- S9, + S9	Extrato puro (liquido)	Rivera et al., 1994
<i>Phyllanthus tenellus</i>	Phyllanthaceae	F	EA	TA98, TA104	- S9, + S9	Extrato puro (liquido)	Rivera et al., 1994
<i>Plathymenia reticulata</i>	Fabaceae	C	EHE	TA98	- S9	17060 e 19900 µg/placa	Della Torre et al., 2011
<i>Plumbago auriculata</i>	Plumbaginaceae	F	EDC	TA98	+ S9	50 µg/placa	Elgorashi et al., 2013
<i>Pouteria torta</i>	Sapotaceae	F	EHE	TA97a, TA98	- S9	5000 µg/placa	Costa et al., 2014

<i>Prunus mahaleb</i>	Rosaceae	NE	EA	TA100	+ S9	780, 1560, 3130, 6250, 12500, 25000 µg/placa	Abudayyak et al., 2015
<i>Qualea grandiflora</i>	Vochysiaceae	C	EC, EM, EA	TA97a, TA98, TA100, TA102	- S9, + S9	1920, 3850, 7700, 11550, 15400 µg/placa	Santos et al., 2011
<i>Qualea multiflora</i>	Vochysiaceae	C	EA, EC, EM	TA100	- S9, + S9	1250, 12450, 16600, 18100 µg/placa	Santos et al., 2011
<i>Retama raetam</i>	Fabaceae	FL, FR	EAC, EM	TA100, TA104, TA1538	- S9	NE	Edziri et al., 2011, 201
<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	C, F, FR, R, S	EM	TA98, TA100	- S9	50 µg/placa	Abbas et al., 2018
<i>Ruta graveolus</i>	Rutaceae	F	EF 70%	NE	NE	5000 µg/placa	Ferrer et al., 2009
<i>Sambucus australis</i>	Adoxaceae	FL	EA	TA98	+ S9	5000 µg/placa	Bresolin e Vargas, 1993
<i>Saussurea lappa</i>	Asteraceae	NE	EEP	TA98	- S9	NE	Riazuddin et al., 1987
<i>Senecio vernalis</i>	Asteraceae	F	EE 95%	TA98, TA100	- S9	10000 µg/placa	Alkofahi et al., 1990
<i>Senna alata</i>	Fabaceae	PLT	EM	TA98, TA1537	+ S9	625, 2500, 5000 µg/placa	Hong e Lyu, 2011
<i>Skimmia laureola</i>	Rutaceae	NE	EEP	TA98	- S9	NE	Riazuddin et al., 1987
<i>Solidago microglossa</i>	Asteraceae	PLT	EA	TA97a, TA98	- S9, + S9	Extrato puro (liquido)	Rivera et al., 1994
<i>Strychnos pseudoquina</i>	Loganiaceae	F	EM	TA98, TA100	- S9, + S9	19950, 26600 µg/placa	Santos et al., 2006
<i>Swertia chirayita</i>	Gentianaceae	NE	EEP	TA98	- S9	NE	Riazuddin et al., 1987
<i>Tapirira guianensis</i>	Anacardiaceae	F	EHE	TA98, TA100	- S9, + S9	4,25, 8,67, 16,68, 24,09, 30,97 µg/mL	Silva-Oliveira et al., 2016
<i>Teloxys ambrosioides</i>	Amaranthaceae	F	EF 60%	TA98, TA100, TA1537	NE	5000 µg/placa	Ferrer et al., 2009
<i>Terminalia catappa</i>	Combretaceae	F	EHE	TA97a, TA100	- S9	16680, 22240 µg/placa	Mininel et al., 2014
<i>Terminalia citrina</i>	Combretaceae	FR	EA, EE	TA100, TA102	- S9	15, 150, 1500, 15000, 150000 µg/placa	Akhtar et al., 2016

<i>Teucrium polium</i>	Lamiaceae	F	EE 95%	TA98, TA100	- S9	10000 µg/placa	Alkofahi et al., 1990
<i>Thermopsis turcica</i>	Fabaceae	C, F, FL, R	EA	TA98, TA100, TA102	- S9, + S9	0,375, 3,75, 375, 3750 µg/placa	Liman et al., 2012
<i>Tridactyle tridentata</i>	Orchidaceae	R	EE	TA98	+ S9	50, 500 µg/placa	Chinsamy et al., 2014
<i>Valeriana procera</i>	Caprifoliaceae	R, RZ	EDC:EM	TA100	+ S9	500 µg/placa	Déciga-Campos et al., 2007
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	NE	EA	TA98	+ S9	780, 1560, 3130, 6250, 12500, 25000 µg/placa	Abudayyak et al., 2015
<i>Ziziphus mucronata</i>	Rhamnaceae	G	EM 90%	TA98	+ S9	5000 µg/placa	Elgorashi et al., 2013

Partes das plantas: B - bulbo, C - caule, CC - casca, CCC - casca do caule, CP - capitulo, F - folha, FL - flor, FR - fruto, G - galho, H - haste, I - inflorescência, PB - pseudobulbo, PLT - toda planta, R - raiz, RZ - rizoma, S - semente, SV - seiva, T - talo.

Extrato: EA - extrato aquoso, EAC - extrato acetato de etila, EC - extrato clorofórmico, EDC - extrato diclorometano, EE - extrato etanólico, EEP - extrato éter petróleo, EF - extrato fluido, EHE - extrato hidroalcoólico, EH - extrato hexâmico, EM - extrato metanólico, OE - óleo essencial.

NE - não especificado.

3.1.1 Características das plantas com potencial mutagênico

É sabido que as plantas apresentam substâncias bioativas que são responsáveis pelas suas propriedades terapêuticas, no entanto a presença de determinados metabólitos bem como a sua ação sinérgica podem desencadear efeitos tóxicos, como carcinogênico, genotóxico, mutagênico, neurotóxico, teratogênico, citotóxico, nefrotóxico e hepatotóxico (Abudayyak et al., 2015; Guldiken et al., 2018).

Alguns autores relacionam o potencial mutagênico a presença de alguns fitoquímicos. Nesse sentido, nossos dados evidenciaram que a presença de determinadas classes de metabólitos secundários, como os alcalóides e compostos fenólicos tiveram relação com o potencial mutagênico das plantas (Cardoso et al., 2006). Os compostos fenólicos são fitoquímicos abundantes nas plantas e que são sintetizados, principalmente, pelas vias do ácido chiquímico e dos fenilpropanoides. Esses compostos são divididos em subgrupos, como flavonoides, ácidos fenólicos e taninos (Singh et al., 2017) que estão presentes em várias plantas que apresentaram potencial mutagênico.

Santos et al. (2010) verificaram que o potencial mutagênico do extrato metanólico das folhas de *Alchornea castaneaefolia* e *Alchornea glandulosa* frente as linhagens TA97a e TA98 está relacionado a presença dos flavonoides quercetina e amentoflavona presentes em ambas as espécies. A quercetina também foi indicada como agente mutagênico para a linhagem TA98 nas espécies *Davilla nítida*, *Davilla elliptica* (Biso et al., 2010), *Byrsonima coccolobifolia* e *Byrsonima ligustrifolia* (Espanha et al., 2014). Resende et al. (2012) em um estudo sobre o potencial mutagênico de diferentes flavonoides evidenciaram que a quercetina mostrou maior atividade mutagênica sobre a linhagem TA98 na presença e ausência de ativação metabólica, sendo assim esse flavonoide pode ser considerado um mutágeno de ação direta e indireta que causa deslocamento do quadro de leitura.

Além dos flavonoides, os ácidos fenólicos e os taninos também estão presentes em várias plantas com potencial mutagênico. Como pode ser observado nos artigos selecionados, as espécies *Melissa officinalis* (Abudayyak et al., 2015) e *Terminalia catappa* (Mininel et al., 2014) também apresentarem potencial mutagênico e o mesmo foi relacionado aos teores do ácido caféico e taninos, respectivamente. Já as espécies *Ocotea duckei* (Marques et al., 2003) e *Coutarea hexandra* (Nunes et al., 2012), tiveram o seu potencial mutagênico relacionado aos teores dos alcalóides, além dos compostos fenólicos.

Apesar de alguns ensaios terem associado o potencial mutagênico a presença de compostos fitoquímicos, nós não conseguimos fazer uma relação direta entre esses dois

parâmetros, uma vez que nem todas as plantas apresentaram potencial mutagênico na presença de flavonóides e ácidos fenólicos, como descrito acima. Nesse contexto, vários estudos têm buscado compreender as causas do potencial mutagênico dos fitoquímicos presentes nas plantas (Bode e Dong et al., 2015; Bancali et al., 2017). Dados da literatura indicam que além da questão estrutural dos compostos, como no caso dos flavonoides, muitos fitoquímicos são mutagênicos e/ou carcinogênicos, pois geram espécies reativas de oxigênio que causam danos oxidativos nas estruturas celulares e biomoléculas, tais como ácidos nucléicos, lipídios e proteínas (Castro et al., 2001; Makhafola et al., 2016).

Assim, mesmo com o avanço das pesquisas é difícil inferir sobre a real causa do potencial mutagênico das plantas medicinais, uma vez que a composição fitoquímica das mesmas é muito complexa e variável. Outro fator importante que deve ser levado em consideração é que a mistura dos metabólitos secundários nas preparações terapêuticas pode levar a um efeito aditivo, sinérgico ou antagonista (Rivera et al., 1994).

3.1.2 Características das linhagens

O teste de Ames pode ser realizado com uma variedade de linhagens de *S. Typhimurium* e *E. coli*, porém as mesmas devem ser escolhidas com base nas recomendações dos órgãos reguladores. Os artigos analisados utilizaram uma série de linhagens para avaliar os extratos de plantas, sendo que ao todo foram utilizadas 10 linhagens com combinações variadas em cada trabalho. As linhagens TA98 (86 %, 616/695), TA100 (76 %, 535/695) e TA1535 (26%, 187/695) foram utilizadas com maior frequência nos artigos que compõem o banco de dados (Figura 3). De uma maneira geral, a TA98 e a TA100 também são as linhagens mais utilizadas na avaliação do potencial mutagênico de amostras ambientais, como água, ar e sedimento. De acordo com regulamentações internacionais, como a ISO 16240:2005(E), ensaios preliminares que avaliam o potencial mutagênico de amostras ambientais podem ser realizados apenas com as linhagens TA98 e TA100 (- S9 / + S9), que detectam respectivamente, *frameshift* e substituição de pares de bases, uma vez que as mesmas são capazes de detectar a maioria dos compostos mutagênicos (Umbuzeiro e Zeiger, 2017).

Nesse sentido, a expressiva utilização das linhagens TA98 e TA100 na avaliação do potencial mutagênico de plantas medicinais deve estar relacionada a justificativa da utilização das mesmas em amostras ambientais.

Quando analisamos somente as 98 espécies que apresentaram potencial mutagênico, também observamos que as linhagens a TA98 e a TA100 detectaram o potencial mutagênico em um maior número de plantas medicinais, 79% (78/98) e 34% (34/98), respectivamente (Figura 4).

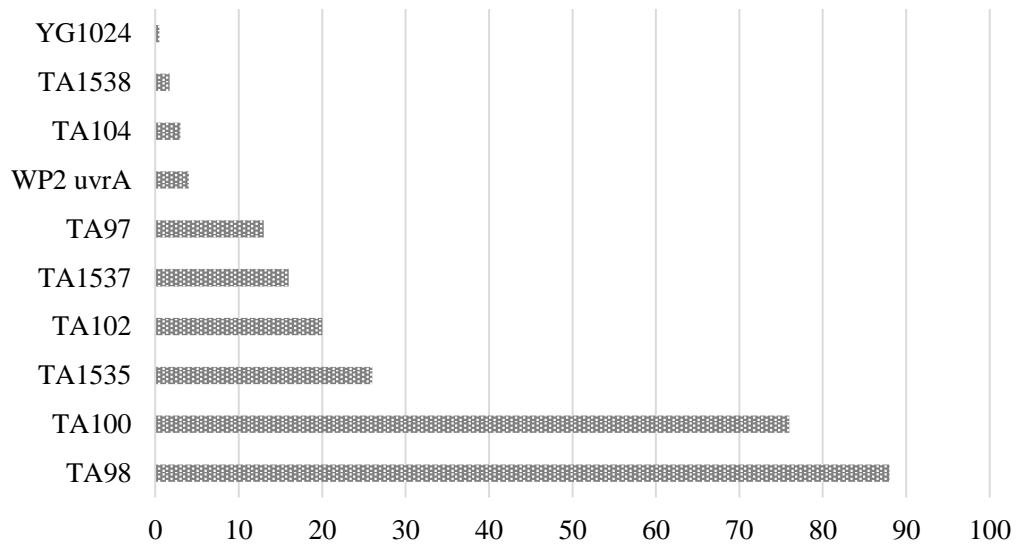


Figura 3: Percentual de plantas avaliadas frente as linhagens de *S. Typhimurium* TA97a, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1537, TA1538, YG1024 e *E. coli* WP2 uvrA pelo teste de Ames.

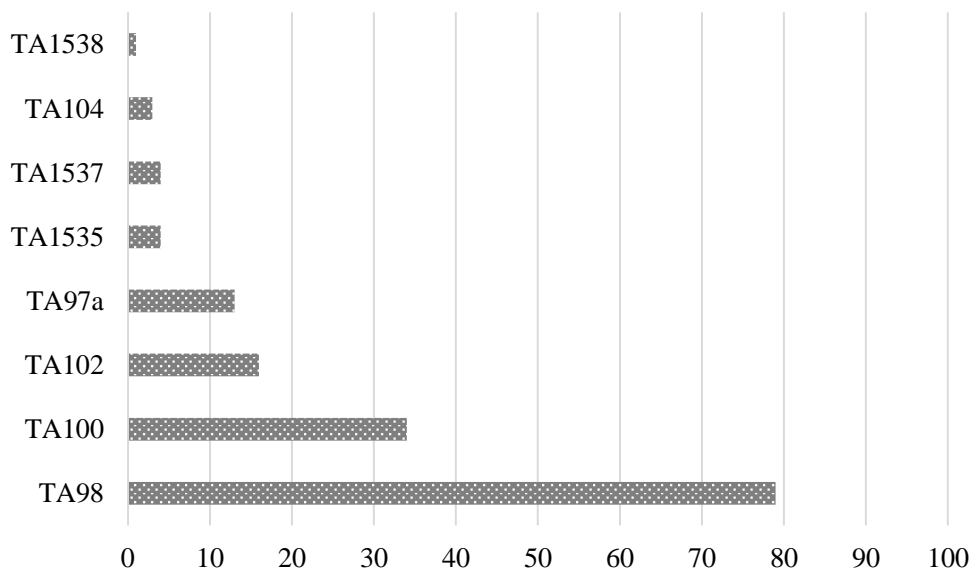


Figura 4: Percentual de plantas com potencial mutagênico detectado pelas linhagens de *S. Typhimurium* TA97a, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1537 e TA1538.

O registro dos fitoterápicos segue os mesmos critérios estabelecidos para o desenvolvimento de novos medicamentos, sendo assim, as diretrizes da Anvisa, EMA e FDA, recomendam que o teste de Ames seja realizado com cinco linhagens para se obter resultados confiáveis sobre a amostra analisada, uma vez que a combinação dessas linhagens permite detectar mudanças nos sítios guanina-citosina (G-C) e adenina-timina (A-T).

Um teste padrão de Ames deve incluir as seguintes linhagens: (i) *S. Typhimurium* TA1535 e (ii) *S. Typhimurium* TA100 que detectam substituição de pares de bases, leucina (GAG/CTC) por prolina (GGG/CCC); (iii) *S. Typhimurium* TA97a (ou TA 97, ou TA1537), detecta mutações *frameshift* (+1C) próximo a sequência repetitiva de 6 citosinas (-C-C-C-C-C-C-); (iv) *S. Typhimurium* TA98, detecta mutações *frameshift* (-1C) que afeta a leitura de uma sequência próxima de resíduos GC (-C-G-C-G-C-G-C-G-); (v) *S. Typhimurium* TA102 (ou *E. coli* WP2uvrA ou *E. coli* WP2uvrA (pKM101) detecta mutação do tipo *ocre*, TAA, que pode ser revertida por todas as 6 possíveis substituições de pares de bases levando a transições e transversões (Maron and Ames, 1983; Mortelmans and Zeiger, 2000; Escobar et al., 2013). Além dessas características as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 possuem o plasmídeo pKM101 que carrega o gene *mucAB*, responsável pelo aumento do sistema de reparo do tipo *error-prone* (passível de erro). A TA102 possui um plasmídeo adicional, paQ1, que confere a linhagem uma ampliação do número de sítios específicos para a mutagênese.

Assim, para a realização do teste de Ames deve ser escolhida cinco linhagens com base nas características citadas acima, sendo permitida a substituição de algumas linhagens por suas homólogas, como é o caso da TA97a que pode ser substituída pela TA97a e pela TA1537, por exemplo.

Entre as espécies vegetais que compõe o nosso banco de dados, apenas 8% (55/695) foram avaliadas com as cinco linhagens recomendadas. Nesse sentido, caso todas as espécies tivessem sido avaliadas conforme as diretrizes dos órgãos reguladores, o número de espécies com potencial mutagênico poderia ser maior, uma vez que as linhagens detectam diferentes mutações.

Em relação as 98 espécies que apresentaram potencial mutagênico, apenas seis foram testadas frente as cinco linhagens, conforme as diretrizes dos órgãos reguladores. A TA98 detectou potencial mutagênico em quatro das seis espécies, seguida das linhagens TA97a, TA1537, TA102 e TA100 que detectaram o potencial mutagênico em duas espécies cada (Figura 5). As linhagens TA98, TA97a e a sua homóloga TA1537 podem ser consideradas mais sensíveis, pois detectaram um maior número de espécies mutagênicas quando comparadas com a sua frequência de utilização.

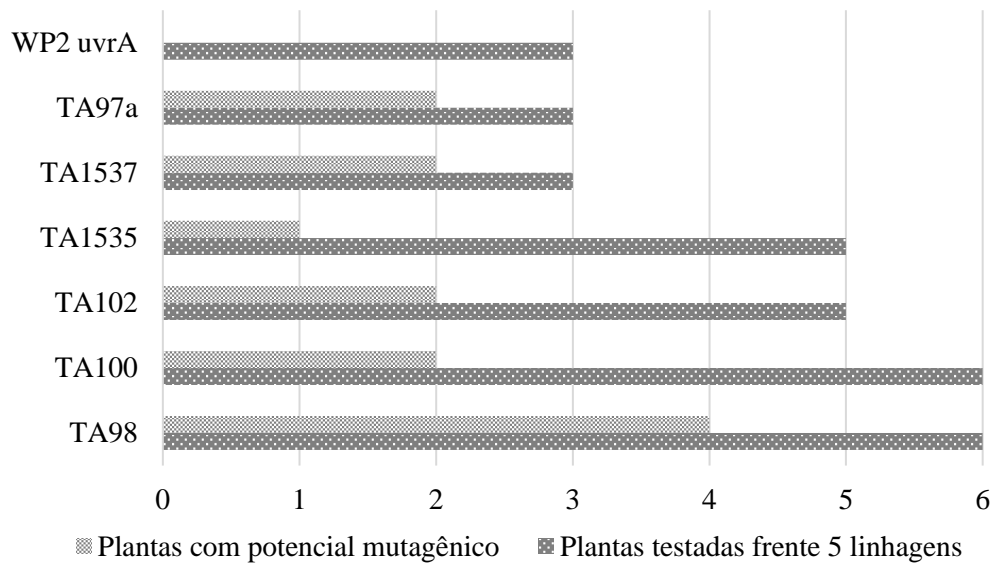


Figura 5: Relação entre as seis espécies avaliadas frente a uma sequência de 5 linhagens e a frequência de plantas que tiveram o potencial mutagênico detectado por essas linhagens

Com base nesses resultados e na avaliação das características genotípicas das linhagens é possível observar que a utilização de cinco linhagens para a avaliação dos extratos é de suma importância mesmo em testes para comprovação da segurança para utilização na medicina popular, uma vez que apesar das linhagens detectarem dois tipos de mutações, substituição de pares de bases e deslocamento do quadro de leitura, as mesmas detectam mutações em diferentes locais do material genético.

Na literatura não existe recomendação para o uso de um número inferior de linhagens, porém a maioria dos trabalhos utilizaram de duas a três linhagens de *S. Typhimurium*. Escobar et al., (2013) analisaram o banco de dados de produtos químicos não medicamentosos e verificaram que as linhagens TA97a e TA1535 foram mais sensíveis na detecção do potencial mutagênico.

Neste contexto, com base na correlação entre a frequência de utilização das linhagens (Figura 3) com a frequência na detecção do potencial mutagênico (Figura 4), bem como na análise das espécies avaliadas frente às cinco linhagens (Figura 6) é possível verificar que as linhagens TA98, TA97a ou TA1537 e TA102 foram mais sensíveis na detecção do potencial mutagênico das plantas analisadas. Assim, mesmo sendo difícil de inferir quais são às linhagens mais sensíveis com base nesses dados, é possível destacar a utilização das linhagens TA98 e TA97a para detecção mutágenos que provocam o deslocamento do quadro de leitura e da

TA102 para detecção de mutágenos que causam a substituição de pares bases em ensaios de mutagenicidade com plantas medicinais.

3.1.3 Sistema de metabolização exógena

A utilização do sistema de metabolização exógena permite a detecção de mutágenos de ação direta e indireta, uma vez que alguns compostos só passam a ser mutagênicos após o processo de metabolização realizado pelas enzimas do fígado, no entanto outros não precisam ser metabolizados para se tornarem potencialmente mutagênicos (Ames et al., 1973b; Umbuzeiro e Zeiger, 2017).

A análise do banco de dados evidenciou que 63% (439/695) das plantas foram avaliadas na presença e ausência de sistema de metabolização exógena. Na Figura 6 é possível observar que das 98 espécies que apresentaram potencial mutagênico, 77 foram avaliadas na presença e ausência da fração S9, sendo que dessas 36 foram mutagênicas diante dos dois sistemas (-S9 e +S9), como por exemplo as espécies *Croton lechleri* (Rossi et al., 2013), *Davilla nítida* (Biso et al., 2010) e *Eriocaulon ligulatum* (da Silva et al., 2007).

Em contrapartida, dessas 77 espécies, 25 foram mutagênicas só na presença da fração S9, como por exemplo, *Davilla elliptica* (Biso et al., 2010), *Senna alata* (Hong e Lyu, 2011) e *Valeriana procera* (Deciga-Campos et al., 2007) e 19 espécies foram mutagênicas só na ausência da fração S9, como por exemplo *Ansellia africana* (Chinsamy et al., 2014), *Cecropia pachystachya* (Mendonça et al., 2016) e *Crotalaria pallida* (Boldrin et al., 2013). Esses dados demonstram a importância da realização dos ensaios na presença e ausência do sistema de metabolização exógena.

Entre as 98 espécies que apresentaram potencial mutagenico, 17 foram avaliadas somente na ausência da fração S9, sendo que as mesmas poderiam apresentar potencial mutagênico na presença da fração caso tivessem sido avaliadas com e sem sistema de metabolização exógena.

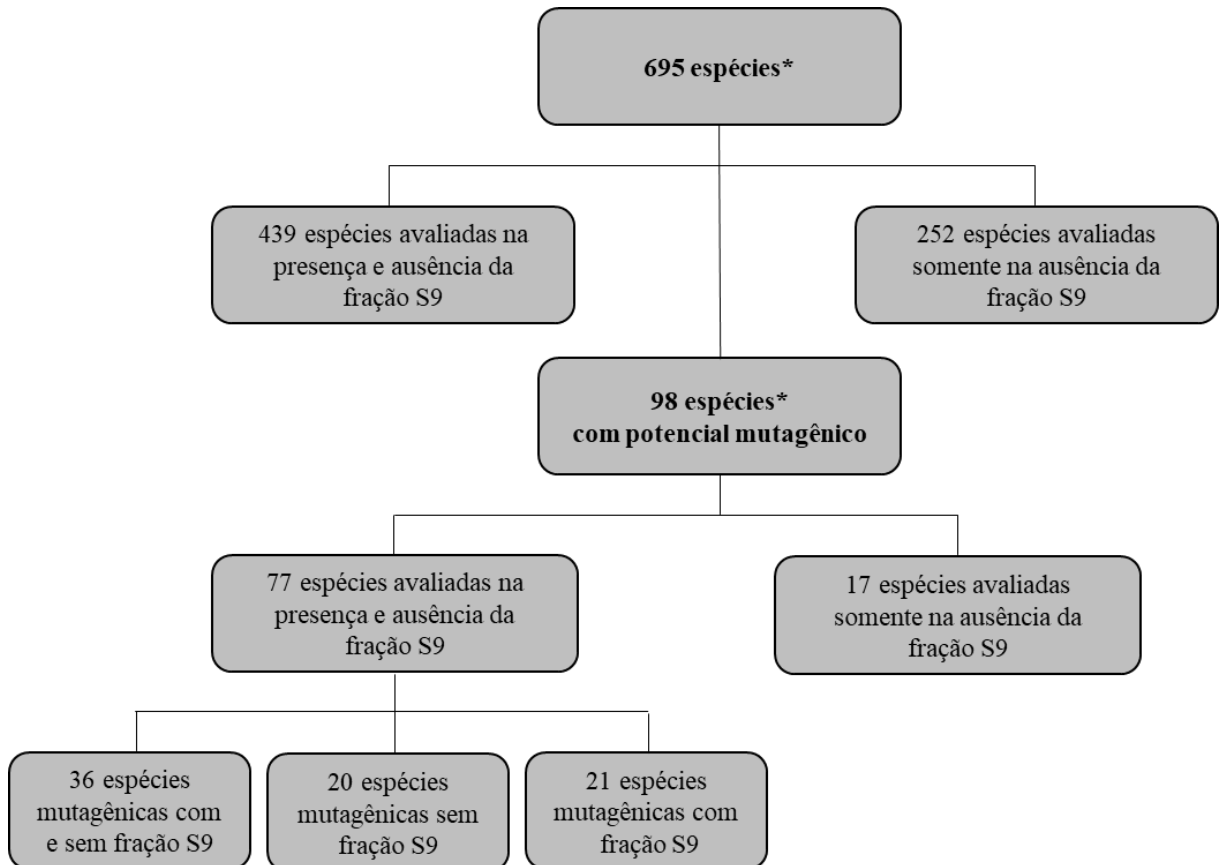


Figura 6: Frequência das plantas que apresentaram potencial mutagênico em função da utilização do sistema de metabolização exógena (fração S9). *4 plantas não tiveram os dados de utilização da fração S9 disponibilizados nos artigos.

Nesse sentido, para garantir a segurança quanto o potencial mutagênico, o ideal é que todas as plantas sejam avaliadas na presença e ausência do sistema de metabolização, para se obter resultados confiáveis.

O teste de Ames é considerado na literatura como um ensaio relativamente simples e rápido (Escobar et al., 2013), porém a realização do ensaio na presença da fração S9 envolve um custo maior, pois além da aquisição do homogenato de fígado de rato é necessária a utilização de cofatores como a glicose 6-fosfato e β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) que auxiliam na ativação das enzimas de metabolização. Assim, uma das hipóteses para presença de trabalhos que realizam os ensaios sem a fração S9 é o valor agregado ao ensaio devido a utilização desse sistema.

Assim, para que uma planta medicinal seja considerada segura para o consumo ou para produção de um fitoterápico é necessário que o teste de Ames seja realizado de acordo com as

diretrizes preconizadas, ou seja, na presença ou ausência de um sistema de metabolização exógena.

Conclusões

O teste de Ames é um ensaio amplamente empregado para a detecção do potencial mutagênico e antimutagênico de plantas medicinais com diversas atividade biológicas, podendo ser utilizado como uma ferramenta de rastreio ou como parte da bateria de ensaios pré-clínicos no processo de desenvolvimento de novos medicamentos.

Várias espécies demonstraram atividade antimutagênica quando avaliadas pelo teste de Ames. A família Lamiaceae se destacou, pois apresentou um número expressivo de espécies com essa atividade.

Plantas medicinais popularmente conhecidas como, as folhas de *Beta vulgaris* “beterraba”, folhas de *Teloxys ambrosioides* “erva de santa maria”, raiz de *Pfaffia iresinoides* e raiz de *Pfaffia paniculata* apresentaram potencial mutagênico pelo teste de Ames.

As linhagens TA98, TA97a e TA102 foram as mais sensíveis, uma vez que detectaram um maior número de plantas com potencial mutagênico. Assim, de acordo com o nosso banco de dados as linhagens TA98 e TA97a seriam mais recomendadas para detecção de mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura e a TA102 para detecção de mutágenos que causam substituição de pares de bases.

A maioria das pesquisas analisadas são referentes a estudos de triagem, e por isso não utilizaram as cinco linhagens, conforme as diretrizes dos órgãos reguladores. Porém, essa prática não garante uma segurança quanto ao potencial mutagênico, uma vez que cada linhagem possui uma especificidade. Por isso, sugere-se que sejam realizados estudos que confirmem quais linhagens são mais sensíveis para ensaios de triagem de plantas medicinais utilizadas pela medicina popular nos casos da impossibilidade de testar com as cinco linhagens.

A realização do teste de Ames na presença e ausência do sistema de metabolização exógena também se faz de extrema importância para detecção dos mutágenos de ação direta e indireta, assim os ensaios realizados na ausência desses dois sistemas compromete os resultados obtidos e conseqüentemente a segurança das plantas avaliadas.

Os resultados do teste de Ames são altamente preditivos com os ensaios de mutagenicidade *in vivo* e por isso, são considerados o suficiente para dar suporte a todos os estudos de genotoxicidade pré-clínicos de administração única, portanto nestes casos não é preciso a realização de outros ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade conforme preconizado. Porém, para que esse objetivo seja alcançado é necessária a interpretação correta

das diretrizes das agências que regulamentam o desenvolvimento de novos medicamentos, a fim de garantir não só a eficácia e qualidade, mas também a segurança dos ensaios pré-clínicos.

Nesse sentido, é importante que os estudos de triagem do potencial mutagênico de plantas medicinais, realizados na maioria das vezes por grupos de pesquisas nas universidades, obedeçam às diretrizes para o desenvolvimento de fitoterápicos para que os resultados gerados sejam transmitidos para a população de maneira a garantir a segurança no uso das plantas utilizadas.

Referências

- Abbas, M., Ali, A., Arshad, M., Atta, A., Mehmood, Z., Imtiaz Mahmood Tahir, I.M., Iqbal, M. 2018. Mutagenicity, cytotoxic and antioxidante activities of *Ricinus communis* different parts. *Chemistry Central Journal*, 12, 1-9.
- Abudayyak, M., Nath, E.Ö., Özhan, G. 2015. Toxic potentials of ten herbs commonly used for aphrodisiac effect in Turkey. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 45, 496-506.
- Ahmed, H.M. 2016. Ethnopharmacobotanical study on the medicinal plants used by herbalists in Sulaymaniyah Province, Kurdistan, Iraq. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 12, 1-17.
- Akhtar, M. F., Saleem, A., Sharif, A., Akhtar, B., Nasim, M.B., Peerzada, S., Raza, M., Ijaz, H., Ahmed, S., Shabbir, M., Ali, S., Akbar, Z., Hassan, S.S.U. 2016. Genotoxic and cytotoxic action potential of *Terminalia citrina*, a medicinal plant of ethnopharmacological significance. *EXCLI Journal*, 15, 589-598.
- Al-Ali K., Abdelrazik, M., Alghaithy, A., Diaba., EL-Beshbishy, H., Baghdadi, H. 2014. Antimutagenic And Anticancer Activity of al madnah Alhasawy Mint (*Mentha Longifolia*) Leaves Extract. *Pakistan Journal of biological sciences*, 17, 1231-1236.
- Alice, C.B., Vargas, V.M.F., Silva, G.A.A.B., Siqueira, N.C.S., Schapoval, E.E.S., Gleyed, J., Henriques, J.A.P., Henriques, A.T. 1991. Screening of plants used in South Brazilian folk medicine. *Journal of Efhnopharmacology*, 35, 165-171.
- Alkofahi, A.S., Abdelaziz, A., Mahmoud I., Abuirjie, M., Hunaiti, A., El-Oqla, A. 1990. Cytotoxicity, Mutagenicity and Antimicrobial Activity of Forty Jordanian Medicinal Plants. *International Journal of Crude Drug Research*, 28, 139-144.
- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D. 1973a. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 2281–2285.

Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E. 1973b. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 782–786.

Ames, B.N., McCann J., Yamasaki, E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, 31, 347–364.

Arablou, T., Aryaeian, N. 2018. The effect of ginger (*Zingiber officinale*) as an ancient medicinal plant on improving blood lipids. *Journal of Herbal Medicine* 12, 11–15.

Aremu, A.O., Moyo, M., Amoo, S.O., Van Staden, J. 2013. Mutagenic evaluation of 10 long-term stored medicinal plants commonly used in South Africa. *South African Journal of Botany*, 87, 95-98.

Balcanli, M., Aydin. S., Basaran, A.A., Basaran, N. 2017. Are all phytochemicals useful in the preventing of DNA damage? *Food and Chemical Toxicology*, 109, 210-217.

Beric, T., Nikolic, B., Stanojevic, J., Vukovic-Gacic, B., Vukcevic, J.K. 2008. Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 724-732.

Bieski, I.G.C., Santos, F.R., Oliveira, R.M., Espinosa, M.M., Macedo, M. Albuquerque, U.P., Martins, D.T.O. 2012. Ethnopharmacology of Medicinal Plants of the Pantanal Region (Mato Grosso, Brazil). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012, ID 272749.

Bieski, I.G.C., Leont, M., Arnason, J.T., Ferrier, J., Rapinski, M., Violante, I.M.P., Balogun, S.O., Pereira, J. F.C.A., Figueiredo, R.C. F., Lopes, C.R.A.S., Silva, D.R., Pacini, A., Albuquerque, U.P., Martins, D.T.O. 2015. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 173, 383-423.

Biso, F.I., Rodrigues, C. M., Rinaldo, D., Reis Mariana B., Bernardi, C.C., Mattos, J.C.P., Araújo, A.C., Vilegas, W., Cólus, I.M.S., Varanda, E.A. 2010. Assessment of DNA damage induced by extracts, fractions and isolated compounds of *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae), *Mutation Research*, 702, 92–99.

Bode, A.M., Dong, Z. 2015. Toxic phytochemicals and their potential risks for human câncer. *Cancer Prevention Research*, 8, 1-8.

Boldrin, P.K., Resende, F.A., Höhne, A.P.O., Camargo, M.S., Espanha, L.G., Nogueira, C.H., Melo, M.S.F., Vilegas, W., Varanda, E.A. 2013. Estrogenic and mutagenic activities of *Crotalaria pallida* measured by recombinant yeast assay and Ames test. *Complementary and Alternative Medicine*, 13, 1472-6882.

Boubaker, J., Ben Mansour, H., Ghedira, K., Ghedira, L. 2012. Polar extracts from (Tunisian) *Acacia salicina* Lindl. Study of the antimicrobial and antigenotoxic activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10, 12-37.

Brasil, 2013. Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. Agencia de Vigilância Sanitária (ANVISA), Brasília.

Bresolin, S., Vargas, V.M.F. 1993. Mutagenic Potencies of Medicinal Plants Screened in the Ames Test. *Phytotherapy research*, 7, 260-262.

Cardoso, C.R. P., Colus, I.M.S., Bernardi, C.C., Sannomiya, M., Vilegas, W., Varanda E. A. 2006. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology*, 225, 55-63.

Castro, L., Freeman, B.A. 2001. Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition*. 170, 161–165.

Chinsamy, M., Finnie, J.F., Van Staden, J., 2014. Anti-inflammatory, antioxidant, anti-cholinesterase activity and mutagenicity of South African medicinal orchids. *South African Journal of Botany*, 91, 88-98.

Corvi, R., Madia, F. 2017. *In vitro* genotoxicity testing - Can the performance be enhanced? *Food and Chemical Toxicology*, 106, 600-608.

Costa, D.L.M.G., Rinaldo, D., Varanda, E.A., Sousa, J. F., Nasser, A.L.M., Silva, A.C.Z., Baldoqui, D. C., Vilegas, W., Santos, L.C. 2014. Flavonoid detection in hydroethanolic extract of *Pouteria torta* (Sapotaceae) and the leaves by HPLC-DAD Determination of Its Mutagenic Activity. *Journal of Medicinal Food*, 17, 1103-112.

Deciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Guadalupe, E., Lopez-Angeles, G.E., Navarrete, A., Mata, R. 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 334-342.

Della Torre, A., Albuquerque, L.B.L., Farrapo, N.M., Oshima-Franco, Y., Santos, M.G., Tavares, R.V.S., Rodas, A.C.D., Dal Belo, C.A., Cardoso, C.R.P., Varanda, E.A., Groppo, F.C., Lopes, P.S. 2011. Mutagenicity induced by the hydroalcoholic extract of the medicinal plant *Plathymenia reticulata* Benth. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17, 190-198.

Edziri, H., Mastouri, M., Mahjoub, A., Anthonissen, R., Mertens, B., Cammaerts, S., Gevaert, L., Verschaeve, L. 2011. Toxic and mutagenic properties of extracts from *Tunisian traditional* medicinal plants investigated by the neutral red uptake, VITOTOX and alkaline comet assays. *South African Journal of Botany*, 77, 703-710.

Ekar, T., Kreft, S. 2019. Common risks of adulterated and mislabeled herbal preparations. *Food and Chemical Toxicology*, 123, 288-297.

Eldeen, I.M.S., Van Staden, J. 2007. *In vitro* pharmacological investigation of extracts from some trees used in Sudanese traditional medicine. *South African Journal of Botany*, 73, 435-440.

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

EMA, 2008. European Medicines Agency. Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals, CPMP/ICH/286/95.

Eren Y. 2016. Mutagenic and cytotoxic activities of *Limonium globuliferum* methanol extracts. *Cytotechnology*, 68, 2115-2124.

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.

Escobar, P.A., Kemper, R.A., Tarca, J., Nicolette, J., Kenyon, M., Glowienke, S., Sawant S.G., Christensen, J., Johnson, T.E., Mcknight, C., Ward, G., Galloway, S.M., Custer, L., Gocke, E., O'donovan, M.R., Braun, K., Snyder, R.D., Mahadevan, B. 2013. Bacterial mutagenicity screening in the pharmaceutical industry. *Mutation Research*, 752, 99–118.

Espanha, L. G., Resende, F. A., Lima, J.S.N., Boldrin, P.K., Nogueira, C.A., Camargo M.S., Grandis, R. A., Santos, L.C., Vilegas, W., Varanda, E.A. 2014. Mutagenicity and antimutagenicity of six Brazilian *Byrsonima* species assessed by the Ames test. *Complementary and Alternative Medicine*, 14, 1-10.

Esteves-Pedro, N.M., Borim, T., Nazato, V.S., Silva, M.G., Lopes, P.S., Santos, M.G., Belo, C.A.D., Cardoso, C.R.P., Varanda, E.A., Groppo, F.C., Gerenutti, M., Oshima-Franco, Y. 2012. *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of *Dipteryx alata* Vogel extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 1-9.

Falzon, C.C., Balabanova A. 2017. *Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine*. Primary Care: Clinics in Office Practice, 44, 217-227.

Faruque, M.O., Uddin, S.B., Barlow, J.W., Hu, S., Dong, D., Cai, Q., Li, X., Hu, X. 2018. Quantitative Ethnobotany of Medicinal Plants Used by Indigenous Communities in the Bandarban District of Bangladesh. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-10.

FDA, 2012. International Conference on Harmonisation; guidance on S2 (R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use; availability. Food and Drug Administration. Notice. Federal register 77, pp. 33748–33749.

Ferrer, J.P., Vizoso, P.A., Ramos, R.A., García, L.A., Remigio M.A., Vega H.Y., González S.M.L., Rodríguez F.C., Carballo, C. 2009. Plantas medicinales. Diez años de evaluaciones toxicogenéticas en el CIDEM, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 5, 428-434.

Fonseca, C.A.S., Leal, J., Costa, S.S., Leitão, A,C. 1994. Genotoxic and mutagenic effects of guaraná (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. *Mutation Research*, 321, 165-173.

Gontijo, D.C., Nunes, L.G., Souza, C.J.A, Fietto, L.G., Leite, J.P.V. 2012. Evaluation of the genotoxic potential of ethanolic extracts of stem bark and leaves of *Bathysa cuspidata* (A.St.-Hil.) Hook. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 33, 355-359.

- Gontijo, D.C., Fietto, L.G., LEITE, J.P.V. 2014. Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante, antimutagênica e toxicológica do extrato aquoso das folhas de *Ocimum gratissimum* L. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 16, 874-880.
- Guldiken, B., Ozkan, G., Catalkaya, G., Ceylan, F.D., Yalcinkaya, I.E., Capanoglu, E. 2018. Phytochemicals of herbs and spices: Health versus toxicological effects. Food and Chemical Toxicology, 119, 37-49.
- Guldiken, B., Ozkan, G., Catalkaya, G., Ceylan, F.D., Yalcinkaya, I.E., Capanoglu, E. 2018. Phytochemicals of herbs and spices: Health versus toxicological effects. Food and Chemical Toxicology, 119, 37-49.
- Hong, C.E., Lyu, S.Y. 2011. Genotoxicity detection of five medicinal plants in Nigéria. The Journal of Toxicological Sciences, 36, 87-93.
- Hwang, Y.H., Kim, T., Cho, W.K., Yang, H.J., Kwak, D.H., Ha, H., Song, K.H., Ma, J.Y. 2012. *In vitro* and *in vivo* Genotoxicity Assessment of *Aristolochia manshuriensis* Kom. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012, 412736.
- Hwang, Y.H., Park, H., Ma, J.Y. 2013. *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of *Acer tegmentosum*. Journal of Ethnopharmacology, 148, 99-105.
- Insuan O., Chariyakornkul, A., Rungrote, Y., Wongpoomchai, R. 2017. Antimutagenic and Antioxidant Activities of Thai Rice Brans. Journal of cancer prevention, 22, 89-97.
- Konan, N.A., Bacchi, E.M., Lincopan, N., Varela, S. D., Varanda, E. A. 2007. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). Journal of Ethnopharmacology, 110, 30-38.
- Li, B.; Jina, Y.; Xua, Y.; Wua, Y., Xub, J., Tua, Y. 2011. Safety evaluation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) flower extract: Assessment of mutagenicity, and acute and subchronic toxicity in rats. Journal of Ethnopharmacology, 133, 583-590.
- Liman, R., Eren, Y., Akyil, D., Konuk, M., Determination of mutagenic potencies of aqueous extracts of *Thermopsis turcica* by Ames test. Turkish Journal of Biology, 36, 85-92.
- Lopes, M.I.L., Saffi, J., Echeverrigaray, S., Henriques, J.P., Salvador, M. 2004. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. Journal of Ethnopharmacology, 95, 437-445.
- López, A.G., Parra, A.V., Ruiz, A.R., Piloto, J. 2000. Estudio toxicogénico de un extracto fluido de *Ocimum basilicum* L. (*Albahaca blanca*). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 5, 78-83.
- Makhafola, T.J., Elgorashi, E., MCGAW, L.J., Verschaeve, L., Eloff, J.N. 2016. The correlation between antimutagenic activity and total phenolic content of extracts of 31 plant species with high antioxidant activity. BMC Complementary and Alternative Medicine, 16, 1-13.
- Maron, D., Ames, B.N. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research, 113, 173-215.

- Marques, R.C.P., Medeiros, S.R.B., Dias, C.S., Filho, J.M.B., Lima, L.F.A. 2003. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. *Mutation Research*, 20, 117-120.
- McClatcheya, W.C., Gail B. Mahady, G.B., Bradley, C., Bennettc, Laura, S., Savod, V. 2010. Ethnobotany as a Pharmacological Research Tool and Recent Developments in CNS-active Natural Products from Ethnobotanical Sources. *Pharmacology & Therapeutics*, 123, 239-254.
- Mendonça E. D., Silva J., Santos, M.S., Carvalho P., Papke, D.K.M., Ortmann, C.F., Picada, J.N., Reginatto, F.H., Ferraz, A.B.F. 2016. Genotoxic mutagenic and antigenotoxic effects of *Cecropia pachystachya* Trécul aqueous extract using *in vivo* and *in vitro* assays. *Journal of Ethnopharmacology*, 193, 214–220.
- Mininel, F.J., Junior, C.S.L., Espanha, L.G., Resende, F.A., Varanda, E.A., Leite, C.Q.F., Fujimura, C.Q., Vilegas, W., Santos, L.C. 2014. Characterization and Quantification of Compounds in the Hydroalcoholic Extract of the Leaves from *Terminalia catappa* Linn. (Combretaceae) and Their Mutagenic Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, ID 676902.
- Mirzaei, A., Toori, M.A., Mirzaei, N., Shirazi, G.R. 2013. Antioxidant, Antimicrobial and Antimutogenic Potential of 4 Iranian Medicinal Plants. *Life Science.Journal*, 10, 1885-1991.
- Montero, A.C.R., Ferrer, J.P., López, A.G., Ordoñez, M.G., Gobin, E.S., Hurtado Y.V. 2007. Genotoxicidad de *Indigofera suffruticosa* Mill. (añil cimarrón). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 12.
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455, 29–60.
- Mulaudzi, R.B., Ndhlala, A.R., Kulkarni, M.G., Finnie, J.F., Van Staden, J. 2013. Anti-inflammatory and mutagenic evaluation of medicinal plants used by Venda people against venereal and related diseases. *Jouçllrnal of Ethnopharmacology*, 146, 173-179.
- Ntuli, S.S.B.N., Gelderblom, W.C.A., Katerere, D.R. 2018. The mutagenic and antimutagenic activity of *Sutherlandia frutescens* extracts and marker compounds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, 1-10.
- Nunes, L.G., Gontijo, D.C., Souza, C.J.A., Fietto, L.G., Carvalho, A.F, Leite, J.P.V. 2012. The mutagenic, DNA-damaging and antioxidative properties of bark and leaf extracts from *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum. *Environmental toxicology and pharmacology*, 33, 297-303.
- Obaseiki-Ebor, E.E., Odukoya, K., Telikepalli, H., Mitscher, L.A., Shankel, D.M. 1993. Antimutagenic activity of extracts of leaves of four common edible vegetable plants in Nigeria (West Africa). *Mutation Research*, 302, 109-117.
- OECD, 1997a. Guidelines for the Testing of Chemicals No.471: Bacterial Reverse Mutation Test [the Ames test]. (Original Guideline, adopted 21st July 1997). Organisation for Economic Co-operation and Development.

OECD, 1997b. Guidelines for the Testing of Chemicals No.474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test [in vivo micronucleus test]. (Original Guideline, Adopted 21st July 1997). Organisation for Economic Co-operation and Development.

OECD, 2014a. Guideline for the testing of chemicals No.473: *In vitro* mammalian chromosomal aberration test. Organisation for Economic Co-operation and Development.

OECD, 2014b. Guideline for the testing of chemicals No.475: Mammalian bone marrow chromosomal aberration test. Organisation for Economic Co-operation and Development.

Özbek T., Güllüce M., Şahin F. , Özkan H., Sevsay S., Bariş Ö. 2008a. Investigation of the Antimutagenic Potentials of the Methanol Extract of *Origanum vulgare* L. subsp. vulgare in the Eastern Anatolia Region of Turkey, Turkish Journal of Biology, 32, 271-276.

Poppi, I., Tacchini, M., Sacchetti, G. 2013. *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil as possible mutagen-protective food ingredient against heterocyclic amines from cooked food. Food Chemistry, 139, 439-447.

Prinsloo, G., Nogemane, N., Street, R. The use of plants containing genotoxic carcinogens as foods and medicine. Food and Chemical Toxicology, 116, 27-39.

Quadros, A.P.O., Mazzeo, D.E.C., Morales, M.A.M., Perazzo, F.F., Rosa, P.C.P., Maistro, E.L. 2016. Fruit extract of the medicinal plant *Crataegus oxyacantha* exerts genotoxic and mutagenic effects in cultured cells. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 80, 161-170.

Reid, K.A., Maes, J., Maes, A., Van Staden, J., De Kimpe, N., Mulholland, D.A., Verschaeve, L. 2006. Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants. Journal of Ethnopharmacology, 106, 44-50.

Resende, F.A., Vilegas, W., Santos, L.C., Varanda, E.A. 2012. Mutagenicity of Flavonoids Assayed by Bacterial Reverse Mutation (Ames) Test. Molecules (Basel. Online), 17, 5255-5268, 2012.

Resende, F.A., Nogueira, C.H., Espanha, L.G., Boldrin, P.K., Oliveira-Hohne, A.P., Camargo, M.S., Rocha, C.Q., Vilegas, W., Varanda, E.A. 2017. *In vitro* toxicological assessment of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau: Mutagenicity and estrogenicity studies. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 90, 29-35.

Reyes, M.R., Reyes-Esparza J., Angeles, O.T., Rodríguez-Fragoso, L. 2010. Mutagenicity and Safety Evaluation of Water Extract of Coriander sativum Leaves. Journal of food Science, 75, T6-T12.

Riazuddin, S., Malik, M.M., Nasim, A. 1987. Mutagenicity testing of some medicinal herbs. Environmental and Molecular Mutagenesis, 10, 141-148.

Rivera, G., Martins, M.T., Sanchez, P.S., Sato, M.I.Z, Coelho, M.C.L, Akisue, M., Akisue, G. 1994. Genotoxicity Assessment Through the Ames Test of Medicinal Plants Commonly Used in Brazil. Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal, 9, 87-93.

- Rolim, L.A.D.M.M., Macêdo, M. F.S., Sisenando, H.A., Napoleao, T.H., Felzenszwalb, I., Aiub, C.A. F., Coelho, L.C.B.B., Medeiros, S.R.B., Paiva, P.M.G. 2011. Genotoxicity Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Extract and Lectin. *Journal of Food Science*, 76, 53-58.
- Rossi, D., Guerrini, A., Paganetto, G., Bernacchia, G., Conforti, F., Statti, G., Maietti, S., Sánchez-Lamar, A., Fonseca, G., Fuentes, J.L., Cozzir., Cundari, E., Fiore, M., Ricordy, R., Perticone, P., Degrassi, F., Salvia, R. 2008. Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 115, 416-422.
- Santos, F.V., Colus, I.M.S., Silva, M.A., Vilegas, W., Varanda, E.A. 2006. Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1585-1589.
- Santos, F.V., Calvo, T. R., Cólus, I.M.S., Vilegas, W., Varanda, E. A. 2009. Mutagenicity of two species of the genus *Alchornea* measured by *Salmonella* microsome assay and micronucleus test. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 382-389.
- Santos, F.V., Nasser, A.L.M., Biso, F.I., Moreira, L.M., Santos, V.J.S.V., Vilegasc, W., Varanda, E.A. 2011. Genotoxicity of polar and apolar extracts obtained from *Qualea multiflora* and *Qualea grandiflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, 138, 105-110.
- Sharif, A., Akhtar, M.F., Akhtar, B., Saleem, A., Manan, M., Shabbir, M., Ashraf, M., Peerzada, S., Ahmed, S., Raza, M. 2017. Genotoxic and cytotoxic potential of whole plant extracts of *Kalanchoe laciniata* by Ames and MTT assay, *EXCLI Journal*, 16, 593-601.
- Silva, M.A., Siqueira, A.P.O., Sannomiy, A. M., Sano, P.T., Varanda, E.A., Vilegas, W., Santos, L.C. 2007. Flavonoids and a Naphthopyranone from *Eriocaulon ligulatum* and Their Mutagenic Activity. *Pharmaceutical Society of Japan*, 55, 1635-1639.
- Silva-Oliveira, R.J., Lopes, G.F., Camargos, L.F., Ribeiro, A.M., Santos, F.V., Severino, R.P., Severino, V.G.P., Terezan, A.P., Thomé, R.G., Santos, H.B., Reis, R. M., Ribeiro, R.I.M.A. 2016. *Tapirira guianensis* Aubl. Extracts Inhibit Proliferation and Migration of Oral Cancer Cells Lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1839.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaurb, A., Singh, N. 2017. Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International*, 101, 1-16.
- Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E., Waszkielewicz, A.M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *Journal of Applied Genetics*, 55:273–285.
- Sohni, Y.R., Mutangadura-Mhlanga, T., Kale, P.G. 1994. Bacterial mutagenic of eight medicinal herbes from Zimbabwe. *Mutation Research*, 322, 133-140.
- Sponchiado, G., Adam, M.L, Silva, C.D, Soley, B.S, Mello-Sampayo, C., Cabrini, D.A, Correr, C.J, Otuki, M.F. 2016. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A Systematic review. *Journal of Ethnopharmacology*, 178, 289-296.

- Stajkovic, O., Beric-Bjedov, T., Mitic-Culafic, D., Stankovic, S., Vukovic-Gadic B., Simic, D., Knezevic-Vukievic, J. 2007. Antimutagenic Properties of Basil (*Ocimum basilicum* L.) in *Salmonella* Typhimurium TA100. *Food Technol. Biotechnol*, 45, 213-217.
- Tatsuzaki, J., Jinwei, Y., Kojo, Y., Mine, Y., Ishikawa S., Mochizuki, M., Inam, K. 2014. Antimutagenicity Screening of Extracts from Medicinal and Edible Plants against N-Methyl-N-nitrosourea by the Ames Assay. *Genes and Environment*, 36, 39–46.
- Umbuzeiro, G.A, Heringa, M., Zeiger, E. 2017. *In vitro* genotoxicity testing: significance and use in environmental monitoring. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 157, 59-80.
- Varanda, E.A., Pozetti, G.L., Lourenco, M.V., Vilegas, W., Raddi, M.S.G. 2002. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the *Salmonella*/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 257-264.
- Verschaeve, L., Van Staden, J. 2008, Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 575–587.
- Vidal, L. S., Alves, A. M., Kuster, R. M., Lage C., Leitão, A. C. 2010. Genotoxicity and mutagenicity of *Echinodorus macrophyllus* (chapéu-de-couro) extract. *Genetics and Molecular Biology*, 33, 549-557.
- Vukovic´-Gac´ic´, B., Nikc´evic´, S., Beric´-Bjedov, B., Knez´evic´-Vukc´evic´, J., Simi, D. 2006. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1730–1738.
- Zin, S.R.M., Mohamed Z., Alshawsh, M. A., Wong, W.F., Kassim, M.N. 2018. Mutagenicity evaluation of *Anastatica hierochuntica* L. aqueous extract *in vitro* and *in vivo*. *Experimental Biology and Medicine*, 243, 375-385.

Material Suplementar

Tabela 1S: Plantas medicinais avaliadas pelo teste de Ames de acordo com as buscas nas bases de dados eletrônicas utilizando os termos “*genotoxicity tests*” OR “*mutagenicity tests*” OR “*Ames test*” AND “*medicinal plants*” no período de 1975 a maio de 2018.

Espécie	Família	Referência
<i>Acokanthera oppositifolia</i>	Apocynaceae	Aremu et al., 2013
<i>Astronium graveolens</i>	Anacardiaceae	Resende et al., 2015
<i>Abies nordmannia</i>	Pinaceae	Basaran et al., 1996
<i>Abrus precatorius</i>	Fabaceae	Moosavi et al., 2003; Madikizela et al., 2014
<i>Acacia karroo</i>	Fabaceae	Ndhlala et al., 2009
<i>Acacia mearnsii</i>	Fabaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Acacia nilotica</i>	Fabaceae	Kaur et al., 2003; Eldeen et al., 2005
<i>Acacia pennatula</i>	Fabaceae	Feregrino-Pérez et al., 2011
<i>Acacia salicina</i>	Fabaceae	Bouhleb et al., 2008; Bouhlela et al., 2008; Boubaker et al., 2011; Chatti et al., 2011; Boubaker et al., 2012
<i>Acacia seyal</i>	Fabaceae	Eldeen et al., 2007
<i>Acacia sieberiana</i>	Fabaceae	Elgorashi et al., 2003; Eldeen et al., 2005; Verschaeve et al., 2008
<i>Acalypha cuspidata</i>	Euphorbiaceae	León et al., 2017
<i>Acalypha glabrata</i>	Euphorbiaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Acalypha subviscida</i>	Euphorbiaceae	León et al., 2017
<i>Acanthopanax gracilistylus</i>	Araliaceae	Chen et al., 2003
<i>Acanthus ebracteatus</i>	Acanthaceae	Rojanapo et al., 1990
<i>Acer tegmentosum</i>	Sapindaceae	Hwang et al., 2013b
<i>Achillea falcata L.</i>	Asteraceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Achillea fragrantissima</i>	Asteraceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Achillea teretifolia</i>	Asteraceae	Akyil et al., 2012
<i>Achyranthes bidentata</i>	Amaranthaceae	Chen et al., 2003
<i>Acokanthera oblongifolia</i>	Apocynaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008;
<i>Acokanthera venenata</i>	Apocynaceae	Ndhlala et al., 2011
<i>Acorus calamus</i>	Acoraceae	Aqil et al., 2008
<i>Adansonia digitata</i>	Malvaceae	Ndhlala et al., 2009
<i>Adenia digitata</i>	Passifloraceae	Sohni et al., 1994
<i>Adenia gummifera</i>	Passifloraceae	Sohni et al., 1994
<i>Adenophyllum aurantium</i>	Asteraceae	León et al., 2017
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Sapindaceae	Felipe et al., 2013
<i>Afzelia quanzensis</i>	Fabaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008;
<i>Agapanthus praecox</i>	Amaryllidaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Agrimonia eupatoria</i>	Rosaceae	Pukalskiene et al., 2018
<i>Agrimonia procera</i>	Rosaceae	Pukalskiene et al., 2018

<i>Albizia adianthifolia</i>	Fabaceae	Eldeen et al., 2005
<i>Albizia gummifera</i>	Fabaceae	Mahlangu et al., 2017
<i>Alchornea castaneaefolia</i>	Euphorbiaceae	Santos et al., 2010
<i>Alchornea glandulosa</i>	Euphorbiaceae	Santos et al., 2010
<i>Alchornea hirtella Benth</i>	Euphorbiaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Allium sphaerocephalon</i>	Amaryllidaceae	Ceylan, 2014
<i>Alloispermum integrifolium</i>	Asteraceae	León et al., 2017
<i>Aloe barberae</i>	Asphodelaceae	Ndhlala et al., 2009
<i>Aloe chabaudii</i>	Asphodelaceae	Mulaudzi et al., 2013
<i>Aloe ferox</i>	Aloaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Aloe marlothii</i>	Asphodelaceae	Luseba et al., 2007
<i>Aloe vera</i>	Asphodelaceae	Tanaka et al., 2005; Ferrer et al., 2009
<i>Alysicarpus rugosus</i>	Fabaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Amphipterygium adstringens</i>	Julianiaceae	Deciga-Campos et al., 2007
<i>Anacardium occidentale</i>	Anacardiaceae	Cavalcante et al., 2005; Konan et al., 2007
<i>Anagyris foetida</i>	Fabaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Anastatica hierochuntica</i>	Brassicaceae	Zin et al., 2018
<i>Anchusa strigosa</i>	Boraginaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Andrographis paniculata</i>	Acanthaceae	Chandrasekaran et al., 2009
<i>Androstachys johnsonii</i>	Picrodendraceae	Makhafola et al., 2016
<i>Anethum graveolens</i>	Apiaceae	Abudayyak et al., 2015
<i>Angelica acutiloba</i>	Umbelliferae	Yun et al. 2017b
<i>Angelica sinensis</i>	Apiaceae	Chen et al., 2003
<i>Annona crassiflora</i>	Annonaceae	Vilar et al., 2011
<i>Ansellia africana</i>	Orchidaceae	Chinsamy et al., 2014
<i>Antidesma venosum</i>	Phyllanthaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008;
<i>Antigonon leptopus</i>	Polygonaceae	Verschaeve et al., 2008; Wongwattanasathien et al., 2010
<i>Apocynum venetum</i>	Apocynaceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Arachis hypogaea</i>	Fabaceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Arctium minus</i>	Asteraceae	Basaran et al., 1996
<i>Argemone mexicana</i>	Papaveraceae	Duhan et al., 2011
<i>Argomuelleria macrophylla</i>	Euphorbiaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Aristolochia manshuriensis</i>	Aristolochiaceae	Hwang et al., 2012
<i>Arrabidaea brachypoda</i>	Bignoniaceae	Resende et al., 2017
<i>Arrabidaea chica</i>	Bignoniaceae	Ssantos et al., 2013; Gemelli et al., 2015
<i>Arracacia toluensis</i>	Apiaceae	Deciga-Campos et al., 2007
<i>Artemisia afra</i>	Asteraceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008; Aremu et al., 2013
<i>Artemisia absinthium</i>	Asteraceae	Ferrer et al., 2000; Ferrer et al., 2009; Taherkhani, 2014;
<i>Artemisia capillaris</i>	Asteraceae	Yum et al., 2017a
<i>Artemisia ciniformis</i>	Asteraceae	Taherkhani et al., 2016

<i>Artemisia dracunculus</i>	Asteraceae	Ribnicky et al., 2004
<i>Artemisia herba-alba</i>	Asteraceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Asclepias fruticosa</i>	Apocynaceae	Ndhkala et al., 2011
<i>Asparagus africanus</i>	Asparagaceae	Madikizela et al., 2014
<i>Asparagus falcatus</i>	Asparagaceae	Madikizela et al., 2014
<i>Asphodelus fistulosus</i>	Asphodelaceae	Alkofahi et al., 1990 Ndhkala et al., 2011; Madikizela et al., 2012
<i>Aster bakerianus</i>	Asteraceae	Özbek et al., 2008a
<i>Astragalus aduncus</i>	Fabaceae	Özbek et al., 2008a
<i>Astragalus argyroides</i>	Fabaceae	Özbek et al., 2008a
<i>Astragalus atrocorpus</i>	Fabaceae	Özbek et al., 2008a
<i>Astragalus bicolor</i>	Fabaceae	Özbek et al., 2008a
<i>Astragalus erinoceus</i>	Fabaceae	Özbek et al., 2008a
<i>Astragalus galegiformis</i>	Fabaceae	Özbek et al., 2008a
<i>Astragalus lagurus</i>	Fabaceae	Özbek et al., 2008a
<i>Astragalus membranaceus</i>	Fabaceae	Chen et al., 2003
<i>Astragalus microcephalus</i>	Fabaceae	Özbek et al., 2008a
<i>Astragalus pinetorum</i>	Fabaceae	Özbek et al., 2008a
<i>Astragalus ponticus</i>	Fabaceae	Özbek et al., 2008a
<i>Astragalus psoraloides</i>	Fabaceae	Özbek et al., 2008a
<i>Astragalus trichostigma</i>	Fabaceae	Özbek et al., 2008a
<i>Astronium urundeuva</i>	Anacardiaceae	Resende et al., 2015
<i>Astronium fraxinifolium</i>	Anacardiaceae	Resende et al., 2015
<i>Atractylodes macrocephala</i>	Asteraceae	Chen et al., 2003
<i>Azadirachta indica</i>	Meliaceae	Riazuddin et al., 1987; Vinod et al., 2011; Vijayan et al., 2015
<i>Baccharis anomala</i>	Asteraceae	Alice et al., 1991
<i>Baccharis articulata</i>	Astereae	Rodríguez et al., 2010
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Asteraceae	Resende et al., 2012
<i>Baccharis incarum</i>	Asteraceae	Nuño et al., 2012
<i>Baccharis trimera</i>	Asteraceae	Nogueira et al., 2011; Menezes et al., 2016
<i>Baccharis trinervis</i>	Asteraceae	Garcia et al., 2017
<i>Balanites aegyptiaca</i>	Cucurbitaceae	Alkofahi et al., 1990; Eldeen et al., 2007
<i>Balanites maughamii</i>	Balanitaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008;
<i>Baliospermum axillar</i>	Euphorbiaceae	Higashimoto et al., 1994
<i>Barlerii randii</i>	Acanthaceae	Sohni et al., 1994
<i>Bathysa cuspidata</i>	Rubiaceae	Sánchez-Lamar et al., 2008; Gontijo et al., 2012
<i>Bauhinia forficata</i>	Fabaceae	Bresolin et al., 1993; Rivera et al., 1994
<i>Bauhinia galpinii</i>	Fabaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Bauhinia uariiegata</i>	Fabaceae	Rivera et al., 1994
<i>Bauhinia variegata</i>	Fabaceae	Alkofahi et al., 1990

<i>Berberis hartwegii</i>	Berberidaceae	Garrido et al., 2015
<i>Berkheya bipinnatifida</i>	Asteraceae	Madikizela et al., 2012
<i>Berkheya mantana</i>	Asteraceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Bersama lucens</i>	Melianthaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008
<i>Beta vulgaris</i>	Amaranthaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Bidens pilosa</i>	Asteraceae	Chang-Eui et al., 2011
<i>Blepharis ciliaris</i>	Acanthaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Boerhavia erecta</i>	Nyctaginaceae	Ferrer et al., 2009
<i>Boldoa purpurascens</i>	Nyctaginaceae	Ortega et al., 2016
<i>Bolusanthus speciosus</i>	Fabaceae	Ndhlala et al., 2009
<i>Boophane disticha</i>	Amaryllidaceae	Elgorashi et al., 2003; Sohni et al., 1994; Verschaeve et al., 2008
<i>Bowiea volubilis</i>	Asparagaceae	Masondo et al., 2013
<i>Brachystegia spiciformis</i>	Fabaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Brickellia veronicaefolia</i>	Asteraceae	Deciga-Campos et al., 2007
<i>Brosimum gaudichaudii</i>	Moraceae	Varanda et al. 2002
<i>Brunsvigia grandifolia</i>	Amaryllidaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008; Madikizela et al., 2012
<i>Bryophyllum calycinum</i>	Crassulaceae	Valent et al., 1999
<i>Bryophyllum pinnatum</i>	Crassulaceae	Obaseiki-Ebor et al., 1993
<i>Buddleja saligna</i>	Scrophulariaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Bulbophyllum scaberulum</i>	Orchidaceae	Chinsamy et al., 2014
<i>Buxus natalensis</i>	Buxaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Byrsonima coccolobifolia</i>	Malpighiaceae	Espanha et al., 2014
<i>Byrsonima correifolia</i>	Malpighiaceae	Espanha et al., 2014
<i>Byrsonima Crassa</i>	Malpighiaceae	Cardoso et al., 2006
<i>Byrsonima fagifolia</i>	Malpighiaceae	Espanha et al., 2014
<i>Byrsonima intermedia</i>	Malpighiaceae	Sannomiya, et al., 2007; Espanha et al., 2014
<i>Byrsonima ligustrifolia</i>	Malpighiaceae	Espanha et al., 2014
<i>Byrsonima verbascifolia</i>	Malpighiaceae	Espanha et al., 2014
<i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae	Ramos et al., 1998; Ferrer et al., 2009
<i>Callistemon lanceolatus</i>	Myrtaceae	Arora et al., 2016
<i>Calotropis porcera</i>	Apocynaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Camellia sinensis</i>	Theaceae	Li et al., 2011; Tatsuzaki et al., 2014
<i>Campomanesium xanthocarpa</i>	Myrtaceae	Fernandes et al., 2003
<i>Canthium spinosum</i>	Rubiaceae	Okem et al., 2012
<i>Capparis decidua</i>	Capparaceae	Eldeen et al., 2007
<i>Capparis spinosa</i>	Capparaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Caralluma fimbriata</i>	Apocynaceae	Odendaal et al., 2013
<i>Cardiospermum halicacabum</i>	Sapindaceae	Jeyadevia et al., 2013
<i>Carthamus tinctorius</i>	Asteraceae	Tatsuzaki et al., 2014, Abudayyak et al., 2015

<i>Carum carvi</i>	Apiaceae	Higashimoto et al., 1994
<i>Carum copticum</i>	Apiaceae	Zahin et al., 2010
<i>Carya illinoensis</i>	Juglandaceae	Porto et al., 2013
<i>Cassia corymbosa</i>	Fabaceae	Ferreira et al., 1999
<i>Cassia fistula</i>	Fabaceae	Kaur et al., 2016b
<i>Cassia occidentalis</i>	Fabaceae	Sharma et al., 2000
<i>Cassinopsis ilicifolia</i>	Icacinaceae	Okem et al., 2012; Makhafola et al., 2016
<i>Castela texana</i>	Simaroubaceae	Reyes-Lopez et al., 2005
<i>Catharanthus roseus</i>	Apocynaceae	Elgorashi et al., 2003; Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Catunaregam spinosa</i>	Rubiaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008
<i>Cecropia pachystachya</i>	Urticaceae	Resende et al., 2015
<i>Celastrus senegalensis</i>	Celasteraceae	Mulaudzi et al., 2012
<i>Celtis africana</i>	Cannabaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008; Akin et al., 2015
<i>Ceratonia siliqua</i>	Fabaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Ceratophorus africanus</i>	Euphorbiaceae	Mulaudzi et al., 2012
<i>Cetraria Aculeata</i>	Parmeliaceae	Ceker et al., 2018
<i>Cetrelia olivetorum</i>	Parmeliaceae	Ceker et al., 2018
<i>Chaetacme aristata</i>	Ulmaceae	Verschaeve et al., 2008; Elgorashi et al., 2003
<i>Chiococca alba</i>	Rubiaceae	Gazda et al., 2006
<i>Chrozophera tinctoria</i>	Euphorbiaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Chrysanthemum indicum</i>	Compositae	Hwang e Kim, 2013
<i>Chukrasia tabularis</i>	Meliaceae	Kaur et al., 2005
<i>Cimicifuga racemosa</i>	Ranunculaceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Cinnamomum cassia</i>	Lauraceae	Yum et al., 2018
<i>Cinnamomum verum</i>	Lauraceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Cissus quadrangularis</i>	Vitaceae	Luseba et al., 2007; Kothari et al., 2011
<i>Citrullus colocynthis</i>	Cucurbitaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Citrus aurantium</i>	Rutaceae	Abudayyak et al., 2015
<i>Citrus latifolia</i>	Rutaceae	Pérez et al., 2016
<i>Citrus reticulata</i>	Rutaceae	Chen et al., 2003
<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae	Pérez et al., 2016
<i>Cladonia Chlorophaea</i>	Cladoniaceae	Ceker et al., 2018
<i>Clausena anisata</i>	Rutaceae	Aremu et al., 2013
<i>Cleistocalyx nervosum</i>	Myrtaceae	Inboot et al., 2012
<i>Cleistopholis paterns</i>	Annonaceae	Chang-Eui et al., 2011
<i>Clerodendrum myricoides</i>	Lamiaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008; Mulaudzi et al., 2012
<i>Clerodendrum paniculatum</i>	Lamiaceae	Phuneerub et al., 2017
<i>Clinacanthus nutans</i>	Acanthaceae	Farsi et al., 2016a
<i>Clutia pulchella</i>	Peraceae	Madikizela et al., 2012
<i>Cnestis ferruginea</i>	Connaraceae	Hong e Lyu, 2011

<i>Coccoloba mollis</i>	Polygonaceae	Tsuboy et al., 2010
<i>Cochlospermum regium</i>	Bixaceae	Leme et al., 2017
<i>Cocos nucifera</i>	Arecaceae	Abudayyak et al., 2015
<i>Coddia rudis</i>	Rubiaceae	Okem et al., 2012
<i>Codonopsis pilosula</i>	Campanulaceae	Chen et al., 2003
<i>Coleonema album</i>	Rutaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Combretum erythrophyllum</i>	Combretaceae	Sohni et al., 1994
<i>Combretum hartmannianum</i>	Combretaceae	Eldeen et al., 2007
<i>Combretum kraussii</i>	Combretaceae	Eldeen et al., 2005
<i>Combretum microphyllum</i>	Combretaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Combretum mkhzenze</i>	Combretaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008;
<i>Conostomium natalensis</i>	Rubiaceae	Oken et al., 2012
<i>Corchorus asplenifolius</i>	Malvaceae	Ndhlala et al., 2011
<i>Coriandrum sativum</i>	Apiaceae	Higashimoto et al., 1994; Reyes et al., 2010
<i>Cotoneaster integerrimus</i>	Rosaceae	Uysal et al., 2016
<i>Coutarea hexandra</i>	Rubiaceae	Nunes et al., 2012
<i>Crassula multicava</i>	Crassulaceae	Okem et al., 2012
<i>Crataegus oxyacantha</i>	Rosaceae	Quadros et al., 2016
<i>Crataegus pinnatifida</i>	Rosaceae	Chen et al., 2003
<i>Crataegus sanguinea</i>	Rosaceae	Sun et al., 2013
<i>Crinum macowanii</i>	Amaryllidaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008;
<i>Crocus sativus</i>	Iridaceae	Abdullaev et al., 2003
<i>Crotalaria pallida</i>	Fabaceae	Mendonça et al., 2016
<i>Croton lechleri</i>	Euphorbiaceae	Lopes et al., 2004; Rossi et al., 2013
<i>Croton sylvaticus</i>	Euphorbiaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008
<i>Cucurbita pepo</i>	Cucurbitaceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	Aggarwal et al., 2016
<i>Curcuma sessilis</i>	Zingiberaceae	Wongwattanasathien et al., 2010
<i>Cuscuta chinensis</i>	Convolvulaceae	Chen et al., 2003
<i>Cussonia sp 1</i>	Araliaceae	Reid et al., 2006
<i>Cussonia sp 2</i>	Araliaceae	Reid et al., 2006
<i>Cussonia sp 3</i>	Araliaceae	Reid et al., 2006
<i>Cussonia spicata</i>	Araliaceae	Luseba et al., 2007; Verschaeve et al., 2008
<i>Cyclocarya paliurus</i>	Juglandaceae	Deng et al., 2014
<i>Cymbopogon citratus</i>	Poaceae	Rivera et al., 1994; Vinitketkumnuen et al., 1994; Ferrer et al., 2009
<i>Cynomorium songaricum</i>	Cynomoriaceae	Chen et al., 2003
<i>Cyperus dives</i>	Cyperaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Cyperus rotundus</i>	Cyperaceae	Chen et al., 2003; Kilani et al., 2005
<i>Cyrtanthus obliquus</i>	Amaryllidaceae	Ndhlala et al., 2011
<i>Cyrtorchis arcuata</i>	Orchidaceae	Chinsamy et al., 2014

<i>Dais cotinifolia</i>	Thymelaeaceae	Madikizela et al., 2012; Makhafola et al., 2016
<i>Dalbergia nitidula</i> Bake	Fabaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Daphne linearifolia</i>	Thymelaeaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Datura stramonium</i>	Solanaceae	Alkofahi et al., 1990; Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Davilla elliptica</i>	Dilleniaceae	Biso et al., 2010
<i>Davilla nitida</i>	Dilleniaceae	Biso et al., 2010
<i>Dendropanax arboreus</i>	Araliaceae	Garrido et al., 2015
<i>Desmodium incanum</i>	Fabaceae	Alice et al., 1991
<i>Dialium guincense</i>	Fabaceae	Obaseiki-Ebor et al., 1993
<i>Dicerocaryum eriocarpum</i>	Pedaliaceae	Luseba et al., 2007
<i>Dillenia indica</i>	Dilleniaceae	Jaiswal et al., 2014
<i>Dimocarpus longan</i>	Sapindaceae	Wang et al., 2014
<i>Dioscorea dregeana</i>	Dioscoreaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Dioscorea opposita</i>	Dioscoreaceae	Chen et al., 2003
<i>Diospyros whyteana</i>	Ebenaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2004; Verschaeve et al., 2008
<i>Dipteryx alata</i>	Fabaceae	Pedro et al., 2012
<i>Distephanus angulifolius</i>	Asteraceae	Chukwujekwu et al., 2013
<i>Dombeya rotundifolia</i>	Malvaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008; Aremu et al., 2013
<i>Drimia robusta</i>	Asparagaceae	Ndhlala et al., 2011
<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	Dryopteridaceae	Hwang et al., 2013a
<i>Ecballium elaterium</i>	Cucurbitaceae	Basaran et al., 1996
<i>Echinacea angustifolia</i>	Asteraceae	Bírošová et al., 2012
<i>Echinacea purpurea</i>	Asteraceae	Tsai et al., 2012; Tatsuzaki et al., 2014
<i>Echinodorus macrophyllum</i>	Alismataceae	Rivera et al., 1994; Lopes et al., 2000; Vidal et al., 2010
<i>Echinophora platyloba</i>	Apiaceae	Entezari et al., 2018
<i>Echinops adenocaulos</i> Boiss.	Asteraceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Ekebergia capensis</i>	Meliaceae	Elgorashi et al., 2003; Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008; Ndhlala et al., 2009; Aremu et al., 2013
<i>Elaeodendron transvaalense</i>	Celastraceae	Makhafola et al., 2016
<i>Elephantorrhiza burkei</i>	Fabaceae	Ndhlala et al., 2009
<i>Elephantorrhiza elephantina</i>	Fabaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Eleutherococcus senticosus</i>	Araliaceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Elletaria cardamomum</i>	Zingiberaceae	Saeed et al., 2014
<i>Elsholtzia splendens</i>	Lamiaceae	Shim et al., 2008
<i>Emblica officinalis</i>	Phyllanthaceae	Sharma et al., 2000; Kaur et al., 2003
<i>Epimedium koreanum</i>	Berberidaceae	Hwang et al., 2017
<i>Epimedium sagittatum</i>	Berberidaceae	Chen et al., 2003
<i>Eriocaulon ligulatum</i>	Eriocaulaceae	Silva et al., 2007
<i>Eriocaulon sexangulare</i>	Eriocaulaceae	Chen et al., 2003

<i>Eriosema cordatum</i>	Fabaceae	Ndhlala et al., 2011
<i>Erythrina caffra</i>	Fabaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008
<i>Erythrina herbacea</i>	Leguminosae	Garrido et al., 2015
<i>Erythrina latissima</i>	Fabaceae	Eldeen et al., 2007
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Myrtaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Euclea divinorum</i>	Ebenaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008
<i>Euclea natalensis</i>	Ebenaceae	Verschaeve et al., 2008
<i>Eucomis autumnalis</i>	Asparagaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Eugenia Caryophyllata</i>	Myrtaceae	Santos et al., 2014
<i>Eulophia hereroensis</i>	Orchidaceae	Chinsamy et al., 2014
<i>Eulophia petersii</i>	Orchidaceae	Chinsamy et al., 2014
<i>Euphorbia helioscopia</i>	Euphorbiaceae	Saleem et al., 2015
<i>Euphorbia matabelensis</i>	Euphorbiaceae	Sohni et al., 1994
<i>Euphorbia rigida</i>	Euphorbiaceae	Basaran et al., 1996
<i>Eurycoma longifolia</i>	Simaroubaceae	Razak e Aidoo, 2011; Li et al., 2013
<i>Exostema caribaeum</i>	Rubiaceae	Deciga-Campos et al., 2007
<i>Fabiana Bryoides</i>	Solanaceae	Cuello et al., 2011
<i>Fabiana densa</i>	Solanaceae	Cuello et al., 2011
<i>Fabiana patagonica</i>	Solanaceae	Cuello et al., 2011
<i>Fabiana punensis</i>	Solanaceae	Cuello et al., 2011
<i>Faidherbia albida</i>	Fabaceae	Eldeen et al., 2005
<i>Faurea saligna</i>	Proteaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Ferula orientalis</i>	Apiaceae	Ozkan et al., 2012
<i>Ficus benghalensis</i>	Moraceae	Satish et al., 2013
<i>Ficus craterostoma</i>	Moraceae	Madikizela et al., 2012
<i>Ficus deltoidea</i>	Moraceae	Farsi et al., 2013
<i>Ficus sur</i>	Moraceae	Eldeen et al., 2005; Madikizela et al., 2014
<i>Filipendula palmata</i>	Rosaceae	Pukalskiene et al., 2018
<i>Filipendula ulmaria</i>	Rosaceae	Pukalskiene et al., 2018
<i>Filipendula vulgaris</i>	Rosaceae	Pukalskiene et al., 2018
<i>Fritillaria libanorica</i>	Liliaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Galium mexicanum</i>	Rubiaceae	León et al., 2017
<i>Ganoderma lucidum</i>	Ganodermataceae	Chen et al., 2003; Tatsuzaki et al., 2014
<i>Garcinia mangostana</i>	Clusiaceae	Silva et al., 2016
<i>Gardenia jasminosides</i>	Rubiaceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Gardenia volkensii</i>	Rubiaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2004; Verschaeve et al., 2008
<i>Geoffroea decorticans</i>	Fabaceae	Costamagna et al., 2013
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgoaceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Ginseng</i>	Araliaceae	Jeong et al., 2016
<i>Glycine max</i>	Fabaceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Glycyrrhiza aspera</i>	Fabaceae	Tatsuzaki et al., 2014

<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Fabaceae	Chen et al., 2003; Chandrasekaran et al., 2013; Abudayyak et al., 2015
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Fabaceae	Hong et al., 2011
<i>Gnaphalium sp.</i>	Asteraceae	Deciga-Campos et al., 2007
<i>Gnidia kraussiana</i>	Thymelaeaceae	Sohni et al., 1994; Ndhkala et al., 2011
<i>Gomphostigma virgatum</i>	Scrophulariaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Grewia occidentalis</i>	Malvaceae	Ndhkala et al., 2009
<i>Grewia tiliaefolia</i>	Tiliaceae	Discon et al., 2015
<i>Gunnera perpensa</i>	Gunneraceae	Ndhkala et al., 2011
<i>Gymnema sylvestre</i>	Apocynaceae	Tatsuzaki et al., 2014; Arora e Sood, 2017
<i>Gymnosporia senegalensis</i>	Celastraceae	Mulaudzi et al., 2012
<i>Haematoxylum brasiletto</i>	Fabaceae	Deciga-Campos et al., 2007
<i>Halleria lucida</i>	Stilbaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Hamelia patens</i>	Rubiaceae	Garrido et al., 2015
<i>Harpephyllum caffrum</i>	Anacardiaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008; Makhafola et al., 2016
<i>Helianthus annuus</i>	Asteraceae	Oliveira et al., 2016
<i>Helichrysum herbaceum</i>	Asteraceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Helichrysum nudifolium</i>	Asteraceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Helichrysum plicatum</i>	Asteraceae	Ozbek et al., 2009
<i>Helichrysum ruderae</i>	Asteraceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Helichrysum rugulosum</i>	Asteraceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Helichrysum simillimum</i>	Asteraceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Helichrysum umbraculigerum</i>	Asteraceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Helicteres vegae</i>	Malvaceae	Quintero et al., 2017
<i>Heliopsis longipes</i>	Asteraceae	Campos et al., 2012
<i>Heliopsis sinaloensis</i>	Asteraceae	Quintero et al., 2017
<i>Heliotropium europaeum</i>	Boraginaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Hemidesmus indicus</i>	Apocynaceae	Aqil et al., 2008
<i>Hermannia gerrardii</i>	Malvaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Heteromorpha arborescens</i>	Apiaceae	Verschaeve et al., 2008
<i>Heteromorpha trifoliata</i>	Apiaceae	Elgorashi et al., 2003
<i>Hibiscus esculentus</i>	Malvaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Malvaceae	Wongwattanasathien et al., 2010
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Malvaceae	Chewonarin et al., 1999; Tatsuzaki et al., 2014
<i>Hidrocotyle asiatica</i>	Araliaceae	Rivera et al., 1994
<i>Hintonia latiflora</i>	Rubiaceae	Deciga-Campos et al., 2007
<i>Hintonia standleyana</i>	Rubiaceae	Deciga-Campos et al., 2007

<i>Hippocratea excelsa</i>	Celastraceae	Deciga-Campos et al., 2007
<i>Holarrhena antidysenterica</i>	Apocynaceae	Aqil et al., 2008
<i>Holomitriopsis laevifolia</i>	Dicranaceae	Fernandes et al., 2018
<i>Hoslundia opposita</i>	Lamiaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Houttuynia cordata</i>	Lamiaceae	Kang et al., 2012
<i>Hovenia dulcis</i>	Rhamnaceae	Carabajal et al., 2017
<i>Hydnora africana</i>	Aristolochiaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Hydrocotyle bonariensis</i>	Araliaceae	Florinsiah et al., 2013
<i>Hypericum aethiopicum</i>	Hypericaceae	Ndhlala et al., 2011
<i>Hypericum lydiium</i>	Hypericaceae	Boran et al., 2017
<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericaceae	Tatsuzaki et al., 2014; Okmen et al., 2017
<i>Hypoxis colchicifolia</i>	Hypoxidaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008
<i>Hypoxis hemerocallidea</i>	Hypoxidaceae	Elgorashi et al., 2003; Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008; Madikizela et al., 2012
<i>Hyptis suaveolens</i>	Lamiaceae	Reid et al., 2006
<i>Ilex guayusa</i>	Aquifoliaceae	Junior et al., 2016
<i>Indigofera arrecta</i>	Fabaceae	Madikizela et al., 2014
<i>Indigofera suffruticosa</i>	Fabaceae	Montero et al., 2007; Ferrer et al., 2009
<i>Indigofera truxillensis</i>	Fabaceae	Calvo et al., 2011
<i>Inula japonica</i>	Asteraceae	Huang et al., 2013
<i>Iodina rhombifolia</i>	Santalaceae	Alice et al., 1991
<i>Iostephane heterophylla</i>	Asteraceae	Deciga-Campos et al., 2007
<i>Iris Albicans</i>	Iridaceae	Basgedik et al., 2015
<i>Iris germanica</i>	Iridaceae	Burcua et al., 2014
<i>Isatis indigotica</i>	Brassicaceae	Jianling et al., 2014
<i>Ixora coccinea</i>	Rubiaceae	Wongwattanasathien et al., 2010
<i>Jatropha zeyheri</i>	Euphorbiaceae	Luseba et al., 2007
<i>Juglans regia</i>	Juglandaceae	Kaur et al., 2003
<i>Justicia pectoralis</i>	Acanthaceae	Ferrer et al., 2009
<i>Kalanchoe flammea</i>		González et al., 2018
<i>Kalanchoe laciniata</i>	Crassulaceae	Sharif et al., 2017;
<i>Kigelia africana</i>	Bignoniaceae	Elgorashi et al., 2003; Eldeen et al., 2007; Verschaeve et al., 2008
<i>Kirkia wilmsii</i>	Kirkiaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Lactuca virosa</i>	Asteraceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Lafoensia pacari</i>	Lythraceae	Lima et al., 2013
<i>Lagynia lasiantha</i>	Rubiaceae	Okem et al., 2012
<i>Lantana achyranthifolia</i>	Verbenaceae	León et al., 2017
<i>Lantana camara</i>	Verbenaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Larrea cuneifolia</i>	Zygophyllaceae	Carabajal et al., 2017
<i>Larrea divaricata</i>	Zygophyllaceae	Carabajal et al., 2017
<i>Laurus nobilis</i>	Lauraceae	Tatsuzaki et al., 2014

<i>Lavandula angustifolia</i>	Lamiaceae	Evandri et al., 2005
<i>Lawsonia inermis</i>	Lythraceae	Ferrer et al., 2009
<i>Ledebouria ovatifolia</i>	Liliaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Ledebouria sp.</i>	Liliaceae	Ndhlala et al., 2011
<i>Leonotis dubia</i>	Lamiaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Leonotis intermedia</i>	Lamiaceae	Madikizela et al., 2014
<i>Lepidium meyenii</i>	Brassicaceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Lepidium sativum</i>	Brassicaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Lepidium virginicum</i>	Brassicaceae	Ferrer et al., 2009
<i>Leucobryum sp.</i>	Dicranaceae	Fernandes et al., 2018
<i>Leucosidea sericea</i>	Rosaceae	Adeyemi et al., 2011
<i>Leucospermum erubescens</i>	Proteaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Ligusticum porteri</i>	Apiaceae	Deciga-Campos et al., 2007
<i>Limoniastrum guyonianum</i>	Plumbaginaceae	Krifa et al., 2013
<i>Limonium effusum</i>	Plumbaginaceae	Eren et al., 2015
<i>Limonium globuliferum</i>	Plumbaginaceae	Eren et al., 2014; Eren, 2016
<i>Linaria genistifolia</i>	Plantaginaceae	Liman et al., 2011
<i>Liquidambar orientalis</i>	Altingiaceae	Saraç e Sem, 2014
<i>Lonchocarpus sericeus</i>	Fabaceae	Hong e Lyu, 2011
<i>Loranthus parasiticus</i>	Loranthaceae	Chen et al., 2003
<i>Loxostylis alata</i>	Anacardiaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Luehea divaricata</i>	Malvaceae	Alice et al., 1991
<i>Lupinus varius</i>	Fabaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Lycium barbarum</i>	Solanaceae	Mocan et al., 2017
<i>Lycium chinense</i>	Solanaceae	Chen et al., 2003
<i>Lycopodium clavatum</i>	Lycopodiaceae	Ndhlala et al., 2011
<i>Maesa lanceolata</i>	Primulaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Mahernia chrysantha</i>	Malvaceae	Verschaeve et al., 2008
<i>Malva parviflora</i>	Malvaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Malva verticillata</i>	Malvaceae	Li et al., 2014
<i>Mandragora officinarum</i>	Solanaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae	Rodeiro et al., 2006; Morffi et al., 2012
<i>Marrubium alysson</i>	Lamiaceae	Edziri et al., 2011
<i>Matricaria chamomila</i>	Asteraceae	Rivera et al., 1994
<i>Matricaria recutita</i>	Asteraceae	Mirzaei et al., 2005
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Celastraceae	Alice et al., 1991; Tabach et al., 2017
<i>Maytenus senegalensis</i>	Celastraceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Myrtaceae	Evandri et al., 2005
<i>Melampodium divaricatum</i>	Asteraceae	Nogueira et al., 2006
<i>Melissa officinalis</i>	Lamiaceae	Ferrer et al., 2009; Abudayyak et al., 2015
<i>Mentha arvensis</i>	Lamiaceae	Banerjee et al., 2017
<i>Mentha longifolia</i>	Lamiaceae	Alkofahi et al., 1990; Al-Ali et al., 2014

<i>Menthe piperita</i>	Labiatae	Mirzaei et al., 2005
<i>Merwillia natalensis</i>	Liliaceae	Elgorashi et al., 2003
<i>Merwillia plumbea</i>	Liliaceae	Verschaeve et al., 2008
<i>Mesona procumbens</i>	Lamiaceae	Yen et al., 2001
<i>Mikania laevigata</i>	Asteraceae	Fernandes et al., 2003
<i>Millettia grandis</i>	Fabaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Millettia sutherlandii</i>	Papilionaceae	Reid et al., 2006;
<i>Millingtonia hortensis</i>	Bignoniaceae	Wongwattanasathien et al., 2010
<i>Mimetes cucullatus</i>	Proteaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Mimosa bimucronata</i>	Fabaceae	Bresolin et al., 1993
<i>Mimosa tenuiflora</i>	Fabaceae	Silva et al., 2002
<i>Mitragyna speciosa</i>	Rubiaceae	Ghazali et al., 2011
<i>Momordica balsamina</i>	Cucurbitaceae	Ndhlala et al., 2011
<i>Momordica charantia</i>	Cucurbitaceae	Basaran et al., 1996
<i>Morella serrata</i>	Myricaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Morinda citrifolia</i>	Rubiaceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Morinda officinalis</i>	Rubiaceae	Chen et al., 2003
<i>Moringa oleifera</i>	Moringaceae	Rolim et al., 2005; Satish et al., 2013; Arora e Onsare, 2014
<i>Morus alba</i>	Moraceae	Tatsuzaki et al., 2014; Li et al., 2018
<i>Moschosma riparium</i>	Lamiaceae	Verschaeve et al., 2008
<i>Mucuna collettii</i>	Fabaceae	Cherdshewasart et al., 2008
<i>Murdannia loriformis</i>	Commelinaceae	Vinitketkumnuen et al., 1996
<i>Murraya exotica</i>	Rutaceae	Kaur et al., 2016a
<i>Murraya koenigii</i>	Rutaceae	Zahin et al., 2013
<i>Myrciaria tenella</i>	Myrtaceae	Ferreira et al., 1999
<i>Myristica fragrans</i>	Myristicaceae	Akinboro et al., 2012
<i>Myrtus communis</i>	Myrtaceae	Hayder et al., 2008
<i>Nauclea latifolia</i>	Rubiaceae	Reid et al., 2006
<i>Nelumbo nucifera</i>	Nelumbonaceae	Sohn et al., 2003; Wongwattanasathien et al., 2010
<i>Nerium oleander</i>	Apocynaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Nigella arvensis</i>	Ranunculaceae	Abudayyak et al., 2015
<i>Nitraria retusa</i>	Nitrariaceae	Boubaker et al., 2010
<i>Nymphaea stellata</i>	Nymphaeaceae	Huang et al., 2010
<i>Ochna gamostigmata</i>	Ochnaceae	Tshepiso et al., 2014; Makhafola et al., 2016
<i>Ochna natalitia</i>	Ochnaceae	Tshepiso et al., 2014
<i>Ochna pretoriensis</i>	Ochnaceae	Tshepiso et al., 2014
<i>Ochna pulchra</i>	Ochnaceae	Tshepiso et al., 2014
<i>Ochna serrulata</i>	Ochnaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008; Tshepiso et al., 2014; Makhafola et al., 2016
<i>Ocimum basilicum</i>	Lamiaceae	Vukovic-Gacic et al., 2006; Stajkovic et al., 2007; Beric et al., 2008; Ferrer et al., 2009

<i>Ocimum gratissimum</i>	Lamiaceae	Obaseiki-Ebor et al., 1993; Gontijo et al., 2014
<i>Ocimum tenuiflorum</i>	Lamiaceae	Ferrer et al., 2009
<i>Ocotea bullata</i>	Lauraceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008; Aremu et al., 2013, Madikizela et al., 2012,
<i>Ocotea duckei</i>	Lauraceae	Marques et al., 2003
<i>Oenothera biennis</i>	Onagraceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008
<i>Olea africana</i>	Oleaceae	Reid et al., 2006
<i>Olea europaea</i>	Oleaceae	Verschaeve et al., 2008
<i>Oncoba spinosa</i>	Salicaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Ophiopogon japonicus</i>	Asparagaceae	Chen et al., 2003
<i>Origanum majorana</i>	Lamiaceae	Khan et al., 2011; Dantas et al., 2016
<i>Origanum vulgare</i>	Lamiaceae	165, Özbek et al., 2008b
<i>Ormocarpum trichocarpum</i>	Fabaceae	Chukwujekwu et al., 2013
<i>Ornithogalum longibracteatum</i>	Asparagaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2004; Verschaeve et al., 2008
<i>Orthosiphon stamineus</i>	Lamiaceae	Muhammad et al., 2011; Shafaei et al., 2015
<i>Oryza sativa</i>	Poaceae	Insuan et al., 2017
<i>Osmanthus fragrans</i>	Oleaceae	Lu et al., 2016
<i>Osyris lanceolata</i>	Santalaceae	Ndhlala et al., 2009
<i>Panax ginseng</i>	Araliaceae	Tatsuzaki et al., 2014; Seo et al., 2017
<i>Pappea capensis</i>	Sapindaceae	Ndhlala et al., 2009
<i>Parkinsonia aculeata</i>	Fabaceae	Sharma et al., 2016
<i>Parthenium hysterophorus</i>	Asteraceae	Ramos et al., 2001; Ferrer et al., 2009
<i>Passiflora incarnata</i>	Passifloraceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Paullinia cupana</i>	Sapindaceae	Fonseca et al., 1994
<i>Pedilanthus tithymaloides</i>	Euphorbiaceae	Ferrer et al., 2009
<i>Peganum harmala</i>	Nitrariaceae	Alkofahi et al., 1990; Edziri et al., 2011
<i>Pelargonium luridum</i>	Geraniaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Peltastes peltatus</i>	Apocynaceae	Alice et al., 1991
<i>Peltophorum africanum</i>	Fabaceae	Ndhlala et al., 2009
<i>Peltophorum ferrugineum</i>	Fabaceae	Dandapat et al., 2012
<i>Pentanisia prunelloides</i>	Rubiaceae	Madikizela et al., 2012, Madikizela et al., 2014
<i>Persicaria tinctoria</i>	Polygonaceae	Lee et al., 2016
<i>Petroselinum crispum</i>	Apiaceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Pfaffia iresinoides</i>	Amaranthaceae	Rivera et al., 1994
<i>Pfaffia paniculata</i>	Amaranthaceae	Rivera et al., 1994
<i>Phaseolus mungo</i>	Fabaceae	Chen et al., 2003
<i>Philenoptera sutherlandii</i>	Fabaceae	Verschaeve et al., 2008
<i>Phyllanthus amarus</i>	Phyllanthaceae	Reid et al., 2006; Sripanidkulchai et al., 2002

<i>Phyllanthus orbicularis</i>	Phyllanthaceae	Ferrer et al., 2001
<i>Phyllanthus tenellus</i>	Phyllanthaceae	Rivera et al., 1994
<i>Physalis peruviana</i>	Solanaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Phytolacca octandra</i>	Phyllanthaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Pimienta dioica</i>	Myrtaceae	Ferrer et al., 2009
<i>Pinus pinea</i>	Pinaceae	Abudayyak et al., 2015
<i>Piper auritum</i>	Piperaceae	Ferrer et al., 2009
<i>Piper nigrum</i>	Piperaceae	Higashimoto et al., 1994
<i>Piper sanctum</i>	Piperaceae	Deciga-Campos et al., 2007
<i>Pituranthos tortuosus</i>	Apiaceae	Abdelwahed et al., 2013
<i>Plantago major</i>	Plantaginaceae	Thomé et al., 2012; Basaran et al., 1996
<i>Plathymenia reticulata</i>	Fabaceae	Della Torre et al., 2011
<i>Plectranthus amboinicus</i>	Lamiaceae	Ferrer et al., 2009
<i>Pleurostyliia capensis</i>	Celastraceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Plumbago auriculata</i>	Plumbaginaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008
<i>Plumbago indica</i>	Plumbaginaceae	Rojanapo et al., 1990
<i>Plumbago zeylanica</i>	Plumbaginaceae	Aqil et al., 2008
<i>Plumeria obtusa</i>	Apocynaceae	Wongwattanasathien et al., 2010
<i>Podocarpus elongatus</i>	Podocarpaceae	Abdillahi et al., 2012
<i>Podocarpus falcatus</i>	Podocarpaceae	Abdillahi et al., 2012
<i>Podocarpus henkelii</i>	Podocarpaceae	Abdillahi et al., 2012; Makhafola et al., 2016
<i>Podocarpus latifolius</i>	Podocarpaceae	Abdillahi et al., 2012
<i>Poliomintha longiflora</i>	Lamiaceae	Deciga-Campos et al., 2007
<i>Polygala tenuifolia</i>	Polygalaceae	Shin et al., 2015
<i>Polygala virgata</i>	Polygalaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008
<i>Polygonum multiflorum</i>	Polygonaceae	Chen et al., 2003
<i>Polyscias filicifolia</i>	Araliaceae	Marczewska et al., 2011
<i>Polystachya pubescens</i>	Orchidaceae	Chinsamy et al., 2014
<i>Pouteria torta</i>	Sapotaceae	Costa et al., 2014
<i>Pouzolzia mixta</i>	Urticaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008
<i>Protea cynaroides</i>	Proteaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Protea mundii</i>	Proteaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Protea neriifolia</i>	Proteaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Protea nitida</i>	Proteaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Protea rubropilosa Beard</i>	Proteaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Protorhus longifolia</i>	Anacardiaceae	Aremu et al., 2013
<i>Prunus africana</i>	Rosaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2004; Eldeen et al., 2005; Verschaeve et al., 2008
<i>Prunus cerasoides</i>	Rosaceae	Arora e Mahajan, 2018
<i>Prunus mahaleb</i>	Rosaceae	Abudayyak et al., 2015

<i>Prunus persica</i>	Rosaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Psidium guajava</i>	Myrtaceae	Zahin et al., 2017; Madikizela et al., 2012
<i>Psoralea pinnata</i>	Fabaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Pterocarpus angolensis</i>	Fabaceae	Luseba et al., 2007; Mulaudzi et al., 2013
<i>Pterodon pubescens</i>	Fabaceae	Sabino et al., 1999
<i>Pulicaria crispa</i>	Asteraceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Punica granatum</i>	Lythraceae	Wongwattanasathien et al., 2010
<i>Putterlickia restrospinosa</i>	Celastraceae	Makhafola et al., 2016
<i>Qualea grandiflora</i>	Vochysiaceae	Santos et al., 2011
<i>Qualea multiflora</i>	Vochysiaceae	Santos et al., 2011
<i>Qualea parviflora</i>	Vochysiaceae	Mazzolin et al., 2010
<i>Randia echinocarpa</i>	Rubiaceae	Campos et al., 2011
<i>Rapanea melaphloeos</i>	Myrsinaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Rehmannia glutinosa</i>	Orobanchaceae	Chen et al., 2003
<i>Retama raetam</i>	Fabaceae	Edziri et al., 2011; Algandaby et al., 2015
<i>Rhamnus prinoides</i>	Rhamnaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2004; Verschaeve et al., 2008
<i>Rhamnusal aternus</i>	Rhamnaceae	Ammar et al., 2008
<i>Rhinacanthus nasuthus</i>	Acanthaceae	Rojanapo et al., 1990; Wongwattanasathien et al., 2010
<i>Rhizopora mucronata</i>	Rhizophoraceae	Suganthy et al., 2014
<i>Rhoeo discolor</i>	Commelinaceae	Arriaga-Alba et al., 2011
<i>Rhoicissus tridentata</i>	Vitaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Rhus chirindensis</i>	Anacardiaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Rhus coriaria</i>	Anacardiaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Rhus gueinzii</i>	Anacardiaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008
<i>Rhus iancea</i>	Anacardiaceae	Mulaudzi et al., 2012
<i>Rhus rehmanniana</i>	Anacardiaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	Alkofahi et al., 1990; Luseba et al., 2007; Verschaeve et al., 2008; Elgorashi et al., 2003; Abbas et al., 2018
<i>Rizhoma captidis</i>	Ranunculaceae	Ning et al., 2015
<i>Rotheca myricoides</i>	Lamiaceae	Verschaeve et al., 2008
<i>Rubia cordifolia</i>	Rubiaceae	Ndhlala et al., 2011
<i>Rubus chingii</i>	Rosaceae	Chen et al., 2003
<i>Ruta chalepensis</i>	Rutaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Ruta graveolus</i>	Rutaceae	Ferrer et al., 2009
<i>Salacia oblonga</i>	Celastaceae	Flammang et al., 2006
<i>Salacia reticurata</i>	Celastaceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Salix mucronata</i>	Salicaceae	Eldeen et al., 2005
<i>Salpianthus arenarius</i>	Nyctaginaceae	León et al., 2017

<i>Salsola schweinfurthii</i> .	Amaranthaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Lamiaceae	Chen et al., 2003
<i>Salvia officinalis</i>	Lamiaceae	Ferrer et al., 2009; Vukovic-Gacic et al., 2006
<i>Salvia triloba</i>	Lamiaceae	Basaran et al., 1996
<i>Sambucus australis</i>	Adoxaceae	Bresolin et al., 1993
<i>Sambucus nigra</i>	Adoxaceae	Olejniak et al., 2016
<i>Saraca asoca</i>	Fabaceae	Nag et al., 2015
<i>Sarcostemma viminale</i>	Apocynaceae	Luseba et al., 2007
<i>Saussurea lappa</i>	Asteraceae	Riazuddin et al., 1987
<i>Scadoxus puniceus</i>	Amaryllidaceae	Ndhlala et al., 2011
<i>Scandix pecten-veneris</i>	Apiaceae	Sharifi-Rad et al., 2016
<i>Scaphyglottis livida</i>	Orchidaceae	Deciga-Campos et al., 2007
<i>Schkuhria pinnata</i>	Asteraceae	Luseba et al., 2007
<i>Scilla kraussii</i>	Amaryllidaceae	Verschaeve et al., 2008
<i>Scilla natalensis</i>	Asparagaceae	Verschaeve et al., 2008
<i>Scilla plumbea</i>	Asparagaceae	Verschaeve et al., 2008
<i>Sclerocarya birrea</i>	Anacardiaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008
<i>Searsia chirindensis</i>	Anacardiaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Senecio serratuloides</i>	Asteraceae	Elgorashi et al., 2003; Madikizela et al., 2012, Verschaeve et al., 2008
<i>Senecio vernalis</i>	Asteraceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Senna alata</i>	Fabaceae	Hong e Lyu, 2011
<i>Serjania marginata</i>	Sapindaceae	Périco et al., 2015
<i>Sesamum indicum</i>	Pedaliaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Silybum marianum</i>	Asteraceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Siparuna guianensis</i>	Monimiaceae	Thomé et al., 2012
<i>Siphonochilus aethiopicus</i>	Zingiberaceae	Elgorashi et al., 2013; Verschaeve et al., 2008
<i>Skimmia laureola</i>	Rutaceae	Riazuddin et al., 1987
<i>Smilax campestris</i>	Smilacaceae	Ferreira et al., 1999
<i>Solanum aculeastrum</i>	Solanaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Solidago microglossa</i>	Asteraceae	Rivera et al., 1994
<i>Sphenostylis marginata</i>	Fabaceae	Sohni et al., 1994
<i>Spirostachys africana</i>	Euphorbiaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2004; Verschaeve et al., 2008; Mulaudzi et al., 2012; Aremu et al., 2013
<i>Stachitarpheta jamaicensis</i>	Verbenaceae	Ramos et al., 2001; Ferrer et al., 2009
<i>Stachys lavandulifolia</i>	Lamiaceae	Basaran et al., 1996
<i>Stephania abyssinica</i>	Menispermaceae	Ndhlala et al., 2011
<i>Stevia eupatoria</i>	Asteraceae	Cariño-Cortés et al., 2007
<i>Stevia pilosa</i>	Asteraceae	Cariño-Cortés et al., 2007
<i>Stevia rebaudiana</i>	Asteraceae	Tatsuzaki et al., 2014; Zhang et al., 2017

<i>Strophanthus speciosus</i>	Apocynaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Strychnos pseudoquina</i>	Loganiaceae	Santos et al., 2006
<i>Sutherlandia frutescens</i>	Fabaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008; Hong e Lyu, 2011; 280; Ntuli et al., 2018
<i>Swertia chirayita</i>	Gentianaceae	Riazuddin et al., 1987
<i>Sylibum marianum</i>	Asteraceae	Ali et al., 2015
<i>Symphytum officinale</i>	Boraginaceae	Benedek et al., 2010
<i>Syzygium aromaticum</i>	Myrtaceae	Vijayasteltar et al., 2016
<i>Syzygium campanulatum</i>	Myrtaceae	Farsi et al., 2016a
<i>Syzygium cordatum</i>	Myrtaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2004; Verschaeve et al., 2008; Mulaudzi et al., 2012
<i>Syzygium malaccense</i>	Myrtaceae	Wongwattanasathien et al., 2010
<i>Tamarindus indic</i>	Fabaceae	Ferrer et al., 2009
<i>Tapirira guianensis</i>	Anacardiaceae	Silva-Oliveira et al., 2016
<i>Tecoma capensis</i>	Bignoniaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Teloxys ambrosioides</i>	Amaranthaceae	Ferrer et al., 2009
<i>Terminalia arjuna</i>	Combretaceae	Suganthy et al., 2018
<i>Terminalia belerica</i>	Combretaceae	Kaur et al., 2003
<i>Terminalia catappa</i>	Combretaceae	Mininel et al., 2014
<i>Terminalia chebula</i>	Combretaceae	Kaur et al., 2003; Kim et al., 2013; Pellati et al., 2013; Suganthy et al., 2018
<i>Terminalia citrina</i>	Combretaceae	Akhtar et al., 2016
<i>Terminalia phanerophlebia</i>	Combretaceae	Madikizela et al., 2014
<i>Terminalia sericea</i>	Combretaceae	Eldeen et al., 2005
<i>Tetradenia riparia</i>	Lamiaceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008; Ndhala et al., 2011; Okem et al., 2012; Aremu et al., 2013
<i>Tetrapleura tetraptera</i>	Fabaceae	Chang-Eui et al., 2011
<i>Teucrium polium</i>	Lamiaceae	Alkofahi et al., 1990; Mirzaei et al., 2005
<i>Teucrium ramosissimum</i>	Lamiaceae	Ben Sghaier et al., 2011; Sghaier et al., 2011
<i>Thermopsis turcica</i>	Fabaceae	Liman et al., 2012
<i>Thespesia acutiloba</i>	Malvaceae	Makhafola et al., 2016
<i>Tibouchina asperior</i>	Melastomataceae	Alice et al., 1991
<i>Tinospora cordifolia</i>	Menispermaceae	Chandrasekaran et al., 2009
<i>Tournefortia densiflora</i>	Boraginaceae	León et al., 2017
<i>Tragopogon longirostis</i>	Asteraceae	Sarac, 2015
<i>Trema orientalis</i>	Cannabaceae	Hong e Lyu, 2011; Madikizela et al., 2012,
<i>Trichilia dregeana</i>	Meliaceae	Eldee et al., 2005
<i>Trichilia emetica</i>	Meliaceae	Verschaeve et al., 2008; Elgorashi et al., 2003
<i>Tridactyle tridentata</i>	Orchidaceae	Chinsamy et al., 2014

<i>Trigonella foenum graecum</i>	Fabceae	Flammang et al., 2004
<i>Tripodanthus acutifolius</i>	Loranthaceae	Ferreira et al., 1999
<i>Triticum aestivum</i>	Triticum aestivum	Chen et al., 2003
<i>Tulbaghia violacea</i>	Amaryllidaceae	Elgorashi et al., 2003; Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Turraea floribunda</i>	Meliaceae	Verschaeve et al., 2008; Elgorashi et al., 2003
<i>Turraea obtusifolia</i>	Meliaceae	Madikizela et al., 2012
<i>Uncaria tomentosa</i>	Rubiaceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Urginea physodes</i>	Asparagaceae	Ndhlala et al., 2011
<i>Urtica dioica</i>	Urticaceae	Basaran et al., 1996
<i>Uvaria caffra</i>	Annonaceae	Mulaudzi et al., 2012
<i>Uvaria chamae</i>	Annonaceae	Reid et al., 2006
<i>Vaccaria pyramidata</i>	Caryophyllaceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Vaccinium myrtillus</i>	Ericaceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Valeriana officinalis</i>		Tatsuzaki et al., 2014
<i>Valeriana procera</i>	Caprifoliaceae	Deciga-Campos et al., 2007
<i>Vernonia amygdalina</i>	Asteraceae	Obaseiki-Ebor et al., 1993
<i>Vernonia colorata</i>	Asteraceae	Elgorashi et al., 2003; Verschaeve et al., 2008
<i>Vernonia condensata</i>	Asteraceae	Monteiro et al., 2001
<i>Viscum album</i>	Santalaceae	Basaran et al., 1996
<i>Vitellariopsis marginata</i>	Sapotaceae	Ndhlala et al., 2011
<i>Vitex agnus-castus</i>	Lamiaceae	Sarac et al., 2015
<i>Vitis spp.</i>	Vitaceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Warburgia salutaris</i>	Canellaceae	Verschaeve et al., 2008; Elgorashi et al., 2003
<i>Watsonia densiflora</i>	Iridaceae	Ndhlala et al., 2011
<i>Wilbrandia ebracteata</i>	Cucurbitaceae	Pereira et al., 1996; Ndhlala et al., 2011
<i>Xanthium spinosum</i>	Asteraceae	Alkofahi et al., 1990
<i>Xanthium strumarium</i>	Asteraceae	Ferrer et al., 2014
<i>Ximenia caffra</i>	Asteraceae	Ndhlala et al., 2009
<i>Xysmalobium undulatum</i>	Apocynaceae	Reid et al., 2006; Verschaeve et al., 2008
<i>Zanthoxylum alatum</i>	Rutaceae	Riazuddin et al., 1987
<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	Rutaceae	Tatsuzaki et al., 2014
<i>Zanthoxylum capense</i>	Rutaceae	Ndhlala et al., 2011; Madikizela et al., 2012
<i>Zanthoxylum caribaeum</i>	Rutaceae	Garrido et al., 2015
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	Rutaceae	Hwang et al., 2012
<i>Zataria multiflora</i>	Lamiaceae	Sharififar et al., 2015
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	Tatsuzaki et al., 2014; Abudayyak et al., 2015
<i>Zingiber zerumbet</i>	Zingiberaceae	Chang et al., 2012
<i>Ziziphus mistol</i>	Rhamnaceae	Cardozo et al., 2011
<i>Ziziphus mucronata</i>	Rhamnaceae	Luseba et al., 2007; Verschaeve et al., 2008; Madikizela et al., 2012;

		Elgorashi et al., 2003; Aremu et al., 2013
<i>Ziziphus spina-christi</i>	Rhamnaceae	Eldeen et al., 2007
<i>Zizyphus jujuba</i>	Rhamnaceae	Chen et al., 2003
<i>Zuccagnia punctata</i>	Fabaceae	Moreno et al., 2015; Nuni et al., 2016; Carabajal et al., 2017

Referências

Abbas, M., Ali, A., Arshad, M., Atta, A., Mehmood, Z., Imtiaz Mahmood Tahir, I.M., Iqbal, M. 2018. Mutagenicity, cytotoxic and antioxidante activities of *Ricinus communis* different parts. Chemistry Central Journal, 12, 1-9.

Abdelwahed, A., Skandrani, I., Kilani, S., Neffati, A., Sghaier, M.B., Bouhleb, I., Abdillahi, H.S., Verschaeve, L., Finnie, J.F., Staden, J.V. 2012. Mutagenicity, antimutagenicity and cytotoxicity evaluation of South African *Podocarpus species*. Journal of Ethnopharmacology, 139, 728-738.

Abdullaev, F.I., Negrete L.R.N, Ortega, H.C., Hernandez, J.M J., Lopez, I.P., Miranda, R.P., Aguirre, J.J.E. 2003. Use of *in vitro* assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). Toxicology *in vitro*, 17, 731-736.

Abudayyak, M., Nath, E.Ö., Özhan, G. 2015. Toxic potentials of ten herbs commonly used for aphrodisiac effect in Turkey. Turkish Journal of Medical Sciences, 45, 496-506.

Adeyemi, O., Aremu, S.O.A., Ndhlala, A.R., Finnie, J.F., Van Staden, J. 2011. Antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibition, iridoid content and mutagenic evaluation of *Leucosidea sericea*. Food and Chemical Toxicology, 49, 1122-1128.

Aggarwal, M. Chacko, K.M., Kuruvilla, B. 2016. Systematic and comprehensive investigation of the toxicity of curcuminoid-essential oil complex: A bioavailable turmeric formulation. Molecular Medicine Reports, 13, 592-604.

Akhtar, M. F., Saleem, A., Sharif, A., Akhtar, B., Nasim, M.B., Peerzada, S., Raza, M., Ijaz, H., Ahmed, S., Shabbir, M., Ali, S., Akbar, Z., Hassan, S.S.U. 2016. Genotoxic and cytotoxic action potential of *Terminalia citrina*, a medicinal plant of ethnopharmacological significance. EXCLI Journal, 15, 589-598.

Akin, D., Durak, Y., Uysal, A., Gunes, E., Aladag, M.O. 2015. Assessment of antimutagenic action of *Celtis glabrata* Steven ex Planch. (Cannabaceae) extracts against base pair exchange and frame shift mutations on *Salmonella* Typhimurium TA98 and TA100 strains by Ames test. Drug and Chemical Toxicology, 39, 312-321.

Akinboro, A., Mohamed, K.B., Asmawi, M.Z., Othman, A.S., Ying, T.H., Maidin S.M. 2012. Mutagenic and antimutagenic assessment of methanol leaf extract of *Myristica fragrans* (Houtt.) using *in vitro* and *in vivo* genetic assays. Drug and Chemical Toxicology, 35, 412-422.

- Akyil, D., Oktay, S., Liman, R., Eren, Y., Konuk, M. 2012. Genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts of *Achillea teretifolia*. Turkish Journal of Biology, 36, 441-448.
- Al-Ali, K., Abdelrazik, M., Alghaithy, A., Diaba., EL-Beshbishy, H., Baghdadi, H. 2014. Antimutagenic and anticancer activity of al madnah Alhasawy Mint (*Mentha Longifolia*) leaves extract. Pakistan Journal of biological sciences, 17, 1231-1236.
- Algandaby, M.M. 2015. Assessment of acute and subacute toxic effects of the Saudi folk herb *Retama raetam* in rats. Journal of the Chinese Medical Association, 78, 691-701.
- Ali, A., Rahman, K.U., Shahid, M., Arshad, M. 2015. Bioassays Application for mutagenicity and cytotoxicity Evaluation of Medicinal Plant having Considerable Antioxidant potential. Asian Journal of Chemistry, 27, 3965-3968.
- Alice, C.B., Vargas, V.M.F., Silva, G.A.A.B., Siqueira, N.C.S., Schapoval, E.E.S., Gleyed, J., Henriques, J.A.P., Henriques, A.T. 1991. Screening of plants used in South Brazilian folk medicine. Journal of Ethnopharmacology, 35, 165-171.
- Alkofahi, A.S., Abdelaziz, A., Mahmoud I., Abuirjie, M., Hunaiti, A., El-Oqla, A. 1990. International Journal of Crude Drug Research, 28, 139-144.
- Ammar, R.B., Sghaier, M.B., Boubaker, J., Bhourri, W., Naffeti, A., Skandrani, I., Bouhlel, I., Kilani, S., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. 2008. Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. Chemico-Biological Interactions, 174, 1–10.
- Aqil, F., Zahin, M., Ahamad, I. 2008. Antimutagenic activity of methanolic extracts of four ayurvedic medicinal plants. Indian Journal of Experimental Biology, 46, 668-672.
- Aremu, A.O., Moyo, M., Amoo, S.O., Van Staden, J. 2013. Mutagenic evaluation of 10 long-term stored medicinal plants commonly used in South Africa. South African Journal of Botany, 87, 95-98.
- Arora, D.S., Onsare, J.G. 2014. *In vitro* antimicrobial evaluation and phytoconstituents of *Moringa oleifera* pod husks. Industrial Crops and Products. 52, 125-135.
- Arora, D.S., Nim, L., Kaur, H. 2016. Antimicrobial Potential of *Callistemon lanceolatus* Seed Extract and its Statistical Optimization. Biotechnology and Applied Biochemistry, 180, 289–305.
- Arora, D.S., Mahajan, H. 2018. *In vitro* evaluation and statistical optimization of antimicrobial activity of *Prunus cerasoides* stem bark. Applied Biochemistry And Biotechnology, 184, 821–837.
- Arora, D.S., Sood, H. 2017. *In vitro* antimicrobial potential of extracts and phytoconstituents from *Gymnema sylvestre* R.Br. leaves and their biosafety evaluation. AMB Express, 7, 1-13.
- Arora, S. Kaur, K., Kaur, S. 2003. Indian Medicinal Plants as a Reservoir of Protective Phytochemicals. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis Supplement, 1, 295-300.

Arriaga-Alba, M., Blasco José, L., Ruíz-Pérez, N.J., Sánchez-Navarrete, J., Rivera-Sánchez, R., González-Avila, M. 2011. Antimutagenicity mechanisms of the *Rhoeo discolor* ethanolic extract. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63, 243-248.

Banerjee, P.P., Bandyopadhyay, A., Harsha, S.N., Policegoudra, R.S., Bhattacharya S., Karak, N., Chattopadhyay, A. 2017. *Mentha arvensis* (Linn.) mediated green silver nanoparticles trigger caspase 9-dependent cell death in MCF7 and MDA-MB-231 cells. *Breast Cancer - Targets and Therapy*, 9, 265-278, 2017.

Basaran, A.A., Wei, Y.T., Plewa, M.J., Anderson, D. 1996. An Investigation of Some Turkish Herbal Medicines in *Salmonella* Typhimurium and in the COMET Assay in Human Lymphocytes. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 16, 125-138.

Basgedik, B., Ugur, A., Sarac, N. 2015. Antimicrobial, antioxidant and antimutagenic properties of *Iris albicans*. *Industrial Crops and Products*, 69, 480-484.

Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Skandrani, I., Bouhlel, I., Litem, I., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. 2011. Antimutagenic, antigenotoxic and antioxidant activities of phenolic-enriched extracts from *Teucrium ramosissimum*: Combination with their phytochemical composition. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31, 220-232.

Benedek, B., Ziegler, A., Ottersbach, P. 2010. Absence of Mutagenic Effects of a Particular *Symphytum offi cinale* L. Liquid Extract in the Bacterial Reverse Mutation Assay. *Phytotherapy Research*, 24, 466-468.

Beric, T., Nikolic, B., Stanojevic, J., Vukovic-Gacic, B., Vukcevic, J.K. 2008. Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 724-732.

Bírošová, L., Olejníková, P., Vaverkováš. 2012. Antimicrobial and antimutagenic activities of extracts from different organs of *Echinacea angustifolia* DC (*Asteracea*), *Journal of Food and Nutrition Research*, 51, 201-206.

Biso, F.I., Rodrigues, C.M., Rinaldo, D., Reis Mariana, B., Bernardi, C.C., Mattos, J.C.P., Araújo, A.C., Vilegas, W., Cólus, I.M.S., Varanda, E.A. 2010. Assessment of DNA damage induced by extracts, fractions and isolated compounds of *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae), *Mutation Research*, 702, 92-99.

Boran, R., Ugur, A. 2017. The mutagenic, antimutagenic and antioxidante properties of *Hypericum lydiium*. *Pharmaceutical Biology*, 55, 402-405.

Boubaker, J., Skandrani, I., Bouhlel, I., Sghaier, M.B., Neffati, A., Ghedira, K., Ghedira, L.C. 2010. Mutagenic, antimutagenic and antioxidant potency of leaf extracts from *Nitraria retusa*. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2283-2290.

Boubaker, J., Ben Mansour, H., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. 2011. Antimutagenic and free radical scavenger effects of leaf extracts from *Accacia salicina*, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10, 1-37.

Boubaker, J., Ben Mansour, H., Ghedira, K., Ghedira, L. 2012. Polar extracts from (Tunisian) *Acacia salicina* Lindl. Study of the antimicrobial and antigenotoxic activities. BMC Complementary and Alternative Medicine, 10, 12-37.

Boubaker, J., Ammar, R.B., Mahmoud, A., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. 2013. Mutagenic, antimutagenic cytotoxic, and Apoptotic Activities of Extracts from *Pituranthos tortuosus*. Drug and Chemical Toxicology, 31, 37-60.

Bouhlef, I., Valenti, K., Kilani, S., Skandrani, I., Ben-Sghaier, M., Mariotte, A.M., Dijoux-Franca, M.G., Ghedira, K., Hininger-Favier, I., Laporte, F., Chekir-Ghedira, L. 2008. Antimutagenic, antigenotoxic and antioxidant activities of *Acacia salicina* extracts (ASE) and modulation of cell gene expression by H₂O₂ and ASE treatment. Toxicology *in vitro*, 22, 1264-1272.

Bouhlela, I., Kilania, S., Skandrana, I., Ben Amara, R., Nefattia, A., Laportec, F., Hininger-Faviera, I., Ghediraa, K., Chekir-Ghediraa, L. 2008, *Acacia salicina* extracts protect against DNA damage and mutagenesis in bacteria and human lymphoblast cell K562 cultures. Nutrition Research, 28, 190-197.

Brendel, M., Pungartnik, C., Rios-Santos, F. 2016. DNA Protection against Oxidative Damage Using the Hydroalcoholic Extract of *Garcinia mangostana* and Alpha-Mangostin. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016, 3430405.

Bresolin, S., Vargas, V.M.F. 1993. Mutagenic Potencies of Medicinal Plants Screened in the Ames Test. Phytotherapy research, 7, 260-262.

Burcu, B., Aysel, U., Nurdanc, S. 2014. Antimicrobial, antioxidant, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Iris germanica*. Industrial Crops and Product, 61, 526-530.

Chandrasekaran, C., V., Sundarajan, K., Gupta, A., Srikanth, H.S., Edwin, J., Agarwal, A. 2011. Evaluation of the genotoxic potential of standardized extract of *Glycyrrhiza glabra* (GutGard™). Regulatory Toxicology and Pharmacology, 61, 373-380.

Calvo, T.R., Cardoso, R.P.C., Moura, A.S.M., Santos, L.C., Colus, I.M.S., Vilegas, W., Varanda, E.A., Loudes, C.S. 2011. Mutagenic Activity of *Indigofera truxillensis* and *I. suffruticosa* Aerial Parts. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011, 323276.

Campos, M., Alba Myriam, A., Martínez, R.V., Guadarrama, B.A, Rios, M.Y. 2012. Pharmacological and Toxicological Profile of Extract from *Heliopsis longipes* and Affinin. Drug Development Research, 73, 130-137.

Campos, M.C.C., Camacho, S.P.D., Beltrán, M.J.U., Ângulo, G.L, J., Avila, M., Carabajal M.P.A., Isla M.I., Zampini I.C. 2017. Evaluation of antioxidant and antimutagenic activity of herbal teas from native plants used in traditional medicine in Argentina. South African Journal of Botany, 110, 258–265.

Cardoso, C.R.P., Colus, I.M.S., Bernardi, C.C., Sannomiya, M., Vilegas, W., Varanda, E.A. 2006. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. Toxicology, 225, 55-63.

- Cardozo, M.L., Ordoñez, R.M., Alberto, M.R., Zampini, I.C., Isla, M.I. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activity characterization and genotoxicity evaluation of *Ziziphus mistol* ripe berries, exotic Argentinean fruit. *Food Research International*, 44, 2063-2071.
- Cariño-Cortés, R., Hernández-Ceruelos, A., Torres-Valencia, J.M., González-Avila, M., Arriaga-Alba, M., Madrigal-Bujaidar, E. 2007. Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* evaluated with the Ames test. *Toxicology in vitro*, 21, 691–697.
- Cavalcante, A.A.M., Rübensam, G., Erdtmann, B., Brendel, M., Henriques J.A.P., 2005. Cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice lowers mutagenicity of aflatoxin B1 in *S. Typhimurium* TA102. *Genetics and Molecular Biology*, 28, 328-333.
- Ceker, S., Orhan, F., Sezen, S., Gulluce, M., Ozkan H., Aslan, A., Agar, G. 2018. Anti-mutagenic and Anti-oxidant Potencies of *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr., *Cladonia Chlorophaea* (Flörke ex Sommerf.) Spreng. and *Cetrelia olivetorum* (Nyl.) W.L. Culb. & C.F. Culb.). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 17, 326-335.
- Ceylan, O. 2014. Antibiofilm, Mutagenic and Antimutagenic Activity of *Allium sphaerocephalon* L. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8, 2879-2885.
- Chandrasekaran, C.V., Mathuram, L.N., Daivasigamani, P., Bhatnagar, U. 2009. *Tinospora cordifolia*, a safety evaluation. *Toxicology in vitro*, 23, 1220-1226.
- Chandrasekaran, C.V., Thiyagarajan, P., Sundarajan, K., Krishna, S. G., Deepak, M., Murali, B., Allan, J.J., Agarwal, A. 2009. Evaluation of the genotoxic potential and acute oral toxicity of standardized extract of *Andrographis paniculata* (KalmCold), *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1892-1902.
- Chang, C. J., Tzeng, T.F., Shii, Liou, S., Chang, Y.S., Min, Liu, I. 2012. Absence of Genotoxic and Mutagenic Effects of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (Zingiberaceae) Extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 406296.
- Chang-Eui, H., Seang-Taek, J., Su-Yun, L. 2011. Absence of Mutagenicity in Three Nigerian Medicinal Plants - *Bidens pilosa*, *Cleistopholis patens* and *Tetrapleura tetráptera*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10, 153-159.
- Chatti, I. B., Boubaker, J., Skandrani, I., Bhour, W., Ghedira, K., Chekir-Ghedira L. 2011. Antioxidant and antigenotoxic activities in *Acacia salicina* extracts and its protective role against DNA strand scission induced by hydroxyl radical. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1753-1758.
- Chen, W. Weng, Y.M., Tseng, C.Y. 2003. Antioxidative and Antimutagenic Activities of Healthy Herbal Drinks from Chinese Medicinal Herbs. *The American Journal of Chinese Medicine*, 31, 523-532.
- Cherdshewasart, W., Sutjit, W., Pulcharoen, K., Rattana, P., Malyn, C. 2008. Antimutagenic potential of the Thai herb *Mucuna collettii* Lace. *Journal of Ethnopharmacology*, 115, 96-103.

- Chewonarin, T., Kinouchi, T., Kataoka, K., Arimochi, H., Kuwahara, T., Vinitketkumnun, U., Ohnishi, Y. 1999. Effects of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), a Thai Medicinal Plant, on the Mutagenicity of Various Known Mutagens in *Salmonella* Typhimurium and on Formation of Aberrant Crypt Foci Induced by the Colon Carcinogens Azoxymethane and 2-Amino-1-methyl-6phenylimidazo[4,5-b]pyridine in F344 Rats. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 591-601.
- Chinsamy, M., Finnie, J.F., Van Staden, J. 2014. Anti-inflammatory, antioxidant, anti-cholinesterase activity and mutagenicity of South African medicinal orchids. *South African Journal of Botany*, 91, 88-98.
- Chukwujekwu, J.C., Amoo, S.O., Van Staden. 2013. Antimicrobial, antioxidant, mutagenic and antimutagenic activities of *Distephanus angulifolius* and *Ormocarpum trichocarpum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 957-979.
- Costa, D.L.M.G., Rinaldo, D., Varanda, E.A., Sousa, J. F., Nasser, A.L.M., Silva, A.C.Z., Baldoqui, D. C., Vilegas, W., Santos, L.C. 2014. Flavonoid Detection in Hydroethanolic Extract of *Pouteria torta* (Sapotaceae) and the Leaves by HPLC-DAD Determination of Its Mutagenic Activity. *Journal of Medicinal Food*, 17, 1103-1112.
- Costamagna, M.S., Ordoñez, R.M., Zampini, I.C., Sayago, J.E., Isla, M.I. 2013. Nutritional and antioxidant properties of *Geoffroea decorticans*, an Argentinean fruit, and derived products (flour, arropo, decoction and hydroalcoholic beverage). *Food Research International*, 54, 160-168.
- Cuello, S., Alberto, M.R., Zampini, I.C., Ordonez, R.M., Isla, M.I. 2011. Comparative study of antioxidant and anti-inflammatory activities and genotoxicity of alcoholic and aqueous extracts of four *Fabiana* species that grow in mountainous area of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 512-522.
- Dandapat, R., Jena, B.S., Negi, P.S. 2012. Antimutagenic and antibacterial activities of *Peltophorum ferrugineum* flower extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, 778-782.
- Dantas, A.S., Júnior, L.C.K., Machado, M.S., Guecheva, T.N., SANTOS, L.D., Zannete, R.A., Mello, F.B., Henriques, J.A.P., Mello, J.R.B. 2016. *Origanum majorana* Essential Oil Lacks Mutagenic Activity in the *Salmonella*/Microsome and Micronucleus Assays. *Scientific World Journal*, 2016, 3694901.
- Deciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Guadalupe, E., Lopez-Angeles, G.E., Navarrete, A., Mata, R. 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 334-342.
- Della Torre, A., Albuquerque, L.B.L., Farrapo, N.M., Oshima-Franco, Y., Santos, M.G., Tavares, R.V.S., Rodas, A.C.D., Dal Belo, C.A., Cardoso, C.R.P., Varanda, E.A., Groppo, F.C., Lopes, P.S. 2011. Mutagenicity induced by the hydroalcoholic extract of the medicinal plant *Plathymenia reticulata* Benth. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17, 190-198.

Deng L., Lei, J., He, J., Liu, J., WANG, L., Zhang, R., Liu, X., LIU, Y. 2014. Evaluation on Genotoxicity and Teratogenicity of Aqueous Extract from *Cyclocarya paliurus* Leaves. Scientific World Journal, 2014, 498134.

Dicson, S.M., Samuthirapandi, M., Govindaraju, A., Kasi, P.D. 2015. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* safety profile of the Indian traditional medicinal plant *Grewia tiliaefolia*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 73, 241-247.

Duhan, J.S., Bhardwaj, M., Surekha, S. 2011. Free radical-scavenging and antimutagenic potential of acetone, chloroform and methanol extracts of fruits of *Argemone Mexicana*. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2.

Edziri, H., Mastouri, M., Mahjoub, A., Anthonissen, R., Mertens, B., Cammaerts, S., Gevaert, L., Verschaeve, L. 2011. Toxic and mutagenic properties of extracts from *Tunisian traditional* medicinal plants investigated by the neutral red uptake, VITOTOX and alkaline comet assays. South African Journal of Botany, 77, 703-710.

Eldeen, I.M.S., Elgorashi, E.E., Van Staden, J. 2005. Antibacterial, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine. Journal of Ethnopharmacology, 102, 457-464.

Eldeen, I.M.S., Van Staden, J. 2007. *In vitro* pharmacological investigation of extracts from some trees used in Sudanese traditional medicine. South African Journal of Botany, 73, 435-440.

Elgorashi, E.E., Taylor, J.L.S., Maes, A., Van Staden, J., De Kimpe, N., Verschaeve L. 2003. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. Toxicology Letters, 143, 195-207.

Entezari, M., Dabaghian, F.H., Hashemi, M. 2018. The comparison of antimutagenicity and anticancer activities of *Echinophora platyloba* DC on acute promyelocytic leukemia cancer cells. Journal of Cancer Research and Therapeutics, 10, 1004-1007.

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.

Eren, Y., Özata, A., Konuk, M., Akyil, D., Liman, R. 2015. A Mutagenicity and Cytotoxicity Study on *Limonium effusum* Aqueous Extracts by *Allium*, Ames and MTT Tests. Cytology and Genetics, 49, 125-133.

Eren, Y. 2016. Mutagenic and cytotoxic activities of *Limonium globuliferum* methanol extracts. Cytotechnology, 68, 2115-2124.

Espanha, L.G., Resende, F.A., Lima, J.S.N., Boldrin, P.K., Nogueira, C.A., Camargo M.S., Grandis, R. A., Santos, L.C., Vilegas, W., Varanda, E.A. 2014. Mutagenicity and antimutagenicity of six Brazilian *Byrsonima* species assessed by the Ames test. Complementary and Alternative Medicine, 14, 1-10.

- Evandri, M.G., Battinelli, L., Daniele, C., Mastrangelo, S., Bolle, P., Mazzanti, G. 2005. The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1381-1387.
- Farsi, E., Shafaei, A., Hor, S.Y., Ahamed, M.B.K., Yam, M.F., Asmawi, M.Z., Ismail, Z. 2013. Genotoxicity and acute and subchronic toxicity studies of a standardized methanolic extract of *Ficus deltoidea* leaves, *Clinics*, 68, 865-875.
- Farsi, E., Esmaili, K., Shafaei, A., Ahamed, M.B.K., Majid, A.S.A., Sattar, M.Z.A., Majid, A.M.Z.A. 2016a. Preclinical safety assessment and mutagenicity of the hydroethanolic extract of *Syzygium campanulatum* Leaves. *International Journal Of Phytomedicine*, 8, 514-524.
- Farsi, E., Esmaili, K., Shafei, A., Khaniabadi, P.M., Al Hind, B., Ahamed, M.B.K. 2016b. Mutagenicity and preclinical safety assessment of the aqueous extract of *Clinacanthus natans* leaves. *Drug and Chemical Toxicology*, 39, 461-473.
- Felipe, M.M.C., Carvalho, F.M., Silva, J.F., Pedrosa, M.F., Fernandes-Scortecchi, K.C., Lima, L.F.A., Medeiros, S.R.B. 2013. Evaluation of genotoxic and antioxidant activity of an *Aesculus hippocastanum* L. (Sapindaceae) phytotherapeutic agente. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 3, 261-266.
- Feregrino-Pérez, A.A., Torres-Pacheco, I., Vargas-Hernández, M., Munguía-Fragozo, P.V., Loarca-Piña, G.F., Mendoza-Díaz, S.O., Campo-Velásquez, R.V., Rico-García, E.R., Guevara-González, R.G. 2011. Antioxidant and antimutagenic activities of *Acacia pennatula* pods. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 70, 859-864.
- Fernandes, A.S., Mazzei, J.L., Evangelista, H., Marques, M.R.C., Ferraz, E.R.A., Felzenszwalb, I. 2018. Protection against UV-induced oxidative stress and DNA damage by Amazon moss extracts. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 183, 331-341.
- Fernandes, J.B.F., Vargas, V.M.F. 2003. Mutagenic and Antimutagenic Potential of the Medicinal Plants *M. laevigata* and *C. xanthocarpa*, *Phytotherapy Research*, 17, 269-273.
- Ferreira, I.C.F.S., Vargas, V.M.F. 1999. Mutagenicity of Medicinal Plant Extracts in *Salmonella*/microsome Assay. *Phytotherapy research*, 13, 397-400.
- Ferrer J. P., Ruiz A. R., Parra Á. V., López A. G. 2000. Evaluación del potencial genotóxico de un extracto fluido de incienso (*Artemisia absinthium* L.). *Revista Cubana Plantas Medicinai*s, 5, 7-64.
- Ferrer, M., Sánchez-Lamar, A., Fuentes, J., Barbé, J., Llagostera, M. 2001. Studies on the antimutagenesis of *Phyllanthus orbicularis*: mechanisms involved against aromatic amines. *Mutation Research*, 498, 99-105.
- Ferrer, J.P., Vizoso, P.A., Ramos, R.A., García, L.A., Remigio, M.A., Veja, H.Y., González, S.M.L., Rodríguez, F.C., Carballo, C. 2009. Plantas medicinales. Diez años de evaluaciones toxicogenéticas en el CIDEM. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 5, 428-434.

- Ferrer, J. P., Cozzi, R., Cornetta, T., Stano, P., Fiore, M., Degrassi, F., Salvia, R., Remigio, A., Francisco, M., Quiñones, O., Valdivia, D., González, M.L., Pérez, C., Sánchez-Lamar, A. 2014. *Xanthium strumarium* L. Extracts Produce DNA Damage Mediated by Cytotoxicity in *In vitro* Assays but Does Not Induce Micronucleus in Mice. *BioMed Research International*, 2014, 575197.
- Flammang, A.M., Cifone, M.A., Erexson, G.L., Junior, L.F.S. 2004. Genotoxicity testing of a fenugreek extract. *Food and Chemical Toxicology*, 42,1769-1775.
- Flammang, A.M., Erexson, G.L., Mecchi, M.S., Murli, H. 2006. Genotoxicity testing of a *Salacia oblonga* extract. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1868-1874.
- Florinsiah, L., Farida, Z.M.Y., Shahirah, N., Norfazlina, M.N., Zaila, S.C.F., Rajab, N.F. 2013. Mutagenicity Effect of *Hydrocotyle bonariensis* Extracts in *Salmonella*/Microsome Assay. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 8, 47-50.
- Fonseca, C.A.S., Leal, J., Costa, S.S., Leitão, A.C. 1994. Genotoxic and mutagenic effects of guaraná (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. *Mutation Research*, 321, 165-173.
- García, V.J., Trindade, C., Lima, E., Guecheva, T.N., Vilela, I., Martinez-Lopez, W., Corrêa, D.S., Ferraz, A.B.F., Moura, S., Sosa, M.Q., Silva, J., Antônio, J.P.H. 2017. Chemical characterization and cytotoxic, genotoxic, and mutagenic properties of *Baccharis trinervis* (Lam, Persoon) from Colombia and Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 1, 210-220.
- Garrido, J. C., Sandoval, M.S., López, A.D., Ríos, P.J., Alba, M.A, Pichardo, C.O. 2015. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity, liver profile test, and mutagenic activity of five plants used in traditional Mexican medicine. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 22-28.
- Gazda, V.E., Carneiro, M.R.G., Barbi, N.S., Paumgarten, F.J.R. 2006. Toxicological evaluation of an ethanolic extract from *Chiococca alba* roots. *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 187–195.
- Gemelli, T.F., Prado, L.S., Santos, F.S., Souza, A.P., Guecheva, T.N., Henriques, J.A.P., Ferraz, A.B.F., Corrêa, D.S., Dihl, R.R., Picada, J.N. 2015. Evaluation of safety of *Arrabidaea chica* verlot (Bignoniaceae), a plant with healing properties. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 78, 1170–1180.
- Ghazali, A.R., Abdullah, R., Ramli, N., Rajab, N. F., Ahmad-Kamal, M.S., Yahya, N.A. 2011. Mutagenic and antimutagenic activities of *Mitragyna speciosa* Korth extract using Ames test. *Journal of medicinal plant research*, 5, 1345-1348.
- Gontijo, D.C., Nunes, L.G., Souza, C.J.A, Fietto, L.G., Leite, J.P.V. 2012. Evaluation of the genotoxic potential of ethanolic extracts of stem bark and leaves of *Bathysa cuspidata* (A.St.-Hil.) Hook. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 33, 355-359.
- Gontijo, D.C., Fietto, L.G., LEITE, J.P.V. 2014. Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante, antimutagênica e toxicológica do extrato aquoso das folhas de *Ocimum gratissimum* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16, 874-880.

- González, I.A., Carrancá, A.M.G., Garrido, J.C., Pichardo, C.O. 2018. Cytotoxic effect of *Kalanchoe flammea* and induction of intrinsic mitochondrial apoptotic signaling in prostate cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 10, 133-147.
- Hayder, N., Skandrani, I., Kilani, S., Bouhlel, I., Abdelwahed, A., Ben Ammar, R., Mahmoud, A., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. 2008. Antimutagenic activity of *Myrtus communis* L. using the *Salmonella* microsome assay. *South African Journal of Botany*. 74, 121–125.
- Higashimoto, M., Purintrapiban, J., Kataoka, K., Kinouchi, T., Vinitketkumnuen, U., Akimoto, S., Matsumoto, H., Ohnishi, Y. 1993. Mutagenicity and antimutagenicity of extracts of three spices and a medicinal plant in Thailand. *Mutation Research*, 303, 135-142.
- Hong, C.E., Lyu, S.Y. 2011. Genotoxicity detection of five medicinal plants in Nigéria. *The Journal of Toxicological Sciences*, 36, 87-93.
- Hong, H.C., He, J., Eckert, R., Wu, X.Y., Li, L., Tian, Y., Lux, R., Shuffer, J.A., Gelman, F., Menten, J., Spackman, S., Bauer, J., Maxwell, A.H., Shi, W. 2011. Development and evaluation of a safe and effective sugar-free herbal lollipop that kills cavity-causing bacteria. *International Journal of Oral Science*, 3, 13-20.
- Huang, Y.N., Zhao, Y.L., Gao, X.L., Zhao Z.F, Jing Z., Zeng W.C., Yang, R., Peng R., Tong, T., Wang, L.F, Cen J.Q., Gao, H. 2010. Intestinal glucosidase inhibitory activity and toxicological evaluation of *Nymphaea stellata* flowers extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 306–312.
- Huang, M.H., Tai, H.M., Wang, B.S., Chang, L.W., 2013. Inhibitory effects of water extract of *Flos Inulae* on mutation and tyrosinase. *Food Chemistry*, 139, 1015-1020.
- Hwang, E.S., Kim, G.H. 2012. Safety evaluation of *Zanthoxylum piperitum*-derived essential oil by assessing micronucleus abnormalities, mutagenicity, and chromosomal aberration. *Food Research International*, 47, 267–271.
- Hwang, Y.H., Kim, T., Cho, W.K., Yang, H.J., Kwak, D.H., Ha, H., Song, K.H., Ma, J.Y. 2012. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity assessment of *Aristolochia manshuriensis* Kom. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 412736.
- Hwang, E.S., Hee Kim, G. 2013. Safety Evaluation of *Chrysanthemum indicum* L. Flower Oil by Assessing Acute Oral Toxicity, Micronucleus Abnormalities, and Mutagenicity. *Preventive Nutrition and Food Science*, 18, 111-116.
- Hwang, Y.H., Ha, H., Ma, J.Y. 2013a. Acute oral toxicity and genotoxicity of *Dryopteris crassirhizoma*. *Journal of Ethnopharmacology*, 149,133-139.
- Hwang, Y.H., Park, H., Ma, J.Y. 2013b. *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of *Acer tegmentosum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 99-105.
- Hwang, Y.H., Yang, H.J., Yim, N.H., Ma, J.Y. 2017. Genetic toxicity of *Epimedium koreanum* Nakai. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 87–90.

- Inboot, W., Taya, S., Chailungka, A., Meepowpan, P., Wongpoomchai, R. 2012. Genotoxicity and antigenotoxicity of the methanol extract of *Cleistocalyx nervosum* var. *paniala* seed using a *Salmonella* mutation assay and rat liver micronucleus tests. *Molecular & Cellular Toxicology*, 8, 19-24.
- Insuan, O., Chariyakornkul, A., Rungrote, Y., Wongpoomchai, R. 2017. Antimutagenic and Antioxidant Activities of Thai Rice Brans. *Journal of cancer prevention*, 22, 89-97.
- Jaiswal, S., Mansa, N., Prasad, M.S.P., Jena, B.S., Negi, P.S. 2014. Antibacterial and antimutagenic activities of *Dillenia indica* extracts. *Food Bioscience*, 5, 47-53.
- Jeong, M-K., Cho, C.K., Yoo, H.S. 2016. General and Genetic Toxicology of Enzyme-Treated Ginseng Extract. *Journal of Pharmacopuncture*, 19, 213-224.
- Jeyadevia, R., Sivasudhaa, T., Rameshkumara, A., Harnlyb, J.M., Linb, L.Z. 2013. Phenolic profiling by UPLC–MS/MS and hepatoprotective activity of *Cardiospermum halicacabum* against CCl₄ induced liver injury in Wistar rats, *Journal of Functional Food*, 5, 289-298.
- Jianling, J., Zhao, H., Hui, Z., Yan, Z., Yupin, C., Peiji, G. 2014. Evaluation of the mutagenicity of a traditional Chinese medicine *Radix isatidis* root by modified Ames tests, SOS/umu and SOS/rec tests. *Toxicology Research*, 3, 161.
- Junior, R.W.K., Mendes, O., Roy, S., McQuate, R.S., Kraska, R. 2016. General and Genetic Toxicology of Guayusa Concentrate (*Ilex guayusa*). *International Journal of Toxicology*, 35, 222-242.
- Kang, C.K., Hah, D.S., Kim, C.H., Kim, E., Kim, J.S. 2012. Evaluation of the Genotoxicity of Extracts of *Houttuynia cordata* Thunb. *The American Journal of Chinese Medicine*, 40, 1019-1032.
- Kaur, R., Sharma, U., Singh, B., Arora, S. 2011. Antimutagenic and Antioxidant Characteristics of *Chukrasia tabularis* A Juss Extracts. *International Journal of Toxicolog*, 30, 21-24.
- Kaur, D., Kaur, A., Arora, S. 2016a. Delineation of attenuation of oxidative stress and mutagenic stress by *Murraya exótica* L. leaves. *SpringerPlus*, 5, 1-13
- Kaur, S., Kumar, M., Kaur, P., Kaur, V., Kaur, S. 2016b. Modulatory effects of *Cassia fistula* fruits against free radicals and genotoxicity of mutagens. *Food and Chemical Toxicology*, 98, 220-231.
- Khan, A.J., Jalal, A.J., Ioannides, C., Moselhy, S.S. 2011. Impact of aqueous doash extract on urinary mutagenicity in rats exposed to heterocyclic amines. *Toxicology and Industrial Health*, 29, 142-148.
- Kilani, S., Ammar, R.B., Bouhleb, I., Abdelwahed, A., Hayder, N., Mahmoud, A., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. 2005. Investigation of extracts from (Tunisian) *Cyperus rotundus* as antimutagens and radical scavengers. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20, 478–484.

- Kim, J.H., Koo, Y.C., Hong, C.O., Yong, Y.S., Jun, W., Won Lee, K. 2012. Mutagenicity and Oral Toxicity Studies of *Terminalia chebula*, *Phytotherapy Research*, 26, 39-47.
- Konan, N.A., Bacchi, E.M., Lincopan, N., Varela, S. D., Varanda, E. A. 2007. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 30-38.
- Kothari, S.C., Shivarudraiah, P., Venkataramaiah, S.B., Koppolu, K.P., Gavara, S., Jairam, R., Krishna, S., Chandrappa, R. K., Soni, M.G. 2011. Safety assessment of *Cissus quadrangularis* extract (CQR-300): Subchronic toxicity and mutagenicity studies. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 3343- 3357.
- Krifa, M., Bouhleb, I., Skandrani, I., Ghedira, L.C., Ghedira, K. 2013. Antioxidant, mutagenic and antimutagenic activities of an aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall. *Drug and Chemical Toxicology*, 37, 76-82.
- Lee, W.H., Choi, S.H., Kang, S.J., Song, C.H., Jin, P.S., Joon, L.Y., KU, S.K. 2016. Genotoxicity testing of *Persicariae Rhizoma* (*Persicaria tinctoria* H. Gross) aqueous extracts. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12, 123-134.
- Leme, D.E.M, Rodrigues, A.B., Almeida-Apolônio, A.A, Dantas, F.G.S., Negri, M.F.N., Svidzinski, T.I.E., Mota, J.S., Cardoso, C.A.L., Oliveira, K.M.P. 2017. *In vitro* control of uropathogenic microorganisms with the ethanolic extract from the leaves of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 4687154.
- León K. I. L., Herrera-Martínez, M., Ramirez-Mares, M. V., Hernández-Carlos, B. 2017. Evaluation of anticancer potential of eight vegetal species from the state of Oaxaca. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative*, 14, 61-73.
- Li, B., Jin, Y., Xu, Y., Wu, Y., Xu J., Tu, Y. 2011. Safety evaluation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) flower extract: Assessment of mutagenicity, and acute and subchronic toxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 583–590.
- Li, C.H., Liao, J.W., Liao, P.L., Huang, W.K., Tse, L.S., Lin, C.H., Kang, J.J., Cheng, Y.W. 2013. Evaluation of Acute 13-Week Subchronic toxicit and genotoxicity of the powdered root of Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 102987.
- Li, G., Wang, Q., Qian, Y., Zhao, X. 2014. Antioxidant, Antimutagenic, and *in vivo* Buccal Mucosa Cancer Preventive Effects of Fructus Malvae. *Food Science and Biotechnology*, 23, 1341-1348.
- Li, Y., Zhang, X., Liang, C., Hu, J., Yu, Z. 2018. Safety evaluation of mulberry leaf extract: Acute, subacute toxicity and genotoxicity studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 95, 220–226.
- Lima, D.C.S., Silva, C.R., Sampaio, B.L., Paula, J.R., Chen-Chen, L. 2013. Antigenotoxic, and anticytotoxic activities of an ethanolic extract of *Lafloensia pacari* (Lythraceae) stem bark in bacteria and mice. *Genetics and Molecular Research*, 12, 3887-3896.

- Liman, R., Gökçe, U.G., Akyıl, D., Eren, Y., Konuk, M. 2011. Evaluation of genotoxic and mutagenic effects of aqueous extract from aerial parts of *Linaria genistifolia* subsp. *Genistifolia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22, 541-548.
- Liman, R., Eren, Y., Akyıl, D., Konuk, M. 2012. Determination of mutagenic potencies of aqueous extracts of *Thermopsis turcica* by Ames test. *Turkish Journal of Biology*, 36, 85-92.
- Lopes, L.C., Albano, F., Laranja, G.A.T., Alves, L.M., Silva, L.F.M., Souza, G.P., Araujo, I.M., Neto, J.F.N., Felzenszwalb, I., Kovary, K. 2000. Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves, *Toxicology Letters*, 116, 189-198.
- Lopes, M.I.L., Saffi, J., Echeverrigaray, S., Henriques, J.P., Salvador, M. 2004. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 437-445.
- López, O.P., Vargas, F.D. 2011. Bio-guided fractionation of the antimutagenic activity of methanolic extract from the fruit of *Randia echinocarpa* (Sessé et Mociño) against 1-nitropyrene, *Food Research International*, 44, 3087-3093.
- Lu, B., Li, M., Zhou, F., Huang, W., Jiang, Y., Mao, S., Zhao, Y., Lou, T. 2016. The *Osmanthus fragrans* flower phenylethanoid glycoside-rich extract: Acute and subchronic toxicity studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 187, 205–212.
- Luseba, D., Elgorashi, E.E., Ntloedibe, D.T., Van Staden J. 2007. Antibacterial, anti-inflammatory and mutagenic effects, of some medicinal plants used in South Africa for the treatment of wounds and retained placenta in livestock. *South African Journal of Botany*, 73, 378-383.
- Madikizela, B., Ndhlala, A.R., Finnie, J.F., Van Staden, J. 2012. Ethnopharmacological study of plants from Pondoland used against diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*. 141, 61-71.
- Madikizela, B., Ndhlala, A.R., Finnie, J.F., Van Staden, J. 2014. Antimycobacterial, anti-inflammatory and genotoxicity evaluation of plants used for the treatment of tuberculosis and related symptoms in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 153, 386–391.
- Mahlangu, Z.P., Botha, F.S., Madoroba, E., Chokoe, K., Elgorashi, E.E. 2017. Antimicrobial activity of *Albizia gummifera* (J.F.Gmel.) C.A.Sm leaf extracts against four *Salmonella* serovars. *South African Journal of Botany*, 108, 132–136.
- Makhafola, T.J., Elgorashi, E.E., McGaw, L.J., Verschaeve, L., Eloff, J.N. 2016. The correlation between antimutagenic activity and total phenolic content of extracts of 31 plant species with high antioxidant activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, 1-13.
- Marczewska, J., Karwicka, E., Drozd, J., Anuszewska, E., Aliwi-Ska, A., Nosov, A., Olszowska, O. 2011. Assessment of cytotoxic and genotoxic activity of alcohol extract of *Polyscias filicifolia* shoot, leaf, cell biomass of suspension culture and saponin fraction. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*, 68, 703-710.

Marques, R.C.P., Medeiros, S.R.B., Dias, C.S., Filho, J.M.B., Lima, L.F.A. 2003. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. *Mutation Research*, 20, 117-120.

Masondo, N.A., Ndhlala, A.R., Aremu, A.O., Van Staden, J., Finnie, J.F. 2013. A comparison of the pharmacological properties of garden cultivated and muthi market-sold *Bowiea volubilis*. *South African Journal of Botany*, 86, 135-138.

Mazzolin, L.P., Nasser, A.L.M., Moraes, T.M., Santos, R.C., Nishijima, C.M., Santos, F.V., Varanda, E.A., Bauab, T.M., Rocha, L.R.M., Di Stasi, L.C., Vilegas, W., Lima, C.A.H. 2010. *Qualea parviflora* Mart.: An integrative study to validate the gastroprotective, antidiarrheal, antihemorrhagic and mutagenic action. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 508-514

Mendonça, E. D., Silva, J., Santos, M.S., Carvalho, P., Papke, D.K.M., Ortmann, C.F., Picada, J.N., Reginatto, F.H., Ferraz, A.B.F. 2016. Genotoxic mutagenic and antigenotoxic effects of *Cecropia pachystachya* Trécul aqueous extract using *in vivo* and *in vitro* assays. *Journal of Ethnopharmacology*, 193, 214–220.

Menezes, A.P.S., Silva, J., Fisher, C., Silva, F.R., Reyes, J.M., Picada, J. N., Ferraz, A.G., Corrêa, D. S., Premoli, S.M., Dias, J.F., Souza, C.T., Ferraz, A.B.F. 2016. Chemical and toxicological effects of medicinal *Baccharis trimera* extract from coal burning área. *Chemosphere*, 146, 396-404.

Mininel, F.J., Junior, C.S.L., Espanha, L.G., Resende, F.A., Varanda, E.A., Leite, C.Q.F., Fujimura, C.Q., Vilegas, W., Santos, L.C. 2014. Characterization and Quantification of Compounds in the Hydroalcoholic Extract of the Leaves from *Terminalia catappa* Linn. (Combretaceae) and Their Mutagenic Activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, ID 676902.

Mirzaei, A., Toori, M.A., Mirzaei, N., Shirazi, G.R. 2013. Antioxidant, Antimicrobial and Antimutogenic Potential of 4 Iranian Medicinal Plants. *Life Science Journal*, 10, 1885-1991.

Mocan, A., Zengin, G., Simirgiotis M., Schafberg, M., Mollica, A., Vodnar, D.C., Crişan, G., Rohn, S. 2017. Functional constituents of wild and cultivated Goji (*L. barbarum* L.) leaves: phytochemical characterization, biological profile, and computational studies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32, 153-168.

Monteiro, M.H.D., Gomes-Carneiro, M.R., Felzenszwal, I., Chahoud, I., Paumgarten, F.J.R. 2001. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*, *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 149-157.

Montero, A.C.R., Ferrer, J.P., López, A.G., Ordoñez, M.G., Gobin, E.S., Hurtado Y.V. 2007. Genotoxicidad de *Indigofera suffruticosa* Mill. (añil cimarrón). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 12.

Moosavi, M., Jalili, A., Siahpoosh, A., Farajzadeh-Shikh, A. 2013. Assessing mutagenicity of methanolic extract of *abrus precatorius* seeds using Ames bioassay. *Journal of medical sciences*, 13, 118-123.

- Moreno, A., Nuño, G., Cuello, S., Sayago, J. E., Alberto, M.R., Zampini, C., Isla M.I. 2015. Anti-inflammatory, Antioxidant and Antimicrobial Activity Characterization and Toxicity Studies of Flowers of “Jarilla”, a Medicinal Shrub from Argentina. *Natural Product Communications*, 10, 991-994.
- Morffi, J., Rodeiro, I., Hernández, S.L., González L., Herrera J., Aguirre J.J.E. 2012. Antimutagenic Properties of *Mangifera indica* L. Stem Bark Extract and Evaluation of its Effects on Hepatic CYP1A1. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67, 223-228.
- Muhammad, H., Gomes-Carneiro, M.R., Poc, K.S., De-Oliveira, A.C.A.X., Afzan, A., Sulaiman, S.A., Ismail, Z., Paumgarten, F.J.R. 2011. Evaluation of the genotoxicity of *Orthosiphon stamineus* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 647-653.
- Mulaudzi, R.B., Ndhkala, A.R., Kulkarni, M.G., Van Staden, J. 2012. Pharmacological properties and protein binding capacity of phenolic extracts of some Venda medicinal plants used against cough hand fever. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 185–193.
- Mulaudzi, R.B., Ndhkala, A.R., Kulkarni, M.G., Finnie, J.F., Van Staden, J. 2013. Anti-inflammatory and mutagenic evaluation of medicinal plants used by Venda people against venereal and related diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 146, 173-179.
- Nag, D., Ghosh, M., Mukherjee, A. 2015. Antimutagenic and genoprotective effects of *Saraca asoca* bark extract. *Toxicology and Industrial Health*, 31, 696-703.
- Ndhkala, A.R., Amoo, S.O., Stafford, G.I., Finnie, J.F., Van Staden, J. 2009. Antimicrobial, anti-inflammatory and mutagenic investigation of the South African tree aloe (*Aloe barberae*). *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 404-408.
- Ndhkala, A.R., Finnie, J.F., Van Staden, J. 2011. Plant composition, pharmacological properties and mutagenic evaluation of a commercial Zulu herbal mixture: Imbiza ephuzwato. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 663–674.
- Ning, N., Wang, Y., Zou, Z.Y., Zhang, D.Z., Wang, D.Z., Li, X.G. 2015. Pharmacological and safety evaluation of fibrous root of *Rhizoma Coptidis*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39, 59-69.
- Nogueira, M.E.I., Passoni, M.H., Bispo, F.I., Longo, M.C., Cardoso, C.R.P., Santos L.C., Varanda, E.A. 2006. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella Typhimurium*. *Toxicology in vitro*, 20,361-366.
- Nogueira, N.P.A., Reis, P.A., Laranja, G.A.T., Pinto, A.C., Aiub, C.A.F., Felzenszwalb, I., Paes, M.C., Bastos, F.F., Bastos, V.L.F.C., Sabino, K.C.C., Coelho M.G.P. 2011. *In vitro* and *in vivo* toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 138-513-522.
- Ntuli, S.S.B.N., Gelderblom, W.C.A., Katerere, D.R. 2018. The mutagenic and antimutagenic activity of *Sutherlandia frutescens* extracts and marker compounds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, 1-10.

- Nunes, L.G., Gontijo, D.C., Souza, C.J.A., Fietto, L.G., Carvalho, A.F, Leite, J.P.V. 2012. The mutagenic, DNA-damaging and antioxidative properties of bark and leaf extracts from *Coutarea hexandra* (Jacq.) K. Schum. *Environmental toxicology and pharmacology*, 33, 297-303.
- Nuno, G., Alberto. M.R., Arena, M.E., Zampini, I.C., Isla, M.I. 2016. Effect of *Zuccagnia punctata* Cav. (Fabaceae) extract on pro-inflammatory enzymes and on planktonic cells and biofilm from *Staphylococcus aureus*. *Toxicity studies. Saudi Journal of Biological Sciences*, 2016.
- Nuño, G., Zampini, I.C., Ordoñez, R.M., Alberto, M.R., Arias, M.E., Isla M. 2012. Antioxidant/Antibacterial Activities of a Topical Phytopharmaceutical Formulation Containing a Standardized Extract of *Baccharis incarum*, an Extremophile Plant Species from Argentine Puna. *Phytotherapy Research*, 26, 1759-67.
- Obaseiki-Ebor, E.E., Odukoya, K., Telikepalli, H., Mitscher, L.A., Shankel, D.M. 1993. Antimutagenic activity of extracts of leaves of four common edible vegetable plants in Nigeria (West Africa). *Mutation Research*, 302, 109-117.
- Odendaal, A.Y., Deshmukh, N.S., Marx, T.K., Schauss, A.G., Endres, J.R., Clewell, A.E. 2013. Safety Assessment of a Hydroethanolic Extract of *Caralluma Fimbriata*. *International Journal of Toxicology*, 32, 385-394.
- Okem, A., Finnie, J.F., Van Staden, J. 2012. Pharmacological, genotoxic and phytochemical properties of selected South African medicinal plants used in treating stomach-related ailments. *Journal of Ethnopharmacology*, 139, 712-720.
- Okmen, G., Balpınar, N. 2017. The biological activities of *Hypericum perforatum* L. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative*, 14, 213-218.
- Olejniak, A., Olkowicz, M., Kowalska, K., Rychlik, J., Dembczynski, R., Myszkka, K., Juzwa, W., Białaś, W., Moyer, M.P. 2016. Gastrointestinal digested *Sambucus nigra* L. fruit extract protects *in vitro* cultured human colon cells against oxidative stress, *Food Chemistry*, 197, 648–657.
- Oliveira, N.M.S., Resende, M.R., Morales, D.A., Umbuzeiro, G.R., Boriollo, M.F. G. 2016. *In vitro* mutagenicity assay (Ames test) and phytochemical characterization of seeds oil of *Helianthus annuus* Linné (sun flower). *Toxicology Reports*, 3, 733-739.
- Ortega, Y.H., Mosquera, D.M.G., Galapththi, S., Santos, B.T., González, G.S., Foubert, K., Pieters, L., Calderon, P.B., Apers, S. 2016. Safety assessment of atraditionally used extract from leaves of *Boldoa purpurascens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 192, 302–308.
- Özbek, T., Güllüce, M., Açar, G., Adıgüzel, A., Özkan, H., Şahin, F., Barış, Ö. 2008a. Investigaion of the antimutagenic effects of metanol extract of *Astragalus* L. species growing in eastern anatolia region of Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 17, 291-296.
- Özbek T., Güllüce M., Şahin F. , Özkan H., Sevsay S., Barış Ö. 2008b. Investigation of the Antimutagenic Potentials of the Methanol Extract of *Origanum vulgare* L. subsp. vulgare in the Eastern Anatolia Region of Turkey, *Turkish Journal of Biology*, 32, 271-276.

Ozbek, T., Gulluce, M., Adıguzel, A., Ozkan, H., Sahin, F., Orhan, F. 2009. Antimutagenic Activity of The Methanol Extract of *Helichrysum plicatum* ssp *plicatum*. ASIAN Journal of chemistry, 21, 2705-2710.

Ozkan, H., Yanmis, D., Karadayi, M., Bal, T., Baris, O., Gulluce, M. 2012. Determination of genotoxic and antigenotoxic properties of essential oil from *Ferula orientalis* L. using Ames/*Salmonella* and *E. coli* WP2 bacterial test systems. Toxicology and Industrial Health, 30, 714–723.

Pedro, N.M.E., Borim, T., Nazato, V. S., Silva, M.G., Lopes, P.S., Santos, M.G., Dal Belo, C.A., Cardoso, C.R.P, Varanda, E.A., Groppo, F.C., Gerenutti, M., Franco, Y.O. 2012. *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of *Dipteryx alata* Vogel extract. BMC Complementary and Alternative Medicine, 12.

Pellati, F., Bruni, R., Righi, D., Grandini, A., Tognolini, M., Prencipe, F.P., Poli, F., Benvenuti, S., Del Rio, D., Rossi, D. 2013. Metabolite profiling of polyphenolsina *Terminalia chebula* Retzius ayurvedic decoction and evaluation of its chemopreventive activity. Journal of Ethnopharmacology, 147, 277-285.

Pereira, A.M.C.B., Farias, M.R., Vargas, V.M.F. 1996. Study of the Mutagenic Activity of Extracts of the Plant *Wilbrandia ebracteata*. Phytotherapy research, 10, 12-5 16.

Pérez, N.J.R., Ávila, M.G., Navarrete, J.S., Garibay, J.D.T., Eutimio, M.M., Hernández, T.S., Alba, M.A. 2016. Antimycotic Activity and Genotoxic Evaluation of *Citrus sinensis* and *Citrus latifolia* Essential Oils. Scientific Reports, 6, 25371.

Périco, L.L., Vieira, S.H., Beserra, F.P., Santos, R.C., Weiss, M.B., Resende, F A., RAMOS, M.A.S.M., Bonifácio, B.V., Bauab, T.M., Varanda, E.A., Gobbi, J.I.F., Rocha, L.R, Vilegas, W., Hiruma Lima, C.A. 2015. Does the gastroprotective action of a medicinal plant ensure healing effects? An integrative study of the biological effects of *Serjania marginata* Casar. (Sapindaceae) in rats. Journal of Ethnopharmacology, 172, 312–324.

Phuneerub, P., Limpanasithikul, W., Ruangrunsi, Nijisiri. 2017. *In vitro* anti-inflammatory, mutagenic and antimutagenic activities of ethanolic extract of *Clerodendrum paniculatum* root. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research, 9, 1-5.

Porto, L.C. S., Silva J., Ferraz A.B. F., Corrêa D.S., Santos M.S., Porto C.D. L., Picada J.N. 2013. Evaluation of acute and subacute toxicity and mutagenic activity of the aqueous extract of pecan shells [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch]. Food and Chemical Toxicology, 59, 579-585.

Pukalskiene, M., Slapšytė, G., Dedonytė, V., Lazutka, J.R., Mierauskienė, J., Venskutonis, P.R. 2018. Genotoxicity and antioxidant activity of five *Agrimonia* and *Filipendula* species plant extracts evaluated by comet and micronucleus assays in human lymphocytes and Ames *Salmonella*/microsome test. Food and Chemical Toxicology, 113, 303–313,

Quadros, A.P.O., Mazzeo, D.E.C., Morales, M.A.M., Perazzo, F.F., Rosa, P.C.P., Maistro, E.L. 2016. Fruit extract of the medicinal plant *Crataegus oxyacantha* exerts genotoxic and

mutagenic effects in cultured cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80, 161-170.

Quintero, S.O., Ângulo, G.L., Avila, J.M., Sylvania, Camacho, P.D., Aviña, R.V., Valenzuela, J.Á.L., Salas, N.Y.S., Vargas, F.D. 2017. Chemical composition and biological activities of *Helicteres vega* and *Heliopsis sinaloensis*. *Pharmaceutical Biology*, 55, 1473-1482.

Ramos, A., Edreira, A., Vizoso, A., Betancourt, J., López, M., Décalo, M. 1998. Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 61, 49–55.

Ramos, A., Piloto, J., Vizoso, A., Garcia, A., Lastra, H., León, H. P. 2001. Mutagenicity and Antioxidant Assessment of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl. *Phytotherapy Research*, 15, 360-363.

Ramos, A., Rivero, R., Victoria, M.C., Vizoso, A., Piloto, J., García, A. 2001. Assessment of mutagenicity in *Parthenium hysterophorus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 25-30.

Razak, M.F.A., Aidoo, K.E. 2011. Toxicity studies of *Eurycoma longifolia* (Jack) based remedial products. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4, 23-27.

Reid, K.A., Maes, J., Maes, A., Van Staden, J., De Kimpe, N., Mulholland, D.A., Verschaeve, L. 2006. Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 44-50.

Resende, F.A., Munari, C.C., Neto, M.A.B.M., Tavares, D.C., Bastos, J. K., Filho, A.A.S., Varanda, E.A. 2012. Comparative Studies of the (Anti) Mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and Artepillin C by the Bacterial Reverse Mutation Test, *Molecules*, 17, 2335-2350.

Resende, F.A., Campos, D.L., Silva, V. C., Grandis, R.A., Souza, L. P., Junior, C. S.L.J., Rocha, C.Q., Santos, L.C., Vilegas, W., Varanda, E.A. 2015. Mutagenicity and chemopreventive activities of *Astronium* species assessed by Ames test. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 72, 506–513.

Resende, F.A., Nogueira, C.H., Espanha, L.G., Boldrin, P.K., Oliveira-Hohne, A.P., Camargo, M.S., Rocha, C.Q., Vilegas, W., Varanda, E.A. 2017. *In vitro* toxicological assessment of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau: Mutagenicity and estrogenicity studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 90, 29-35.

Reyes, M.R., Reyes-Esparza J., Angeles, O.T., Rodríguez-Fragoso, L. 2010. Mutagenicity and Safety Evaluation of Water Extract of *Coriander sativum* Leaves. *Journal of food Science*, 75, T6-T12.

Reyes-Lopez, M., Villa-Trevino, S., Arriaga-Alba, M., Aleman-Lazarini, L., Rodríguez-Mendiola, M., Arias-Castro, C., Fattel-Fazenda, S., La Garza, M. 2005. The amoebicidal aqueous extract from *Castela texana* possesses antigenotoxic and antimutagenic properties. *Toxicology in vitro*, 19, 91-97.

Riazuddin, S., Malik, M.M., Nasim, A. 1987. Mutagenicity testing of some medicinal herbs. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 10, 141-148.

- Ribnicky, D.M., Poulev, A., O'Neal, J., Wnorowski, G., Malek, D.E., Jager, R., Raskin, I. 2004. Toxicological evaluation of the ethanolic extract of *Artemisia dracuncululus* L. for use as a dietary supplement and in functional foods. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 585-598.
- Rivera, G., Martins, M.T., Sanchez, P.S., Sato, M., Coelho, M.C.L., Akisue, M., Akisue, G. 1994. Genotoxicity Assessment Through the Ames Test of Medicinal Plants Commonly Used in Brazil. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, 9, 87-93.
- Rodeiro, I., Cancino, L., González, J.E., Morffi, J., Garrido, G., González R.M., Nuñez, A., Delgado, R. 2006. Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1707-1713.
- Rodríguez, M.N., Gianuzzi, L., Reta, M., Larramendy, M.L. 2010. The antimutagenic capacity of the aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Persoon. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 93, 251-260.
- Rojanapo, W., Tepsuwan, A., Siripong, P. 1990. Mutagenicity and antimutagenicity of Thai medicinal plants, 52, 447-452.
- Rolim, L.A.D.M.M., Macêdo, M. F.S., Sisenando, H.A., Napoleao, T.H., Felzenszwalb, I., Aiub, C.A. F., Coelho, L.C.B.B., Medeiros, S.R.B., Paiva, P.M.G. 2011. Genotoxicity Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Extract and Lectin. *Journal of Food Science*, 76, 53-58.
- Rossi, D., Guerrini, A., Paganetto, G., Bernacchia, G., Conforti, F., Statti, G., Maietti, S., Poppi, I., Tacchini, M., Sacchetti, G. 2013. *Croton lechleri* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil as possible mutagen-protective food ingredient against heterocyclic amines from cooked food. *Food Chemistry*, 139, 439-447.
- Sabino, K.C.C., Gayer, C.R.M., Vaz, L.C.A., Santos, L.R.L., Felzenszwalb, I., Coelho, M.G.P. 1999. *In vitro* and *in vivo* toxicological study of the *Pterodon pubescens* seed oil. *Toxicology Letters* 108, 27-35.
- Saeed, A., Sultana, B., Anwar, F., Mushtaq, M., Alkharf, K.M., Gilani, A.H. 2014. Antioxidant and antimutagenic potential of seeds and pots of green cardamom (*Elettaria cardamomun*). *International Journal of Pharmacology*, 10, 461-469.
- Saleem, U., Mahmood, S., Ahmad, B., Bashir, Saleem, M., Aftab, A.A. 2015. Estimation of genotoxic and mutagenic potential of latex and methanolic leaves extract of *Euphorbia helioscopia* by comet assay and Ames test. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5, 145-150.
- Sánchez-Lamar, A., Fonseca, G., Fuentes, J.L., Cozzir., Cundari, E., Fiore, M., Ricordy, R., Perticone, P., Degrassi, F., Salvia, R. 2008. Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 115, 416-422.
- Sannomiya, M., Cardoso, C.R.P., Figueiredo, M.E., Rodrigues, C.M., Santos, L.C., Santos, F.V., Serpeloni, J.M., Cólus, I.M.S., Vilegas, W., Varanda, E.A. 2007. Mutagenic evaluation

and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 319-326.

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

Santos, F.V., Calvo, T. R., Cólus, I.M.S., Vilegas, W., Varanda, E. A. 2010. Mutagenicity of two species of the genus *Alchornea* measured by *Salmonella* microsome assay and micronucleus test. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 382-389.

Santos, F.V., Nasser, A.L.M., Bisó, F.I., Moreira, L.M., Santos, V.J.S.V., Vilegas, W., Varanda, E.A. 2011. Genotoxicity of polar and apolar extracts obtained from *Qualea multiflora* and *Qualea grandiflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, 138, 105-110.

Santos, V.C., Longo, T.B., Garcia, A.L.H., Richter, M.F., Guecheva, T., Nikolova, H.J.A.P., All, S. 2013. Evaluation of the Mutagenicity and Genotoxicity of *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoneaceae), an Amazon Plant with Medicinal Properties. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 76, 381-390

Santos, P.E., Egito, L.C.M., Medeiros, S.R.B., Lima, L.F.A. 2014. Genotoxicity Induced by *Eugenia caryophyllata* infusion. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 71, 439-444.

Sarac, N. 2015. Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activities of *Tragopogon longirostis* var. *longirostis*, an edible wild plant in Turkey. *Indian Journal of Pharmacology*, 47, 414-418.

Sarac, N., Aysel, U., Sen B. 2015. *In vitro* antimutagenic activity of *Vitex agnus-castus* L. essential oils and ethanolic extracts. *Industrial Crops and Products*, 63, 100-103.

Saraç, N., Sem, B. 2014. Antioxidant, mutagenic, antimutagenic activities, and phenolic compounds of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis*. *Industrial Crops and Products*, 53, 60-64.

Satish, A., Kumar, R.P., Rakshith, D., Satish, S., Ahmed, F. 2013. Antimutagenic and antioxidant activity of *Ficus benghalensis* stem bark and *Moringa oleifera* root extract. *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 4, 45-48.

Seo, H.W., Suh, J.H., So, S.H., Kyung, J.S., Kim, Y.S., Han, C.K. 2017. Subacute oral toxicity and bacterial mutagenicity study of Korean Red Ginseng oil. *Journal of Ginseng Research*, 41, 595-601.

Sghaier, M.B., Bhourri, W., Bouhlel, I., Skandrani, I., Boubaker, J., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K. 2011. Inhibitory effect of *Teucrium ramosissimum* extracts on aflatoxin B1, benzo[a]pyrene, 4-nitro-o-phenylenediamine and sodium azide induced mutagenicity: Correlation with antioxidant activity. *South African Journal of Botany*, 77, 730-740.

Shafaei, A., Esmaili, K., Farsi, E., Aisha, A.F.A., Majid, A.M.S.A., Ismail, Z. 2015. Genotoxicity, acute and subchronic toxicity studies of nano liposomes of *Orthosiphon*

stamineus ethanolic extract in Sprague Dawley rats. BMC Complementary and Alternative Medicine, 15, 1-14.

Sharif, A., Akhtar, M.F., Akhtar, B., Saleem, A., Manan, M., Shabbir, M., Ashraf, M., Peerzada, S., Ahmed, S., Raza, M. 2017. Genotoxic and cytotoxic potential of whole plant extracts of *Kalanchoe laciniata* by Ames and MTT assay. EXCLI Journal, 16, 593-601.

Sharififar, F., Noudeh, G.D., Moshafi, M.H., Ohadi, M., Basir, M.Z., Yazdanpanah, E., Yusefian, S. 2015. Antimutagenic activity of major fractions of *Zataria multiflora* Boiss by Ames method. Asian Journal of Pharmaceutics, 9, 195-199.

Sharifi-Rad M., Tayeboon, G.S., Miri, A., Sharifi-Rad, M., Setzer, W.N., Fallah, F., Kuhestani, K., Tahanzadeh, N., Sharifi-Rad, J. 2016. Mutagenic, antimutagenic, antioxidant, anti-lipoxygenase and antimicrobial activities of *Scandix pecten-veneris* L. Cellular and Molecular Biology, 62, 8-16.

Sharma, N., Trikha, P., Athar, M., Raisuddin, S. 2000. *In vitro* inhibition of carcinogeninduced mutagenicity by and *Emblica officinalis*. Drug and Chemical Toxicology, 23, 477-484.

Sharma, S., Sharma, S., Pal, Vig, A. 2016. Evaluation of antimutagenic and protective effects of *Parkinsonia aculeata* L. leaves against H₂O₂ induced damage in pBR322 DNA, Physiology and Molecular Biology of Plants, 22, 17–31.

Shim, S.M., Choi, M.H, Kim, G.H. 2008. Safety evaluation of *Elsholtzia splendens* extracts: Assessment of acute toxicity and mutagenicity. Food and Chemical Toxicology, 46, 1042-1047.

Shin, K.Y., Won, B.Y., Há, H.J., Yun, Y.S., Lee, H.G. 2015. Genotoxicity studies on the root extract of *Polygala tenuifolia* Willdenow. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 71, 365–370.

Silva, M.A., Siqueira, A.P.O., Sannomiy, A. M., Sano, P.T., Varanda, E.A., Vilegas, W., Santos, L.C. 2007. Flavonoids and a Naphthopyranone from *Eriocaulon ligulatum* and Their Mutagenic Activity. Pharmaceutical Society of Japan, 55, 1635-1639.

Silva, R.C., Pereira, A.C.F., Alves, R.P.S., Temenouga, N.G., Henriques J.A.P., Silva, V. A., Gonçalves, G.F., Pereira, M.S.V., Gomes, I.F., Freitas, A.F.R., Diniz M.F.F.M., Pessôa, H.L.F. 2012. Assessment of mutagenic, antimutagenic and genotoxicity effects of *Mimosa tenuiflora*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 23, 329-334.

Silva-Oliveira, R.J., Lopes, G.F., Camargos, L.F., Ribeiro, A.M., Santos, F.V., Severino, R.P., Severino, V.G.P., Terezan, A.P., Thomé, R.G., Santos, H.B., Reis, R. M., Ribeiro, R.I.M.A. 2016. *Tapirira guianensis* Aubl. Extracts Inhibit Proliferation and Migration of Oral Cancer Cells Lines. International Journal of Molecular Sciences, 17, 1839.

Sohn, D.H., Kim, Y.C., Oh, S.H., Park, E.J., Li, X., Lee, B.H. 2003. Hepatoprotective and free radical scavenging effects of *Nelumbo nucifera*. Phytomedicine, 10, 165-169.

Sohni, Y.R., Mutangadura-Mhlanga, T., Kale, P.G. 1994. Bacterial mutagenic of eight medicinal herbes from Zimbabwe. Mutation Research, 322, 133-140.

Sripanidkulchai, B., Tattawasart, U., Laupatarakasem, P., Vinitketkumneun, U., Sripanidkulchai, K., Furihata, C., Matsushima T. 2002. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of *Phyllanthus amarus*. *Phytomedicine*, 9, 26-32.

Stajkovic, O., Beric-Bjedov, T., Mitic-Culafic, D., Stankovic, S., Vukovic-Gadic B., Simic, D., Knezevic-Vukievic, J. 2007. Antimutagenic Properties of Basil (*Ocimum basilicum* L.) in *Salmonella* Typhimurium TA100. *Food Technol. Biotechnol*, 45, 213-217.

Suganthy, N., Karthikeyan, K., Archunan, G., Pandian, S. K., Devi, K.P. 2014. Safety and toxicological evaluation of *Rhizophora mucronata* (a mangrove from Vellar estuary, India): assessment of mutagenicity, genotoxicity and in vivo acute toxicity. *Molecular Biology Reports*, 41, 1355-1371.

Suganthy, N., Muniyasamy, S., Archunan, G. 2018. Safety assessment of methanolic extract of *Terminalia chebula* fruit, *Terminalia arjuna* bark and its bioactive constituent 7-methyl gallic acid: *In vitro* and *in vivo* studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 92, 347–357.

Sun, J., Gao, G., Gao, Y., Xiong, L., Li, X., Guo, J., Zhang, Y. 2013. Experimental Research on the *in Vitro* Antitumor Effects of *Crataegus sanguinea*. *Cell Biochem Biophys*, 67, 207-2013.

Tabach, R., Almeida, J.M.D., Carlini, E.A. 2017. Pharmacological and Toxicological Study of *Maytenus ilicifolia* Leaf Extract. Part I Preclinical Studies. *Phytotherapy Research*, 31, 915–920.

Taherkhani, M. 2014. Mutagenic and antimutagenic activities of *Artemisia absinthium* volatile oil by the bacterial reverse mutation assay in *Salmonella* Typhimurium strains TA98 and TA100. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, 840-844.

Taherkhani, M. 2016. Chemical Constituents, Antimicrobial, Cytotoxicity, Mutagenic and Antimutagenic Effects of *Artemisia ciniformis*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 15, 471-481.

Tanaka, M., Yamada, M., Toida, T., Iwatsuki, K. 2012. Safety Evaluation of Supercritical Carbon Dioxide Extract of *Aloe vera* Gel. *Journal of Food Science*, 77, T2-9.

Tatsuzaki, J., Jinwei, Y., Kojo, Y., Mine, Y., Ishikawa, S., Mochizuki, M., Inami K. 2014. Antimutagenicity Screening of Extracts from Medicinal and Edible Plants against N-Methyl-N-nitrosourea by the Ames Assay. *Genes and Environment*, 36, 39-46.

Thomé, R.G., Santos, H.B., Santos, F.V., Oliveira, R.J.S., Camargos, L.F. Pereira, M.N., Longatti, T.R., Souto, C.M., Franco, C.S., Schüffner, R.O.A., Ribeiro, R.I. M.A. 2012. Evaluation of healing wound and genotoxicity potentials from extracts hydroalcoholic of *Plantago major* and *Siparuna guianensis*. *Experimental Biology and Medicine*, 237, 1379-1386.

Tsai, Y.L., Chiou, S.Y., Chan, K.C., Sung, J.M., Lin, S.D. 2012. Caffeic acid derivatives, total phenols, antioxidant and antimutagenic activities of *Echinacea purpurea* flower extracts, *Food Science and Technology*, 46, 169-176.

Tshepiso, J., Makhafola, L. J., McGaw, Jacobs, N.E. 2014. *In vitro* cytotoxicity and genotoxicity of five *Ochna* species (Ochnaceae) with excellent antibacterial activity. South African Journal of Botany, 91, 9-13.

Tsuboy, M.S., Cristina, M.J., Ferreira, D.T., Ferraz, E.R.A., Chequer, F.M.D., Oliveira, D.P., Ribeiro, L.R., Mantovani, M.S. 2010. Evaluation of extracts from *Coccoloba mollis* using the *Salmonella*/microsome system and *in vivo* tests. Genetics and Molecular Biology, 33, 52-548.

Uysal, A., Zengin, G., Mollica, A., Gunes, E., Locatelli, M., Yilmaz, T., Aktumsek, A. 2016. Chemical and biological insights on *Cotoneaster integerrimus*: A new epicatechin source for food and medicinal applications. Phytomedicine, 23, 979-988.

Valent, G.U., Roubicek, D.A., Haebisch, E.M.A.B. 1999. Mutagenic and Antimutagenic Evaluation of the Juice of the Leaves of *Bryophyllum calycinum* (*Kalanchoe pinnata*), a Plant with Antihistamine Activity. Environmental and Molecular Mutagenesis, 33, 325-327.

Varanda, E.A., Pozetti, G.L., Lourenco, M.V., Vilegas, W., Raddi, M.S.G. 2002. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the *Salmonella*/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. Journal of Ethnopharmacology, 81, 257-264.

Verschaeve, L., Van Staden, J. 2008, Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 119, 575-587.

Verschaeve, L., Kestens, V., Tylora, J.L.S., Elgorashi, E.E., Maes, A., Van Puyvelde L., Kimpe N. D., Van Staden, J. 2004. Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. Toxicology in Vitro, 18, 29-35.

Vidal, L. S., Alves, A. M., Kuster, R. M., Lage C., Leitão, A. C. 2010. Genotoxicity and mutagenicity of *Echinodorus macrophyllus* (chapéu-de-couro) extract. Genetics and Molecular Biology, 33, 549-557.

Vijayan, V., Tiwari, P.K., Meshram, G.P. 2013. Inhibitory effects of neem seed oil and its extract on various direct acting and activation-dependant mutagens-induced bacterial mutagenesis. Pharmaceutical Biology, 51, 1525-1530.

Vijayasteltar, L., Gopakumar, G.N., Maliakel, B., Kuttan, R., Krishnakumar I.M. 2016. Safety assessment of a standardized polyphenolic extract of clovebuds: Subchronic toxicity and mutagenicity studies. Toxicology Reports, 3, 439-449.

Vilar, J.B., Ferri, P.H., Chen-Chen, L. 2011. Genotoxicity investigation of araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test. Brazilian Journal of Biology, 71.

Vinitketkumnuen, U., Puatanachokchai, R., Kongtawelert, P., Lertprasertsuke, N., Matsushima, T. 1994. Antimutagenicity of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) to various known mutagens in salmonella mutation assay. Mutation Research, 341, 71-75.

Vinitketkumnuen, U., Charoenkunathum, W., Kongtawelert, P., Lertprasertsuke, N., Picha, P., Matsushima, T. 1996. Antimutagenicity and DT-Diaphorase Inducer Activity of the Thai Medicinal Plant, *Murdannia loriformis*. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 4, 45-52.

Vinod, V., Tiwari, P.K., Meshram, G.P. 2011. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of neem (*Azadirachta indica*) seed oil in the *in vitro* Ames *Salmonella*/microsome assay and *in vivo* mouse bone marrow micronucleus test. *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 931–937.

Vukovic'-Gac'ic', B., Nikc'evic', S., Beric'-Bjedov, B., Knez'evic'-Vukc'evic', J., Simi, D. 2006. Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1730–1738.

Wang, B.S., Tang, C.H., Chiu, C.K., Huang, M.H. 2012. Inhibitory effects of water extract from longan twigs on mutation and nitric oxide production. *Food Chemistry*, 135, 440-445.

Wongwattanasathien, O., Kangsadalampai, K., Tongyonk, L. 2010. Antimutagenicity of some flowers grown in Thailand. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1045–1051.

Yen, G.C., Duh, P.D., Hung, Y.L. 2001. Contributions of Major Components to the Antimutagenic Effect of Hsian-tso (*Mesona procumbens* Hemsl.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5000-5004.

Yun, J.W., Kim, S.H., Kim, Y.S., You, J.R., Cho, E.Y., Yoon, J.H., Kwon, E., Ahn, J.H., Jang, J., Che, J.H., Kang, B.C. 2017a. A comprehensive study on *in vitro* and *in vivo* toxicological evaluation of *Artemisia capillaris*, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 88, 87-95.

Yun, J.W., Kim, Y.S., Kwon, E., Kim, S.H., You, J.R., Kim, H.H., Che, J.H., Kang, B.C. 2017b. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* genotoxicity of *Angelica acutiloba* in a standard battery of assays, *Laboratory Animal Research*, 33, 231-236.

Yun, J.W., You, J.R., Kim, Y.S., Kim, S.H., Cho, Y., Yoon, J.H., Kwon, E., Jang, J.J., Park, J.S., Kim, H.C., Che, J.H., Kang, B.C.H.E., Che, J.H., Kang, B.C. 2018. *In vitro* and *in vivo* safety studies of cinnamon extract (*Cinnamomum cassia*) on general and genetic toxicology. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 95, 115–123.

Zahin, M., Ahmad, I., Aqil, F. 2010. Antioxidant and antimutagenic activity of *Carum copticum* fruit extracts. *Toxicology in Vitro*, 24, 1243–1249.

Zahin, M., Ahmad, I., Aqil, F. 2017. Antioxidant and antimutagenic potential of *Psidium guajava* leaf extracts. *Drug and Chemical Toxicology*, 40, 146-153.

Zahin, M., Aqil, F., Husain, F.M., Ahmad, I. 2013. Antioxidant Capacity and Antimutagenic Potential of *Murraya koenigii*. *BioMed Research International*, 2013, 263509.

Zhang, Q., Yang, H., Li, Y., Liu, H., Jia, X. 2017. Toxicological evaluation of ethanolic extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: Genotoxicity and subchronic oral toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 86, 253-259.

Zin, S.R.M., Mohamed Z., Alshawsh, M. A., Wong, W.F., Kassim, M.N. 2018. Mutagenicity evaluation of *Anastatica hierochuntica* L. aqueous extract *in vitro* and *in vivo*. *Experimental Biology and Medicine*, 243, 375-385.






5.2 Artigo: A Promising Copper(II) Complex as Antifungal and Antibiofilm Drug against Yeast Infection

Artigo publicado no periódico “Molecules” (Qualis B1 em Medicina II e Fator de impacto 3.098).

Link para as normas da revista: <https://www.mdpi.com/journal/molecules/instructions>

Article

A Promising Copper(II) Complex as Antifungal and Antibiofilm Drug against Yeast Infection

Fabiana Gomes da Silva Dantas ¹ , Adriana Araújo de Almeida-Apolonio ² ,
Renata Pires de Araújo ³ , Lis Regiane Vizolli Favarin ⁴, Pamella Fukuda de Castilho ¹,
Fernanda de Oliveira Galvão ¹, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski ⁵ ,
Gleison Antônio Casagrande ^{4,*}  and Kelly Mari Pires de Oliveira ^{1,6,*}

¹ Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS 79804-970, Brazil; fabianasilva@ufgd.edu.br (F.G.d.S.D.); pamellafcastilho@gmail.com (P.F.d.C.); feergalvao@hotmail.com (F.d.O.G.)

² Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS 79070-900, Brazil; aaraujo.a@hotmail.com

³ Faculty of Exact Sciences and Technology, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS 79804-970, Brazil; renataaraujo@ufgd.edu.br

⁴ Institute of Chemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS 79074-460, Brazil; lisregiane@hotmail.com

⁵ Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR 87020-900, Brazil; terezinha.svidzinski@gmail.com

⁶ Faculty of Biological and Environmental Science, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS 79804-970, Brazil

* Correspondence: gleisoncasag@gmail.com (G.A.C.); kellyoliveira@ufgd.edu.br (K.M.P.d.O.); Tel.: +55-067-3345-3595 (G.A.C.); +55-067-3410-2220 (K.M.P.d.O.)

Received: 9 June 2018; Accepted: 26 June 2018; Published: 26 July 2018



Abstract: The high mortality rate of candidemia and the limited option for the treatment of *Candida* spp. infection have been driving the search for new molecules with antifungal property. In this context, coordination complexes of metal ions and ligands appear to be important. Therefore, this study aimed to synthesize two new copper(II) complexes with 2-thiouracil and 6-methyl-2-thiouracil ligands and to evaluate their mutagenic potential and antifungal activity against *Candida*. The complexes were synthesized and characterized by infrared vibrational spectroscopy, CHN elemental analysis, UV-Vis experiments and ESI-HRMS spectrometry studies. The antifungal activity was evaluated by broth microdilution against 21 clinical isolates of *Candida* species. The mutagenic potential was evaluated by the Ames test. The complexes were Cu(Bipy)Cl₂(thiouracil) (Complex 1) and Cu(Bipy)Cl₂(6-methylthiouracil) (Complex 2). Complex 1 showed fungicidal and fungistatic activities against all isolates. Furthermore, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) from 31 to 125 µg/mL and inhibition percentage of 9.9% against the biofilms of *C. krusei* and *C. glabrata* were demonstrated. At the concentrations tested, complex 1 exhibited no mutagenic potential. Complex 2 and the free ligands exhibited no antifungal activity at the concentrations evaluated. Since complex 1 presented antifungal activity against all the tested isolates and no mutagenic potential, it could be proposed as a potential new drug for anti-*Candida* therapy.

Keywords: antifungal; ames test; biofilm; copper(II); 2-thiouracil

1. Introduction

Candida species are one of the most important opportunistic fungal pathogens worldwide. These yeasts are part of the normal microbiota in the human gastrointestinal, respiratory, and

reproductive tracts, as well as oral cavity and skin. However, the occurrence of underlying diseases, the use of certain medications, and invasive procedures can cause the multiplication of these yeasts and result in an infectious process [1]. Consequently, *Candida* spp. can infect and cause diseases ranging from mucosal and skin lesions to invasive candidiasis [2]. Literature shows that opportunistic infection of *Candida* species has been related to the increased case of mortality and morbidity in hospitalized patients in recent years [1,3].

In addition to the predisposing factors of the host, the pathogenicity of *Candida* species is affected by their virulence factors, such as the polymorphism and production of tissue-damaging hydrolytic enzymes, such as proteases, phospholipases, and hemolysins, as well as the expression of adhesins, which are related to the biofilm formation (on host tissues or on medical device surfaces) [4]. Studies have showed that most *Candida* infections are associated with biofilm formation [5,6]. This effect contributes to the increase of resistance due to the antifungals' difficulty in penetrating the sites of infection [7], causing recurrent or chronic infections [8].

Current antifungal therapy is limited to the use of four classes of antifungal agents, namely azoles, polyenes, echinocandins and pyrimidine analogs, which are used orally, topically, and intravenously [9], with the last ones not commercialized in some countries such as Brazil. Some characteristics of these drugs restrict their use in prophylaxis, such as their fungistatic activity, which extends the required time of treatment, high toxicity, and non-specific interaction with other drugs, which increases their side effects [10]. Therefore, the pharmacokinetics of these drugs needs to be improved.

Recent years have shown increasing number of researches on the development of new antifungal molecules [11–14] with better bioavailability, safety, and more effective mechanisms of action for the treatment of infections. The coordination of metallic ions with ligands to obtain liposoluble complexes and carriers of biologically active molecules that can improve the antifungal activity [15].

Research on the chemical behavior of thiopyrimidines, such as thiouracils, is of great interest because of the various physiological roles they play [16]. This class of compounds exhibits a variety of bioactivities, including antimicrobial, antiviral, antitumor, antioxidant, and anti-inflammatory actions [17,18]. Thiouracil ligands are N, O, S donor ligands, which are efficient for use in metalation because of the varied possibilities of their coordination with the metallic centers. Copper is an essential trace element of vital physiological functions in humans. Its biological properties stimulate the development of bioactive coordination complexes [19]. Complexes composed of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , or Hg^{2+} and thiouracil ligands with antimicrobial properties have been described by Kamalakannan et al. [20]. The coordination of bioactive ligands with metal ions to potentiate their biological activities is a strategy widely used in the synthesis of new antifungal drug candidates.

Besides good therapeutic potential, this process is expected to exhibit little to no adverse reactions owing to its low toxicity [21]. Thus, evaluation of the mutagenic potential of the new compounds is relevant in their development as a single drug or in synergism with conventional antifungal agents. In this context, two new copper(II) complexes with 2-thiouracil ligands were synthesized and characterized to evaluate their antifungal activity against 21 clinical isolates of *Candida* species, as well as to evaluate their mutagenic potentials.

2. Results

2.1. Chemistry

2.1.1. Syntheses of Complex

The preparation of the promising complexes was performed including a modification in the synthetic protocols already published in the literature [22,23]. Reactions of copper(II) chloride, 2,2'-bipyridine, and the thiouracil linkers at 1:1:1 molar ratios in MeOH/THF medium resulted in two promising coordination complexes with the compositions $[\text{CuCl}_2(\text{Bipy})(\text{L}_1)]$, wherein $\text{L}_1 = 2\text{-Thiouracil}$; and $[\text{CuCl}_2(\text{Bipy})(\text{L}_2)]$, wherein $\text{L}_2 = 6\text{-methyl-2-thiouracil}$. Ligand-binder complexes were obtained as an amorphous solid of bluish-green coloration, which have presented different melting points than

the starting materials. Their CHN elemental analysis showed consistency between theoretical and experimental data, implying that the complexes obtained were of adequate degree of purity. The results were consistent with the $C_{14}H_{12}CuN_4Cl_2SO$, $C_{15}H_{15}CuN_4C_{12}SO$ molecular formulas, wherein the complexes are in their neutral form.

2.1.2. Vibrational Spectroscopy

Several published studies [16,24–26] were used to attribute the main vibrational modes of the complexes (Table 1). The infrared spectra of the complexes **1** and **2** were analyzed in comparison with that of 2-thiouracil, 6-methyl-2-thiouracil, and 2,2'-bipyridine ligands. The ν (N-H) stretching that appears in the region of 3110 to 3006 cm^{-1} in the free ligands, exhibited a shift to larger wavenumbers in the spectra of the complexes, which indicated the coordination of the N-H group to the metallic center. In Complex **1** the band ν (C=O) was shifted to the region with lower energy (1683 cm^{-1}) than those of the free ligands (1707 cm^{-1}), which can be attributed to the weakening of the C=O group due to the coordination of the oxygen atom to the metallic center. In Complex **2**, the C=O, C=C, and thioamide I bands were superimposed, having a relatively broad band with two IR absorption peaks, namely 1636 and 1557 cm^{-1} .

Table 1. Modes and vibrational frequencies of Bipyridine, ligands L_1 and L_2 , and complexes **1** and **2**.

	Frequency Vibrations (cm^{-1})				
	Ligand (1)	Ligand (2)	Bipy	Complex (1)	Complex (2)
ν (N-H)	3086-3046	3110-3006	—	3109-3089	3109-3090
ν (C=O, C=C)	1707, 1616	1636, —	—	1683, 1602	1656, 1604
thioamide I	1567	1557	—	1557	1568
thioamide II	1216	1200	—	1207	1193
thioamide III	1173	1167	—	1173	1167
thioamide IV	833	837	—	832	835
ν (C-H) _{Ar}	—	—	3084-3051	3051-3035	3051-3034
ν (C-H)	2921	2928	—	2928	2930
ν (ring) + δ (C-H))	—	—	1453	1444	1441
ν (C=N + C-N)	—	—	1583	—	—
δ (C-H) _{Ar}	—	—	754	771	777

After the formation of the complex, the complexes' spectra presented three distinct bands in this region, namely 1656, 1604, and 1568 cm^{-1} . The unfolding of the bands and their displacement to higher energies may be related to the coordination of the C=O group with the metallic center. This coordination is probably caused by the high affinity of copper(II) atom to N and O atoms, and its hard bases, than to the sulfur atom. Both complexes showed no significant shift in the bands related to the thioamides III and IV, compared with those of the free binders, suggesting that the C=S group was not part of the coordination sphere of the metal center. New bands corresponding to the stretches of the 2,2'-bipyridine rings were observed in the spectra of complexes **1** and **2**. Two low intensity absorption peaks were observed in the region of 3084-3034 cm^{-1} corresponding to the ν -(CH)_{Ar} bipyridine ring. The bands were at 1444 cm^{-1} and 1441 cm^{-1} for complexes **1** and **2**, respectively, which were attributed to the vibrations of the pyridine ring. A thin band of average intensity appeared at approximately 770 cm^{-1} in the IR spectra of the complexes and was related to the C-H angular deformation of the aromatic rings in the 2,2'-bipyridine ligand. The stretching band ν (C=N + C=C) of the pyridine ring absorbed energy in the same IR region as the bands of thioamide groups. Infrared absorption spectroscopy and elemental analysis of CHN suggested that the synthesized complexes were presented as neutral complexes with the formulas $[CuCl_2(Bipy)(L_1)]$ and $[CuCl_2(Bipy)(L_2)]$ (Figure 1).

The two promising copper(II) complexes with thiouracil ligands were formed by the coordination of the respective ligands to the metal ion in bidentate manner by the N and O atoms. Concomitantly, the 2,2'-bipyridine ligands was coordinated bidentately by the N atoms of the pyridine rings to the

metallic center, completing the coordination sphere of two Cl atoms and conferring a slightly octahedral coordination environment to the Cu²⁺ ion.

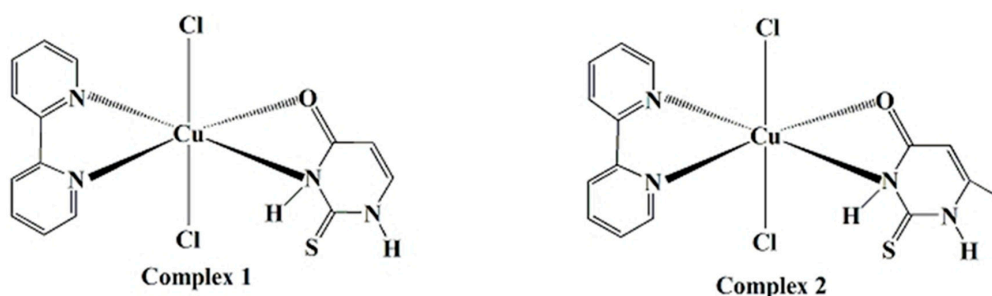


Figure 1. Proposed structures for the complexes 1 and 2.

2.1.3. ESI-HRMS Spectrometry

ESI-HRMS spectrometry experiments were performed to study the composition of the complexes 1 and 2. The HRMS spectra for both complexes can be found in Figures S1 and S2. In spite of the ESI-HRMS experiments did not show the expected molecular ion peak m/z 416.9405 for complex 1 and m/z 430.9561 for complex 2, (it is worth mentioning that copper complexes could undergo redox reactions during ionization, which in turn contributes to the collapse of their structures [27–29] we could detect that our complexes collapse in a few fragments and most of them presented the copper ion bonded to the tiouracil ligands or fragments thereof. The main peaks observed for the complex 1 ($m/z = 157.0759, 260.0270, 375.0667$) and for the complex 2 ($m/z = 157.0760, 237.0071, 375.0648$) agree with the proposed structures. As can be seen from Figures S1 and S2 the peak at 157.0759 is related to the pyridine coligand and the peaks at 260.0270 and 375.0648 are related to the species containing copper (copper presents natural isotopic abundance of $^{63}\text{Cu} = 0.6915$ (15) and $^{65}\text{Cu} = 0.3085$ (15)). The isotopic abundance of the copper ion was observed in the main peaks containing the metal-organic fragments and has been emphasized in Figures S1 and S2.

2.2. UV-Vis Studies and Stability Evaluation

To study the photophysical properties and the solution stability of the prepared complexes we decided performing UV-Vis experiments using the same experimental conditions used in the biological assays. The UV-Vis spectra of the prepared complexes and free ligands are shown in Figures 2 and 3.

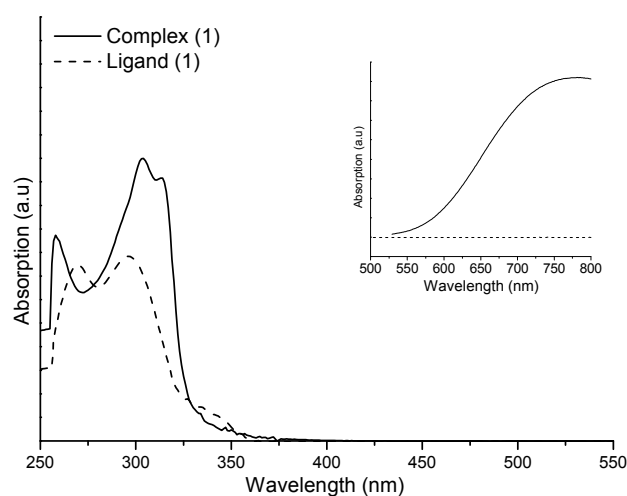


Figure 2. Absorption spectra of the complex 1 and free ligand measured at 298 K using the same concentration (1×10^{-5} M H₂O/DMSO (95/05%).

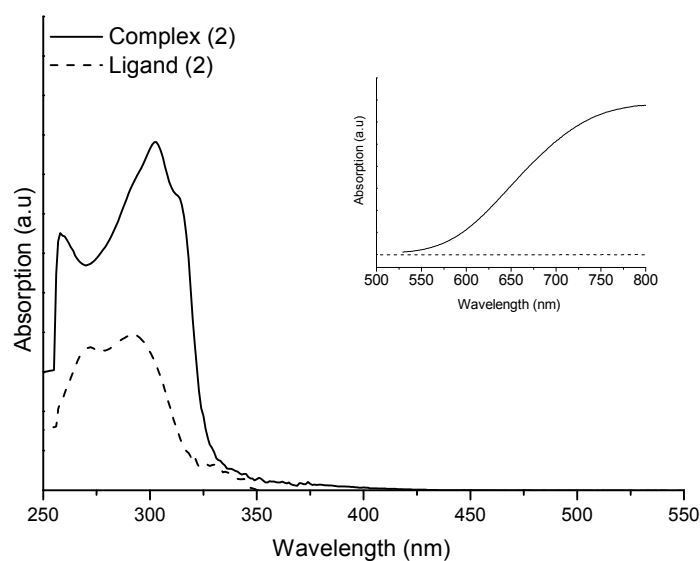


Figure 3. Absorption spectra of the complex 2 and free ligand measured at 298 K using the same concentration (1×10^{-5} M H₂O/DMSO (95/05%).

It can be seen from Figures 2 and 3 an hyperchromic effect from the free ligand to complexes 1 and 2. This behavior has been expected after metalation of the ligand to the Cu metallic atom and it is an experimental evidence for the complexes formation. The light green color presented by the complexes' solution (Figure S3) is related to the metal centered $d \rightarrow d$ Cu^{II}(d⁹) transitions that appeared as a broad band from 550 to 800 nm in the spectra of the complexes 1 and 2 (insets graph in the top of the figures). It is worth mentioning that these electronic transitions are absent in the spectra of the ligands. Two absorption bands centered at ca. 320 and 260 nm were observed in the UV-Vis spectra of the complexes 1 and 2 and at ca. 290 and 275 nm for the ligands. The band centered at ca. 290 nm and 275 nm for the free ligands can be assigned to the IL (intra ligand) electronic transitions of the type $(O, S)n \rightarrow \pi^*$ and $\pi \rightarrow \pi^*$ respectively. After complexation of the ligands to the copper(II) atom, the band centered at ca. 290 nm presented a bathochromic effect (30 nm red shifted) appearing at ca. 320 nm in the UV-Vis spectra of the complexes. It is related to the appearance of LMCT (ligand to metal charge transfer) electronic transitions which should be present after complexation of ligands in transition metals [23]. The $\pi \rightarrow \pi^*$ electronic transitions related to the bipyridine coligand and aromatic system of the thiouracil ring that appeared centered at ca. 275 nm for both ligands presented an hypsochromic effect (blue shifted 15 nm) from ligands to complexes 1 and 2. The hypsochromic effect on the $\pi \rightarrow \pi^*$ electronic transitions is also expected after coordination of ligands to the copper atom and this behavior reinforces the experimental evidence of the complexes formation. To determine the stability of the complexes 1 and 2 in solution (H₂O/DMSO), we decided to perform the same UV-Vis experiment 36 h after preparing the solutions. The Figures S4 and S5 are shown the absorption experiments of the complexes 1, 2 and respective ligands. It can be seen from Figures S4 and S5 that the absorption profile of the prepared complexes 1 and 2 did not show a difference after 36 h and the same spectral behavior was observed. Additionally, any feature of free ligand was observed after 36 h in the spectra of the complexes 1 and 2, in this sense, it is reasonable to interpret that the complexes are maintaining their structures in solution and the disruption of metal-ligand bonds were not observed in the light of the UV-Vis experiments.

2.3. Antifungal Activity

The antifungal activity of the complex 1 [CuCl₂(Bipy)(L₁)], 2 [CuCl₂(Bipy)(L₂)], free ligands (2-thiouracil and 6-methyl-2-thiouracil) and copper(II) chloride in planktonic cells, were evaluated against isolates of *Candida* species. Regarding complex 1, the Minimum Inhibitory Concentration

(MIC) values ranged from 31.25 to 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the Minimum Fungicidal Concentration (MFC) from 31.25 to 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *C. krusei* was the most sensitive isolate, with MIC value of 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Table 2). Complex 2 and the free ligands exhibited no antifungal activity at the concentrations evaluated. The copper(II) chloride exhibited a MIC of 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for all isolates (Table S1), this is an experimental evidence that the antifungal activity of complex 1 should be related to the synergistic effect between thiouracil ligand and the copper ion in the complex structure.

Table 2. Anti-*Candida* activity of the complex 1 [$\text{CuCl}_2(\text{Bipy})(\text{L}_1)$] in planktonic cells by microdilution in broth technique ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Isolate	Source	MIC ^a	MFC ^b	FLC ^c	AmB ^d
<i>C. albicans</i> CA1	Sputum	62.5	62.5	0.5	0.5
<i>C. albicans</i> CA2	Sputum	62.5	125	0.25	0.25
<i>C. albicans</i> CA3	Vaginal	62.5	62.5	0.5	0.5
<i>C. albicans</i> CA4	Vaginal	62.5	62.5	0.5	0.5
<i>C. albicans</i> CA5	Vaginal	62.5	62.5	0.5	0.5
<i>C. albicans</i> CA6	Vaginal	62.5	62.5	0.5	0.5
<i>C. albicans</i> CA7	Nasal swab	125	250	0.25	0.5
<i>C. albicans</i> CA8	Urine	125	125	0.25	0.5
<i>C. albicans</i> CA9	Vaginal	125	125	0.25	0.5
<i>C. albicans</i> CA10	Vaginal	125	125	0.5	0.5
<i>C. glabrata</i> CG1	Urine	62.5	62.5	16 ^e	0.03
<i>C. glabrata</i> CG2	Urine	62.5	62.5	1	0.03
<i>C. glabrata</i> CG3	Urine	62.5	125	16 ^e	0.5
<i>C. glabrata</i> CG4	Urine	62.5	125	1	0.03
<i>C. glabrata</i> CG5	Urine	62.5	62.5	32 ^e	0.03
<i>C. glabrata</i> CG6	Urine	125	250	16 ^e	0.5
<i>C. krusei</i> CK1	Rectal swab	31.25	31.25	0.5	0.03
<i>C. parapsilosis</i> CP1	Blood	62.5	125	0.25	0.25
<i>C. parapsilosis</i> CP2	Catheter tip	125	125	0.25	0.03
<i>C. parapsilosis</i> CP3	Urine	125	250	0.25	0.03
<i>C. tropicalis</i> CT1	Sputum	62.5	125	2	0.5

^a MIC: Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$); ^b MFC: Minimum Fungicidal Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$); ^c FLC: Fluconazole; ^d Amphotericin B; ^e Susceptible Dose-Dependent (SDD) ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

2.4. Biofilm Formation

Based on the results of the antifungal activity test on planktonic cells, one isolate of each species—*C. albicans* CA1, *C. glabrata* CG1, *C. krusei* CK1, *C. parapsilosis* CP1 and *C. tropicalis* CT1—was randomly selected for the examination of Complex 1 effect on both formed and preformed biofilm. Complex 1 significantly reduced the formation of biofilm by some *Candida* species (Figure 4). Complex 1 at the concentration of 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reduced the number of cultivable cells of all species tested, with *C. krusei* (~1.2 log) and *C. glabrata* (~0.8 log) showing the most reduction.

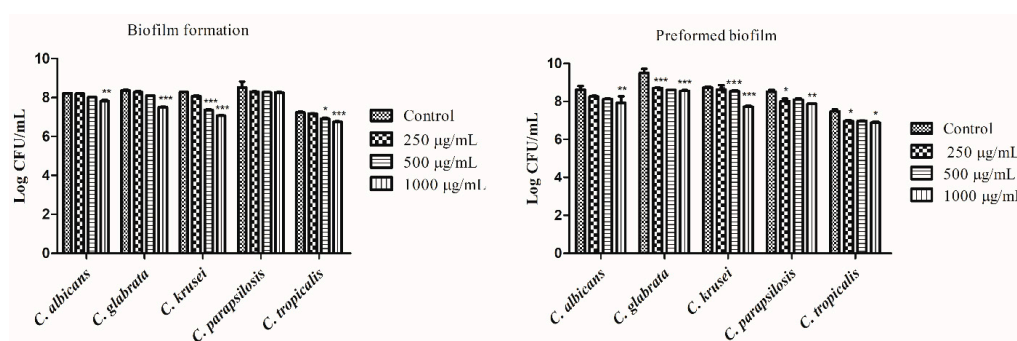


Figure 4. Effect of complex 1 [$\text{CuCl}_2(\text{Bipy})(\text{L}_1)$] during biofilm formation and on preformed biofilms of *Candida* species. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (ANOVA).

The effect of complex **1** observed on preformed *Candida* biofilms was similar to those found in the case of *C. krusei* and *C. glabrata* biofilm formation, showing the greatest reduction in the number of cultivable cells (~1.0 log and 0.9 log, respectively). Thus, in both assays, Complex **1** showed a percentage inhibition of approximately 9.9% against *C. Krusei* and *C. glabrata* biofilm formations.

2.5. Mutagenic Activity

The new copper(II) complex was also evaluated for its mutagenic potential by the Ames test using *Salmonella typhimurium* (Kado method). The results are shown in Table 3. Based on the number of revertant colonies per plate, complex **1** exhibited no mutagenic potential on TA98 and TA100 cell lines in the presence and absence of metabolic activation. The mutagenic potential index was lower than 2 and did not suggest a dose-response relationship.

Table 3. Mutagenic activity expressed by the mean of revertant/plate index of mutagenicity (IM) of complex **1** [CuCl₂(Bipy)(L₁)] in the TA98 and TA100 strains of *S. typhimurium* in the presence (+S9) and absence (−S9) of activation metabolic.

Treatment (µg/plate)	TA98		TA100	
	−S9	+S9	−S9	+S9
0.0 ^a	42 ± 2	15.00 ± 2	192 ± 6	191 ± 8
15	31 ± 1 (0, 7)	15 ± 2 (1, 0)	169 ± 9 (0, 9)	176 ± 8 (0, 9)
50	31 ± 4 (0, 7)	16 ± 1 (1, 0)	229 ± 7 (1, 2) *	201 ± 7 (1, 0)
150	34 ± 3 (0, 8)	17 ± 1 (1, 1)	265 ± 9 (1, 4) **	190 ± 7 (1, 0)
500	36 ± 1 (0, 8)	14 ± 2 (1, 0)	226 ± 6 (1, 2) *	241 ± 6 (1, 2) **
1500	34 ± 2 (0, 8)	16 ± 3 (1, 1)	249 ± 5 (1, 3) **	241 ± 8 (1, 3) **
5000	36 ± 5 (0, 8)	18 ± 2 (1, 2)	286 ± 7 (1, 5) **	238 ± 9 (1, 4) **
C+	246 ± 6 ^b	227 ± 9 ^c	990 ± 9 ^d	979 ± 4 ^c

^a Negative control: DMSO; Positive Control (C+); ^b 4-nitro-o-phenylenediamine (10 µg/plate); ^c 2-aminoanthracene (1.5 µg/plate); ^d Sodium azide (2.5 µg/plate). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (ANOVA).

3. Discussion

Opportunistic fungal infection by *Candida* species has been a recurrent health problem, against which the search for new therapeutic agents has been intensifying in recent years [1]. In this study, the synthesis of two potential antifungal coordination complexes, which consisted of copper(II) center with 2-thiouracil (complex **1**) and 6-methyl-thiouracil (complex **1**) ligands, was performed.

Complex **1** showed antifungal activity against 21 clinical isolates of *Candida* species which are common causes of fungal infection. The lowest MIC value of Complex **1** was against *C. krusei* (31.25 µg/mL), in which the highest percentage of biofilm inhibition was observed. This finding could be significant because as *C. krusei* is intrinsically resistant to fluconazole, and its therapy option is restricted to the use of equinicanidins and amphotericin B [30], which have been associated with increased episodes of candidemia and invasive candidiasis [31]. The severe clinical cases of *C. krusei*, coupled with the lack of available antifungal treatment against it, resulted in high mortality rate. Complex **1** also showed inhibitory activity against planktonic and sessile cells (in the biofilm) of *C. glabrata*, which was resistant to fluconazole in a dose-dependent manner. Surveillance studies have reported on the resistance of *C. glabrata* isolates to triazoles, and, more recently, to echinocandins, thus characterizing this species as multi-drug resistant [32].

Regarding the effect of Complex **1** on yeast viability, the complex showed fungicidal and fungistatic activities against all isolates. This is a relevant finding, since azoles, such as fluconazole, has only fungistatic activity. These data suggested that the fungicidal activity of the complex also influenced its ability to inhibit biofilm formation and destroy preformed biofilm. The ability to form biofilm is one of the virulence factors increasing the pathogenicity of *Candida*. The complex structure and architecture of the sessile cells in a biofilm increased their resistance to antifungal drugs [33], with several studies reporting that sessile cells in biofilms have greater resistance than do planktonic cells.

According to some studies, the necessary MIC of antimicrobial agents for the reduction in biofilm formation is 2 to 1000 times greater than that for planktonic cells [33–35]. It is important that in this study, Compound 1 was able to reduce the number of viable cells in biofilms at a concentration of approximately 16-fold the MIC, namely 500 µg/mL for *C. krusei* and 1000 µg/mL for the other species.

The data in this study suggested that the coordination of the 2-thiouracil ligand to the copper(II) metallic center (Complex 1) potentiated the antifungal activity of the same, since in an equimolar concentration the copper(II) chloride exhibited MIC (1000 µg/mL). Mohamed et al. [36,37] and Masoud et al. [38] also reported the antifungal activity of copper complexes with 2-thiouracil binder, which may result from the increased liposolubility of the complex and the toxicity of copper on microorganisms, which causes membrane damage and leads to cell death [39,40]. It was verified that the alteration of ligand increased its antifungal activity. Complex 2 had no effect on the isolates tested. Since the structural difference between the two compounds is in the presence of the methyl substituent at the 6-position of the thiopyrimidine ring, it is thought that the substituent interfered with the liposolubility and consequently the antifungal activity of Complex 2.

For pharmaceutical application, Complex 1 was also evaluated for its mutagenic potential by the Ames test using TA98 (*hisD3052/rfa/uroB/pKM101/ApR*) and TA100 (*hisG46/rfa/ΔuvrB/pKM101/ApR*), which allowed us to examine frameshift and base pair substitution mutations, respectively. Complex 1 did not induce these types of mutations at the concentrations tested. Understanding the genotoxic characteristics of a new complex is key to further pharmaceutical development. According to the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical Products of the Food and Drug Administration (FDA) of the United States, the Ames test is part of a series of standardized tests to evaluate the genotoxicity of new drugs, which is necessary as studies have reported rodent-carcinogenic drugs by the reverse mutation test using lineages of *S. typhimurium* [41]. The Ames test also allows direct and indirect evaluation of the mutagenic potential of new compounds owing to the use of S9 microsomal fraction that simulates a metabolism process in mammals, guaranteeing high sensitivity of the test [42]. Thus, the use of these tests is of extreme importance for research and development of new complexes as therapeutic agents.

4. Materials and Methods

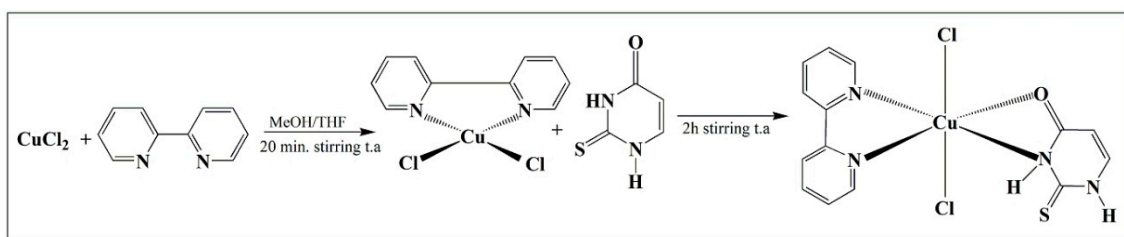
4.1. Chemical and Measurements

The compounds 2-thiouracil, 6-methyl-2-thiouracil, 2,2'-bipyridine, and copper(II) chloride employed in the complex syntheses were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Solvents (grade PA) were commercially obtained and used without further purification. CHN elemental analyses were performed using a Perkin-Elmer 2400 Analyzer (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). FT-IR spectra were obtained by a JASCO-4100 spectrophotometer (Jasco, Easton, MD, USA) in the spectral window of 4000–400 cm⁻¹, using sample dispersion in KBr. Melting point values were determined on a DF-3600 Instruterm apparatus (Instruterm, São Paulo, SP, Brazil). UV-Vis analyses were performed in the same biological experimental conditions on double beam PerkinElmer Spectrophotometer Lambda 650S using quartz cuvettes of 1 cm optical path. HRMS was performed on a Bruker Mass Spectrometer IES-Q-TOF-micro TOF III (Bruker Daltonics) in the positive mode (*m/z* 120–1200), quadrupole Ion energy 5.0 eV and cell collision energy of 10 eV. The samples were prepared using 0.0001 g/mL (water) and 0.1% of formic acid.

4.2. Preparation of Complexes

Complex 1: According to the scheme below (Scheme 1), 0.0134 g (0.1 mmol) copper chloride was dissolved in 6 mL of THF/MeOH (1:1, *v/v*). A light-green solid was obtained in 67% yield (Figure S6). The same procedure was used for the synthesis of Complex 2 using 6-methyl-2-thiouracil ligand and Complex 2 was obtained in 72% yield (Figure S7). The same procedure was used for the

synthesis of Complex 2 using 6-methyl-2-thiouracil ligand. The preparation was performed including a modification in the synthetic protocols already published in the literature [22,23].



Scheme 1. Reaction route for the obtention of the Complex 1.

Complex 1 [CuCl₂(Bipy)(L₁)]: Elemental analysis of CHN theoretical to C₁₄H₁₂CuN₄Cl₂SO, MW = 418.78 g/mol: C = 40.14%, H = 2.89%, N = 13.38%. Experimental: C = 40.17%, H = 2.92%, N = 13.41%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3109–3089 ($\nu(\text{N-H})$), 3051–3035 ($\nu(\text{C-H})_{\text{AR}}$), 2928 ($\nu(\text{C-H})$), 1683, 1602 ($\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=C})$), 1557 (thiomide I: $\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C-N})$), 1444 ($\nu(\text{ring}) + \delta(\text{C-H})_{\text{bipy}}$), 1240 (amide III: $\nu(\text{C-N}) + \delta(\text{C-N-H})$), 1207 (thiomide II: $\nu(\text{C-N}) + \delta(\text{NH}) + \delta(\text{C-H})$) 1173, 1158 (thiomide III: $\nu(\text{C-N}) + \nu(\text{C=S})$), 831 (thiomide IV: $\nu(\text{C=S})$), 777 ($\delta(\text{C-H})_{\text{bipy}}$). Melting point: 240 °C.

Complex 2 [CuCl₂(Bipy)(L₂)]: Elemental analysis of CHN theoretical to C₁₅H₁₄CuN₄Cl₂SO, MM = 432.81 g/mol: C = 41.63%, H = 3.26%, N = 12.94%. Experimental: C = 41.57%, H = 3.27%, N = 12.97%. IR (KBr, ν/cm^{-1}): 3109–3090 ($\nu(\text{N-H})$), 3051–3034 ($\nu(\text{C-H})_{\text{AR}}$), 2930 ($\nu(\text{C-H})$), 1656, 1604 ($\nu(\text{C=O})$, $\nu(\text{C=C})$), 1568 (thiomide I: $\delta(\text{NH}) + \nu(\text{C-N})$), 1441 ($\nu(\text{ring}) + \delta(\text{C-H})_{\text{bipy}}$), 1245 (amide III: $\nu(\text{C-N}) + \delta(\text{C-N-H})$), 1193 (thiomide II: $\nu(\text{C-N}) + \delta(\text{NH}) + \delta(\text{C-H})$) 1167 (thiomide III: $\nu(\text{C-N}) + \nu(\text{C=S})$), 835 (thiomide IV: $\nu(\text{C=S})$), 777 ($\delta(\text{C-H})_{\text{bipy}}$). Melting point: 290 °C.

4.3. Microorganisms and Culture Conditions

To evaluate the antifungal activity of the copper(II) complexes, 21 clinical isolates of *Candida* species collected from different body parts were obtained from the collection of the Laboratory of Applied Microbiology, Universidade Federal da Grande Dourados, Brazil. The isolates were identified as *C. albicans* (ten isolates), *C. glabrata* (six isolates), *C. krusei* (one isolate), *C. parapsilosis* (three isolates), and *C. tropicalis* (one isolate).

All species were stored at -20 ± 2 °C in Sabouraud Dextrose Broth (SDB, HiMedia Laboratories, Mumbai, India) with 20% (*v/v*) glycerol. Prior to each assay, species were subcultured from the frozen stock suspension onto Sabouraud Dextrose Agar (SDA, HiMedia) plates. The plates were incubated overnight at 35 °C. A pool of growing colonies was subcultured in CHROMagar *Candida*[®] (Difco, Tlalneptla, Estado de Mexico, Mexico) to investigate the purity of the culture and color of the colony. Yeasts that grew in the differential selective medium were identified according to conventional methodology [43].

4.4. Antifungal Activity Screening

The screening of the antifungal activity of Complexes 1 and 2 was performed by broth microdilution in 96-well polystyrene plates according to the standard M27-A3 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [44].

Microplates containing the serial dilutions of the complexes with concentrations ranging from 1.9 to 1000 $\mu\text{g/mL}$ were inoculated with 100 μL suspension containing 2.5×10^3 CFU/mL of either yeast in RPMI 1640 medium (Sigma Aldrich). Fluconazole and Amphotericin B were used as reference drugs. The plates were incubated at 35 °C for 48 h. The MIC was considered as the lowest complex concentration which showed no visible growth of microorganisms after incubation.

The number of viable cells was calculated by determining the Colony Forming Units (CFUs) following serial dilutions and incubation in SDA for 24 h. The MFC was defined as the lowest concentration of complex that yielded no fungal growth.

As defined by the CLSI, negative controls (medium only) and positive controls (medium and yeast) were used in each test. The cut-off levels of susceptibility to fluconazole (Sigma Aldrich) were utilized according to the CLSI [44] to identify species as susceptible ($S \leq 8 \mu\text{g/mL}$), dose-dependent susceptible ($\text{DDS} = 16\text{--}32 \mu\text{g/mL}$), and resistant ($R \geq 64 \mu\text{g/mL}$). This document did not consider amphotericin B, so the susceptibility references levels established by Yang et al. [45] were used: values of $\text{MIC} \leq 1 \mu\text{g/mL}$ indicated the yeast was susceptible, and levels $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ indicated the yeast was resistant. The subsequent tests were performed based on the results obtained in this screening process.

4.5. Biofilm Formation

Considering the antifungal activity of the Complex 1, its effect was evaluated on the biofilm and preformed biofilm of *Candida* species. Species that are particularly sensitive to the complex were selected, namely *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, and *C. tropicalis*. The concentrations of the compound used in this test were based on the results of the antifungal susceptibility test (Section 4.4). The assays were performed according to a previous study [46], with several adaptations.

4.5.1. Effect of the Complex 1 on Biofilm Formation

To evaluate the effect of Complex 1 on biofilm formation, *Candida* species were inoculated in SDB and incubated for 18 h at 35 °C under 120 rpm shaking. Afterwards, the yeasts were centrifuged at 3000 g for 10 min and washed three times with phosphate buffered saline (PBS), pH 7. One hundred microliter of a standard inoculum suspension (1×10^7 cells/mL) was inoculated simultaneously to 100 μL complex diluted in SDB at the concentrations of 250, 500, and 1000 $\mu\text{g/mL}$. The inoculums were plated in wells and incubated under shaking (120 rpm/min) for 48 h at 35 °C.

Following incubation, the content of each well was removed. The remaining biofilms were washed three times with 200 μL PBS to remove weakly adhered cells and each well was scraped vigorously with a pipette tip to collect the biofilm.

The effect of Complex 1 on biofilm formation was examined by counting the viable cells in the biofilms. Serial dilutions of the suspensions were plated on SDA and incubated for 24 h at 35 °C. The total number of CFUs per unit area ($\log \text{CFU/mL}$) of the each well was counted.

4.5.2. Effect of the Complex 1 on Preformed Biofilms

To evaluate the effect of Complex 1 on preformed biofilms, 200 μL standard inoculum suspension (1×10^7 cells/mL) prepared in SDB was added to a 96-well microplate. The plates were incubated in an incubator with orbital shaking at 120 rpm/min for 48 h. Subsequently, the medium was carefully aspirated and washed three times with PBS to remove the weakly adhered cells. Complex 1 at concentrations 250, 500, and 1000 $\mu\text{g/mL}$ diluted in SDB was added to the wells. After 24 h incubation at 35 °C, the content of each well was discarded, and the plates were washed three times with PBS to remove non-adherent cells and each well was scraped vigorously with a pipette tip. To evaluate the effect of the complex, the CFU value of each suspension was quantified and presented as $\log \text{CFU/mL}$.

4.6. Mutagenic Activity

The evaluation of the mutagenic potential of Complex 1 was performed by Ames test as described by Kado et al. [47]. The standardized TA98 and TA100 *Salmonella typhimurium* strains were used at a concentration of 1×10^8 cells/mL.

The assay was performed in the presence and absence of metabolic activation of S9, which was prepared from the liver of Sprague-Dawley rats treated with polychlorinated biphenyl aroclor 1254 mixture (500 mg/kg). The S9 fraction was acquired from Molecular Toxicology Inc. (Boone, NC, USA) and freshly prepared before each test. Fifty microliter of 0.2 M phosphate buffer or S9 fraction, 5 μL

of complex (15, 50, 150, 500, 1500, and 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$), and 50 μL of bacterial suspension were added to test tubes. The tubes were preincubated for 90 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. Soon after, 2 mL Top Agar (0.6% agar, 0.6% NaCl, 0.05 mM L-histidine, 0.05 mM biotin, pH 7.4, 45 $^{\circ}\text{C}$) was added and then the mixture was poured into Minimal Agar plates (1.5% agar, Voguel-Boner medium, and 10% glucose solution). The plates were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 48–66 h, after which the His + revertant colonies were counted.

The positive controls used in the tests without metabolic activation were: 4-nitrophenylenediamine (NPD) (10 $\mu\text{g}/\text{plate}$) for the TA98 line and sodium azide (2.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$) for the TA100 lineage. In the metabolic activation assays, 2-aminoanthracene (2-ANTR) (0.63 $\mu\text{g}/\text{plate}$) was used for both strains. Dimethylsulfoxide (DMSO) was used as the negative control. All reagents used as positive and negative controls were purchased from Sigma Aldrich. The assays were performed in triplicate for each concentration of the extract.

4.7. Statistical Analysis

The results of the biofilm assays were analyzed by two-way ANOVA and Bonferroni post-test using the Graph Pad Prism 7.0 software. The Ames test data were analyzed using the Salanal statistical program version 1.0 (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, USA from Research Triangle Institute, RTP, Research Triangle Park, NC, USA), adopting the model used by Bernstein et al. [48].

5. Conclusions

We have prepared and characterized two new copper(II) complexes, which were evaluated for their antifungal and mutagenic potential. Complex 1 [$\text{CuCl}_2(\text{Bipy})(\text{L}_1)$] exhibited fungicidal activity against all *Candida* isolates tested, showing antifungal activity against both planktonic and sessile cells. *Candida krusei* was the most sensitive species to the complex. Complex 2 [$\text{CuCl}_2(\text{Bipy})(\text{L}_2)$] and the free ligands exhibited no antifungal activity at the concentrations evaluated. Considering that complex 1 showed no mutagenic potential at the concentrations tested, we propose complex 1 as a new drug in the field of anti-*Candida* therapy.

Supplementary Materials: Supplementary Materials are available online. Table S1: Anti-*Candida* activity of the complex 1 [$\text{CuCl}_2\text{Bipy}(\text{L}_2)$], free ligands (2-thiouracil and 6-methyl-2-thiouracil) and copper(II) chloride in planktonic cells by microdilution in broth technique ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Figure S1: ESI-HRMS spectrum of the complex 1. Figure S2: ESI-HRMS spectrum of the complex 1. Figure S3: Cuvettes containing the solutions of the complex 1 (light green) and ligand (colorless). Picture taken during the experiment. Complex 2 and respective ligand have been presented similar behavior. Figure S4: UV-Vis absorption spectra of the complex 1 and respective ligand measured at 298 K. This experiment was performed 36 h after preparing the solutions. Figure S5: UV-Vis absorption spectra of the complex 1 and respective ligand measured at 298 K. This experiment was performed 36 h after preparing the solutions. Figure S6: Green solid of the Complex 1 obtained after filtration. Figure S7: Green solid of the Complex 2 obtained after filtration.

Author Contributions: F.G.d.S.D. developed the experiments and wrote the manuscript; A.A.d.A.A., R.P.d.A., P.F.d.C. and F.d.O.G. developed the antifungal and mutagenic activity assays; L.R.V.F. and G.A.C. developed and reviewed the chemistry part of the manuscript; T.I.E.S. and K.M.P.d.O. designed the experiments and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, grant number 23/200.488/2014.

Acknowledgments: The authors thank the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul and the Universidade Federal da Grande Dourados for financial support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Garbee, D.D.; Pierce, S.S.; Manning, J. Opportunistic Fungal Infections in Critical Care Units. *Crit. Care Nurs. Clin. N. Am.* **2017**, *29*, 67–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Giacomazzi, J.; Baethgen, L.; Carneiro, L.C.; Millington, M.A.; Denning, D.W.; Colombo, A.L.; Pasqualotto, A.C. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses* **2015**, *59*, 145–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Doi, A.M.; Pignatari, A.C.C.; Edmond, M.B.; Marra, A.R.; Camargo, L.F.A.; Siqueira, R.A.; Mota, V.P.; Colombo, A.L. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0146909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Mayer, F.L.; Wilson, D.; Hube, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* **2013**, *4*, 119–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chandra, J.; Mukherjee, P.K.; Ghannoum, M.A. *Candida* biofilms associated with CVC and medical devices. *Mycoses* **2012**, *55*, 46–57. [[CrossRef](#)]
6. Sardi, J.C.O.; Scorzoni, L.; Bernardi, T.; Fusco-Almeida, A.M.; Mendes, G.M.J.S. *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J. Med. Microbiol.* **2013**, *62*, 10–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Araújo, D.; Henriques, M.; Silva, S. Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Net work Genes. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 62–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Desai, J.V.; Mitchel, A.P.; Andes, D.R. Fungal Biofilms, Drug Resistance, and Recurrent Infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4*, a019729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Casteli, M.V.; Derita, M.G.; López, S.N. Novel antifungal agents: A patent review (2013–present). *J. Expert Opin. Ther. Pat.* **2017**, *27*, 415–426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Perfect, J.R. Is there an emerging need for new antifungals? *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2016**, *21*, 129–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Altıntop, M.D.; Oozdemir, A.; Zitouni-Turan, G.; Ilgin, S.; Atli, O.; Demirel, R.; Kaplancıkl, Z.A. A novel series of thiazolyl-pyrazoline derivatives: Synthesis and evaluation of antifungal activity, cytotoxicity and genotoxicity. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92*, 242–352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Monte, C.; Carradori, S.; Bizzarria, B.; Bolasco, A.; Caprara, F.; Mollica, A.; Rivanera, D.; Mari, E.; Zicari, A.; Akdemir, A.; et al. Anti-*Candida* activity and cytotoxicity of a large library of new *N*-substituted-1,3-thiazolidin-4-one derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *107*, 82–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Salci, T.P.; Negri, M.; Abadio, A.K.R.; Bonfim-Mendonça, P.; Capoci, I.; Caparroz-Assef, S.M.; Donati, L.; Felipe, M.S.S.; Kioshima, E.S.; Svidzinsk, T.I.E. A new small-molecule KRE2 inhibitor against invasive *Candida parapsilosis* infection. *Future Microbiol.* **2017**, *12*, 1283–1295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Scăețeanu, G.V.; Chifiriu, M.C.; Bleotu, C.; Kameron, C.; Măruțescu, L.; Daniliuc, C.G.; Maxim, C.; Calu, L.; Olar, R.; Badea, M. Synthesis, Structural Characterization, Antimicrobial Activity, and In Vitro Biocompatibility of New Unsaturated Carboxylate Complexes with 2,2'-Bipyridine. *Molecules* **2018**, *23*, 157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ferreira, I.P.; Lima, G.M.; Paniago, E.B.; Takahashi, J.A.; Krambrock, K.; Pinheiro, C.B.; Wardell, J.L.; Visentin, L.C. Synthesis, characterization, structural and biological aspects of copper(II) dithiocarbamate complexes—Part II, [Cu{S₂CN(Me)(R¹)₂}]₂, [Cu{S₂CN(Me)(R²)₂}]₂ and [Cu{S₂CN(R³)(R⁴)₂}]₂ {R¹ = –CH₂CH(OMe)₂, R² = 2-methyl-1,3-dioxolane, R³ = –CH₂(CH₂)₂N = CHPhOCH₂Ph and R⁴ = –CH₂CH₂OH}. *J. Mol. Struct.* **2013**, *1048*, 357–366. [[CrossRef](#)]
16. Kuzovlev, A.S.; Savinkina, E.V.; Chernyshev, V.V.; Grigoriev, M.S.; Volov, A.N. Copper and palladium complexes with substituted pyrimidine-2-thiones and 2-thiouracils: Syntheses, spectral characterization, and X-ray crystallographic study. *J. Coord. Chem.* **2016**, *69*, 508–521. [[CrossRef](#)]
17. Palafox, M.A.; Rastogi, V.K.; Tanwar, R.P.; Mittal, L. Vibrational frequencies and structure of 2-thiouracil by Hartree-Fock, post-Hartree-Fock and density functional methods. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* **2003**, *59*, 2473–2486. [[CrossRef](#)]
18. Ma, L.Y.; Zheng, Y.C.; Wang, S.Q.; Wang, B.; Wang, Z.R.; Pang, L.P.; Zhang, M.; Wang, J.W.; Ding, L.; Li, J.; et al. Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationship of Novel LSD1 Inhibitors Based on Pyrimidine–Thiourea Hybrids As Potent, Orally Active Antitumor Agents. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 1705–1716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Pahont, E.; Paraschivescu, C.; Ilies, D.C.; Poirier, D. Oprean, Synthesis and Characterization of Novel Cu(II), Pd(II) and Pt(II) Complexes with 8-Ethyl-2-hydroxytricyclo(7.3.1.0^{2,7})tridecan-13-one-thiosemicarbazone: Antimicrobial and in Vitro Antiproliferative Activity. *Molecules* **2016**, *21*, 674–692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

20. Kamalakannan, P.; Venkappayya, D. Spectral, Thermal, and Antimicrobial Studies on the Copper(II), Zinc(II), Cadmium(II), and Mercury(II) Chelates of a New Antimetabolite-5-Dimethylaminomethyl-2-Thiouracil. *Russ. J. Coord. Chem.* **2002**, *28*, 423–433. [[CrossRef](#)]
21. Scorzoni, L.; Sangalli-Leite, F.; Singulani, J.L.; Silva, A.C.; Costa-Orlandi, C.B.; Fusco-Almeida, A.M.; Mendes-Giannini, M.J. Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. *J. Microbiol. Methods* **2016**, *123*, 68–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ferle, A.; Pizzuti, L.; Inglez, S.D.; Caires, A.R.L.; Lang, E.S.; Back, D.F.; Flores, A.F.C.; Junior, A.M.; Deflon, V.M.; Casagrande, G.A. The first gold(I) complexes based on pyrazoline ligands: Synthesis, structural characterization and photophysical properties. *Polyhedron* **2013**, *63*, 9–14. [[CrossRef](#)]
23. Favarin, L.R.V.; Rosa, P.P.; Pizzuti, L.; Junior, A.M.; Caires, A.R.L.; Bezerra, L.S.; Pinto, L.M.C.; Maia, G.; Gato, C.C.; Back, D.F.; et al. Synthesis and structural characterization of new heteroleptic copper(I) complexes based on mixed phosphine/thiocarbonyl-pyrazoline ligands. *Polyhedron* **2017**, *121*, 185–190. [[CrossRef](#)]
24. Wei-Da, Y.; Yin-Ping, H. Copper Complex of 2-Thiouracil. *Polyhedron* **1990**, *9*, 2747–2750. [[CrossRef](#)]
25. Preda, N.; Mihut, L.; Baibarac, M.; Baltog, I.; Husano, M. The intercalation of PbI₂ with 2,2'-bipyridine evidenced by photoluminescence, FT-IR and Raman spectroscopy. *Rom. J. Phys.* **2008**, *54*, 667–675. [[CrossRef](#)]
26. Adelaide, O.M.; Abidemi, O.O.; Olubunmi, A.D. Synthesis, characterization and antibacterial studies of some copper(II) complexes of 2,2'-bipyridine and 1.10-phenanthroline. *J. Chem. Pharm. Res.* **2013**, *5*, 69–73.
27. Lavanant, H.; Virelizier, H.; Hoppiliard, Y. Reduction of Copper(ii) Complexes by Electron Capture in an Electrospray Ionization Source. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 1217–1221. [[CrossRef](#)]
28. Gianelli, L.; Amendola, V.; Fabbrizzi, L.; Pallavicini, P.; Mellerio, G.G. Investigation of reduction of Cu(II) complexes in positive-ion mode electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 2347–2353. [[CrossRef](#)]
29. Henderson, W.; McIndoe, J.S. *Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds*; John Wiley & Sons Ltd.: New Jersey, NJ, USA, 2005; p. 292, ISBN 978-0-470-85015-2.
30. Pappas, P.G.; Kauffman, C.A.; Andes, D.R.; Clancy, C.J.; Marr, K.A.; Ostrosky-Zeichner, L.; Reboli, A.C.; Schuster, M.G.; Vazquez, J.A.; Walsh, T.J.; et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *62*, e1–e50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Whaley, S.G.; Berkow, E.L.; Rybak, J.M.; Nishimoto, A.T.; Barker, K.S.; Rogers, P.D. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 2173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. McCarty, T.P.; Pappas, P.G. Invasive Candidiasis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2016**, *30*, 103–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Chandra, J.; Mukherjee, P.K. *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. *Microbiol. Spectr.* **2015**, *3*, 1–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Martins, N.; Ferreira, I.C.F.R.; Henriques, M.; Silva, S.; Ferreira, I.C.F.R. In Vivo Anti-*Candida* Activity of Phenolic Extracts and Compounds: Future Perspectives Focusing on Effective Clinical Interventions. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 247382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Sardi, J.C.O.; Freires, I.A.; Lazarinia, J.G.; Infant, J.; Alencar, S.M. Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. *Microb. Pathog.* **2017**, *105*, 280–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Mohamed, M.S.; Awad, S.M.; Ahmed, M. Synthesis and antimicrobial evaluation of some 6-aryl-5-cyano-2-thiouracil derivatives. *Acta Pharm.* **2011**, *6*, 171–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Mohamed, M.S.; Youns, M.M.; Ahmed, N.M. Synthesis, antimicrobial, antioxidant activities of novel 6-aryl-5-cyanothiouracil derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 591–600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Masoud, M.S.; Soayed, A.A.; Hussein, A.F.E. Coordination modes, spectral, thermal and biological evaluation of hetero-metal copper containing 2-thiouracil complexes. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* **2012**, *99*, 365–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Gaetke, L.M.; Chow-Johnson, H.S.; Chow, C.K. Copper: Toxicological relevance and mechanisms. *Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 1929–1938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. García-Santamarina, S.; Thiele, D.J. Copper at the Fungal Pathogen-Host Axis. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 18945–18953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

41. FDA. International Conference on Harmonisation (ICH). In *Guidance on S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use*; Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA, 2012.
42. Escobar, P.A.; Kemper, R.A.; Tarca, J.; Nicolette, J.; Kenyon, M.; Glowienke, S.; Sawant, S.G.; Christensen, J.; Johnson, T.E.; McKnight, C.; et al. Bacterial mutagenicity screening in the pharmaceutical industry. *Mutat. Res.* **2013**, *752*, 99–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Larone, D.H. *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*, 5rd ed.; ASM Press: Washington, DC, USA, 2011; ISBN 1555816606.
44. CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, 3rd ed.; Approved Standard; CLSI Document M27-A3; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2008; Volume 28, pp. 1–13.
45. Yang, Y.L.; Wang, A.H.; Wang, C.W.; Cheng, W.T.; Li, S.Y.; Lo, H.J. Suscetibilities to amphotericin B and fluconazole of *Candida* species in Taiwan surveillance of antimicrobial resistance of yeasts 2006. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2008**, *61*, 175–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Capoci, I.R.G.; Bonfim-Mendonça, P.S.; Arita, G.S.; Pereira, R.R.A.; Consolarom, M.E.L.; Bruschim, M.L.; Negri, M.; Svidzinski, T.I.E. Propolis Is an Efficient Fungicide and Inhibitor of Biofilm Production by Vaginal *Candida albicans*. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2015**, *2015*, 287693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kado, N.Y.; Langley, D.; Eisenstadt, E. A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat. Res.* **1983**, *121*, 25–32. [[CrossRef](#)]
48. Bernstein, L.; Kaldor, J.; McCann, J.; Pike, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.* **1982**, *97*, 267–281. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

A Promising Copper(II) Complex as Antifungal and Antibiofilm Drug against Yeast Infection

Fabiana Gomes da Silva Dantas¹, **Adriana Araújo de Almeida-Apolonio**²,
Renata Pires de Araújo³, **Lis Regiane Vizolli Favarin**⁴, **Pamella Fukuda de Castilho**¹,
Fernanda de Oliveira Galvão¹, **Terezinha Inez Estivalet Svidzinski**⁵,
Gleison Antônio Casagrande^{4,*} and **Kelly Mari Pires de Oliveira**^{1,6,*}

¹ Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS 79804-970, Brazil; fabianasilva@ufgd.edu.br (F.G.d.S.D.); pamellafcastilho@gmail.com (P.F.d.C.); feergalvao@hotmail.com (F.d.O.G.)

² Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS 79070-900, Brazil; aaraujo.a@hotmail.com (A.A.d.A.A)

³ Faculty of Exact Sciences and Technology, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS 79804-970, Brazil; renataaraujo@ufgd.edu.br (R.P.d.A)

⁴ Institute of Chemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS 79074-460, Brazil; lisregiane@hotmail.com (L.R.V.F)

⁵ Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR 87020-900, Brazil; terezinha.svidzinski@gmail.com (T.I.E.S)

⁶ Faculty of Biological and Environmental Science, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS 79804-970, Brazil

* Correspondence: gleisoncasag@gmail.com (G.A.C.); kellyoliveira@ufgd.edu.br (K.M.P.d.O.); Tel.: +55-067-3345-3595 (G.A.C.); +55-067-3410-2220 (K.M.P.d.O.)

Received: 09 June 2018; Accepted: 26 June 2018; Published: date

Table S1. Anti-*Candida* activity of the complex 2 [CuCl₂Bipy(L2)], free ligands (2-thiouracil and 6-methyl-2-thiouracil) and cooper(II) chloride in planktonic cells by microdilution in broth technique (μg/mL).

Isolate	Source	Complex 2 [CuCl ₂ Bipy(L2)]		2-thiouracil		6-methyl-2-thiouracil		CuCl ₂		FLC ^c	AmB ^d
		MIC ^a	MFC ^b	MIC ^a	MFC ^b	MIC ^a	MFC ^b	MIC ^a	MFC ^b		
<i>C. albicans</i> CA1	Sputum	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	0.5	0.5
<i>C. albicans</i> CA2	Sputum	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	0.25	0.25
<i>C. albicans</i> CA3	Vaginal	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	0.5	0.5
<i>C. albicans</i> CA4	Vaginal	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	0.5	0.5
<i>C. albicans</i> CA5	Vaginal	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	0.5	0.5
<i>C. albicans</i> CA6	Vaginal	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	0.5	0.5
<i>C. albicans</i> CA7	Nasal swab	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	0.25	0.5
<i>C. albicans</i> CA8	Urine	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	0.25	0.5
<i>C. albicans</i> CA9	Vaginal	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	0.25	0.5
<i>C. albicans</i> CA10	Vaginal	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	0.5	0.5
<i>C. glabrata</i> CG1	Urine	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	16 ^e	0.03

<i>C. glabrata</i> CG2	Urine	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	1	0.03
<i>C. glabrata</i> CG3	Urine	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	16 ^e	0.5
<i>C. glabrata</i> CG4	Urine	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	1	0.03
<i>C. glabrata</i> CG5	Blood	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	32 ^e	0.03
<i>C. glabrata</i> CG6	Urine	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	16 ^e	0.5
<i>C. krusei</i> CK1	Rectal swab	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	0.5	0.03
<i>C. parapsilosis</i> CP1	Blood	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	0.25	0.25
<i>C. parapsilosis</i> CP2	Catheter tip	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	0.25	0.03
<i>C. parapsilosis</i> CP3	Urine	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	0.25	0.03
<i>C. tropicalis</i> CT1	Sputum	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	2	0.5

^aMIC: Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$); ^bMFC: Minimum Fungicidal Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$); ^cFLC: Fluconazole ($\mu\text{g}/\text{mL}$); AmB: ^dAmphotericin B ($\mu\text{g}/\text{mL}$); ^eSusceptible Dose-Dependent (SDD) ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Complex 1

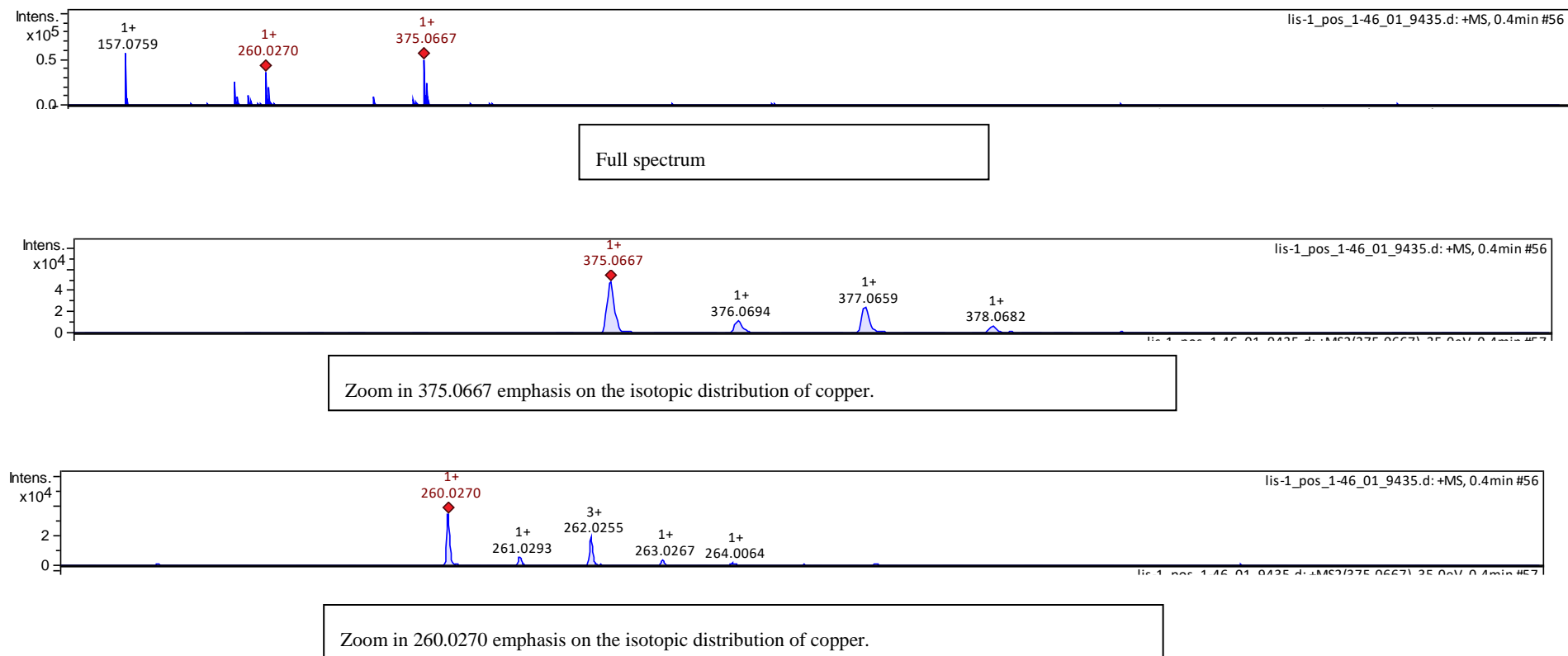


Figure S1. ESI-HRMS spectrum of the complex 1.

Complex 2

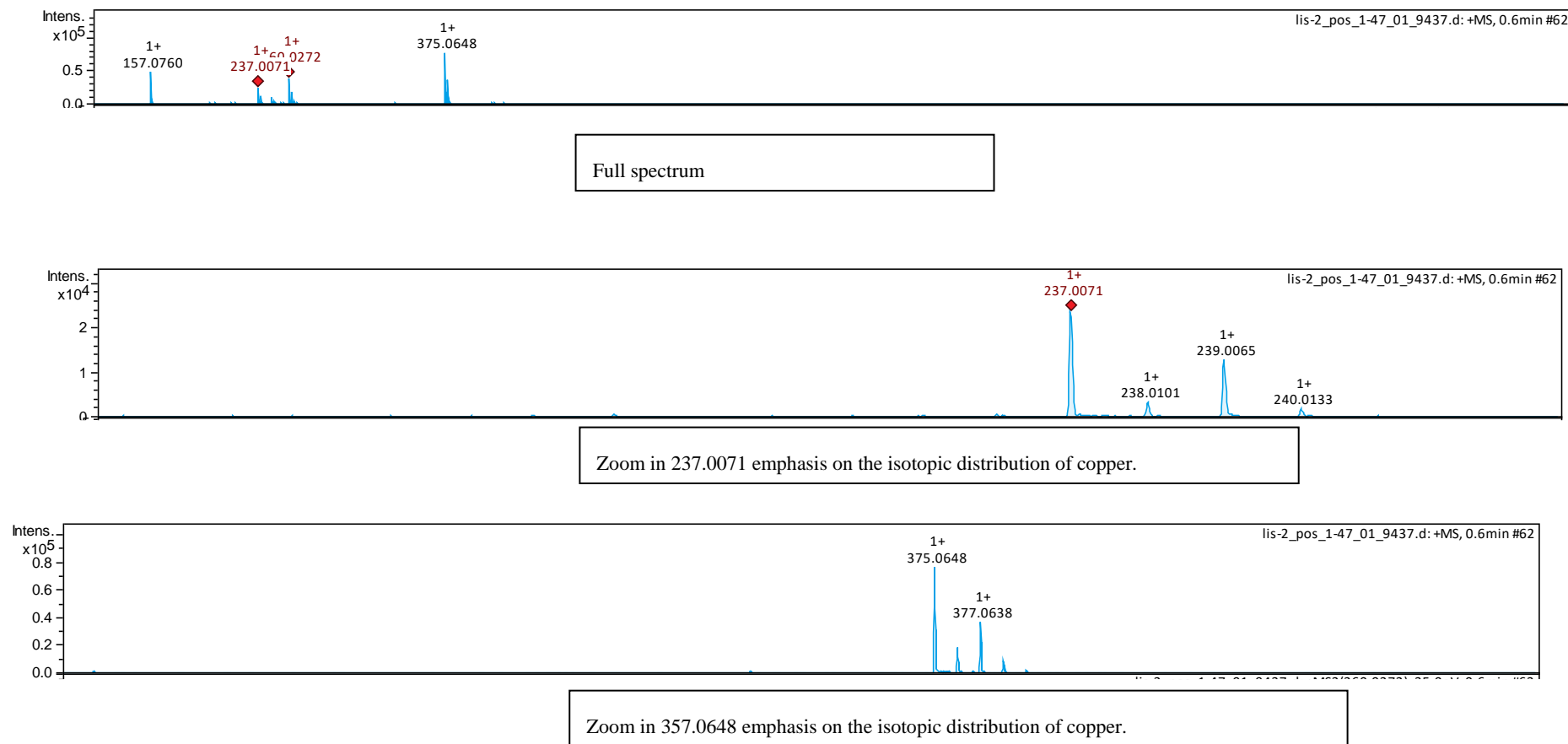


Figure S2. ESI-HRMS spectrum of the complex 2.



Figure S3. Cuvettes containing the solutions of the complex 1 (light green) and ligand (colorless). Picture taken during the experiment. Complex 2 and respective ligand have been presented similar behavior.

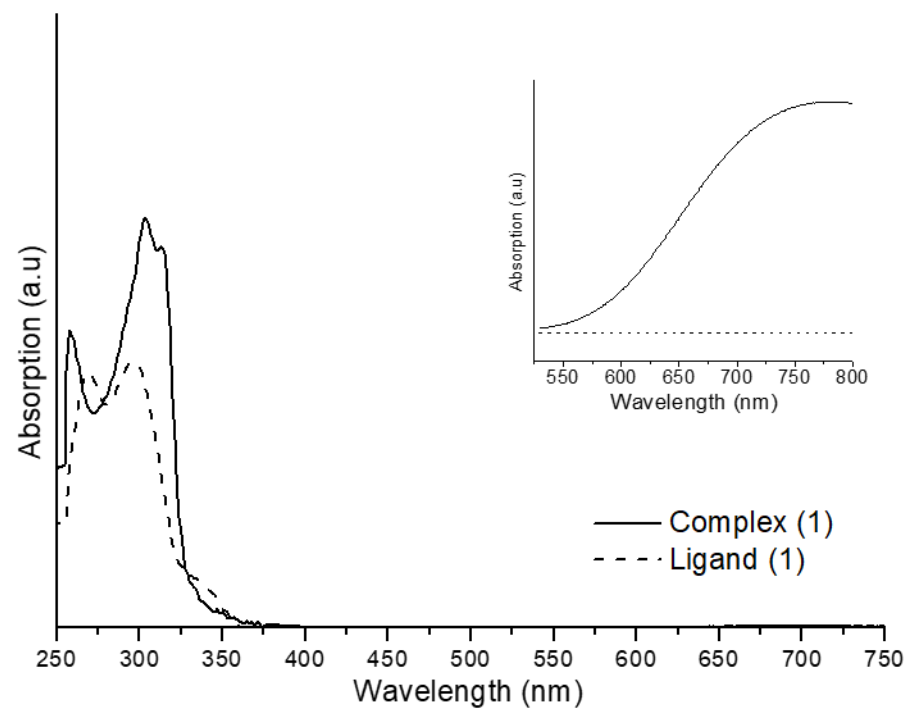


Figure S4. UV-Vis absorption spectra of the complex 1 and respective ligand measured at 298 K. This experiment was performed 36 h after preparing the solutions.

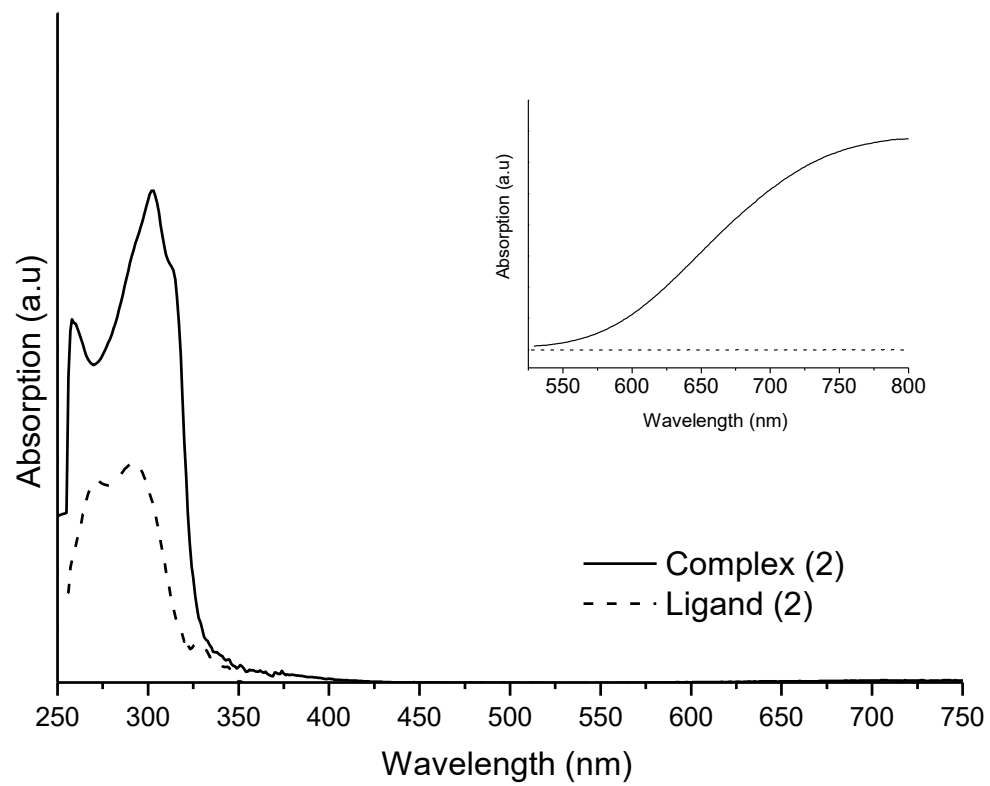


Figure S5. UV-Vis absorption spectra of the complex 2 and respective ligand measured at 298 K. This experiment was performed 36 h after preparing the solutions.

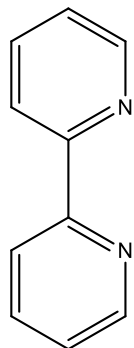


Figure S6. Green solid of the Complex 1 obtained after filtration.

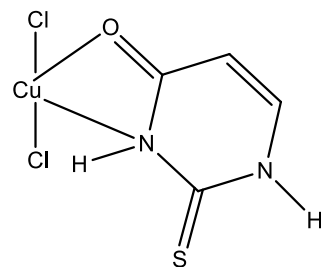


Figure S7. Green solid of the Complex 2 obtained after filtration.

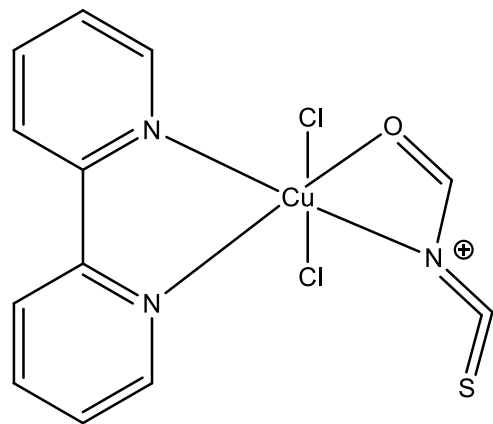
Possible Fragments of the complex 1



[bipyH⁺] *m/z* 157.0680

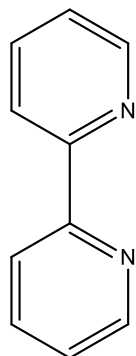


[Cu(L)Cl₂H⁺] *m/z* 260.8717

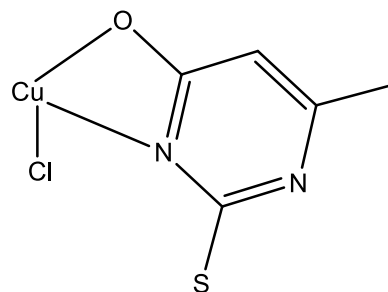


[C₁₂H₉Cl₂CuN₃OS]⁺ *m/z* 375.9134

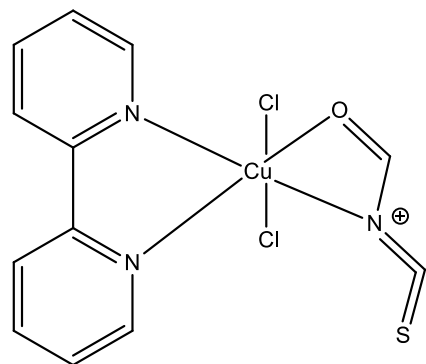
Possible fragments of the complex 2



[bipyH⁺] *m/z* 157.0680



[C₅H₄ClCuN₂OS]⁺ *m/z* 237.9029



[C₁₂H₉Cl₂CuN₃OS] *m/z* 375.9134



Influence of Land Use and Cover on Toxicogenetic Potential of Surface Water from Central-West Brazilian Rivers

Juliana Caroline Vivian Sposito¹ · Luiza Flavia Veiga Francisco¹ · Bruno do Amaral Crispim² · Fabiana Gomes da Silva Dantas² · Jéssica Pereira de Souza¹ · Lucilene Finoto Viana³ · Julio César Jut Solórzano³ · Kelly Mari Pires de Oliveira² · Alexeia Barufatti²

Received: 12 August 2018 / Accepted: 28 January 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

The objective of this study was to evaluate toxicogenetic potential of surface water samples from rivers of center-west Brazil and analyze the influence of land use and cover and physicochemical parameters in genetic damage. Samples were collected during winter (June) and summer (November) at sampling sites from Dourados and Brilhante Rivers (Mato Grosso do Sul/Brazil). The toxicogenetic variables, including chromosomal alterations, micronuclei, and mitotic index, were analyzed in meristematic cells of *Allium cepa*; and micronuclei, nuclear abnormalities, and DNA strand breaks (arbitrary units, AU_T) were analyzed in erythrocytes of *Astyanax lacustris*. The rivers presented physicochemical values outside the Brazilian laws, which can be a characteristic of human pollution (domestic sewage and local agriculture). The results of *A. cepa* test suggest that the water samples from Dourados and Brilhante rivers exerted significant ($p < 0.05$) cytotoxic and genotoxic effects, in both periods of collection, especially alterations in mitotic index. In blood cells of *A. lacustris*, genotoxic effect of the water samples from the rivers also was observed as significant nuclear abnormalities, DNA breaks (UA_T), in both sampling periods, compared with the negative control. Spearman correlation analyses revealed that data of land use and cover and physicochemical parameters were statistically correlated with DNA damages in bioassays. This study demonstrates toxicogenetic potential of water samples from Dourados and Brilhante rivers; furthermore, the type of land use and land cover and physicochemical parameters were revealed to have influence on toxicogenetic damage.

The land cover around rivers has important effects on water quality and is considered a potentially informative tool for analyzing the integrity of aquatic ecosystems (Bua et al. 2014). Anthropogenic actions such as industrial, agricultural, and/or domestic effluents are considered the main sources of water resource contamination. In the aquatic environment, these compounds favor formation of complex mixtures that may persist in the environment and may cause DNA damage in the organisms exposed (Lorente et al. 2015;

Manzano et al. 2015). Complexity of the pollutants in environmental samples demands simple, sensitive, and accessible tests (Tabrez et al. 2011). In this sense, toxicogenetic effects of complex mixtures from river water samples often have been evaluated in animals and plants (Castro e Sousa et al. 2017; Matos et al. 2017).

Fishes often are used as biological indicators of water quality and biomonitors for the presence of pollutants due to bioaccumulation of toxic substances and sensitivity to anthropogenic compounds. Freshwater fish of the genus *Astyanax* has been used in environmental monitoring studies as biomarkers for analyzing water resource contamination (Trujillo-Jiménez et al. 2011; Yamamoto et al. 2016). *Astyanax lacustris*, popularly known as “lambari-do-rabo-amarelo,” of the Characidae family, is one of the most abundant fish species and exhibits a wide distribution, practically in all watersheds of Brazil (Súarez et al. 2011). In addition, da Rocha et al. (2018) observed DNA changes in erythrocytes of *A. lacustris*, exposed to water samples from the

✉ Alexeia Barufatti
baruffatialexeia@gmail.com

¹ Faculty of Exact Sciences and Technology, Federal University of Grande Dourados/UFGD, Street João Rosa Góes, Vila Progresso, Dourados, MS 79.825-070, Brazil

² Faculty of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados/UFGD, Street João Rosa Góes, Vila Progresso, Dourados, MS 79.825-070, Brazil

³ State University of Mato Grosso do Sul, Dourados, MS, Brazil



From collection to discharge: physical, chemical, and biological analyses for fish farm water quality monitoring

Jéssica Pereira de Souza¹ · Juliana Caroline Vivian Sposito¹ · Bruno do Amaral Crispim¹ · Fabiane Gomes da Silva¹ · Kelly Mari Pires de Oliveira² · Fábio Kummrow³ · Valter Aragão do Nascimento⁴ · Cassiana Carolina Montagner⁵ · Lucilene Finoto Viana⁶ · Julio César Jut Solórzano⁶ · Alexeia Barufatti²

Accepted: 4 October 2018 / Published online: 10 January 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

The use of chemical substances for the management of fish farming activities may compromise the quality of the tank water itself and of water bodies that receive the effluents. As studies that assess the environmental effect caused by pisciculture are scarce, the present study aimed at evaluating the water quality in two fish farms in the region of Grande Dourados, Brazil, from the site of water collection to the site of water disposal. The tools used for this purpose were the analysis of land use and cover and the determination of physical, chemical, and biological parameters of water samples. Maps of land use and cover were created, and water samples were collected at four sampling sites in two fish farms. The *Allium cepa* test, assays with *Astyanax lacustris*, and the *Salmonella*/microsome assay were performed. In addition, physical and chemical parameters were measured and metal and emerging contaminants in the water samples were investigated. The *A. lacustris* demonstrated the genotoxicity and the *Salmonella*/microsome assay suggested the mutagenic potential of water samples from the fish farms and indicated higher genotoxicity in the disposal tanks than in the collection tanks of the Brilhante fish farm. However, all the samples at the Dourados fish farm were genotoxic, and mutagenicity was shown to start at the water collection site. With regard to the *A. cepa* test, there was no statistical difference between the collection sites in both fish farms. Moreover, the observed genetic damage may be associated with the presence of metals and emerging contaminants in the water samples, which suggests that these chemicals have potential genotoxic and mutagenic effects that are related to the type of land use and cover in the area of the region studied. Considering that contaminated waters can potentially disturb the structure and functioning of natural ecosystems, the present study demonstrated the importance of treating fish farm effluent to minimize the negative effect of this activity on water bodies.

Keywords Ecotoxicological assessment · Land use and cover · Emerging contaminants · Metals · Fish farm effluents

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10646-018-1991-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Alexeia Barufatti
barufattialexeia@gmail.com

¹ Faculty of Exact Sciences and Technology, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

² Faculty of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

³ Department of Pharmaceutical Sciences, Institute of

Introduction

The Central-West region of Brazil is a leading player in pisciculture, with the state of Mato Grosso do Sul (MS) being the third largest for fish farming. Pisciculture plays an important role in the state's economy, accounting for 27.5% of fish production (Souza 2012; IBGE 2013),

Environmental, Chemical and Pharmaceutical Sciences, Federal University of São Paulo, Diadema, São Paulo, Brazil

⁴ Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

⁵ Institute of Chemistry, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

⁶ UEMS/Postgraduate Program in Natural Resources, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

Impactos das Tecnologias nas Ciências Biológicas e da Saúde

3

Christiane Trevisan Slivinski
(Organizadora)

 **Atena**
Editora

Ano 2019

EXTRATO DE *Fusarium graminearum* É UMA ALTERNATIVA NÃO TÓXICA PARA USO COMO CORANTE NATURAL: OBTENÇÃO, ESTABILIDADE E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Brenda Kischkel

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Biologia
Maringá-PR

Beatriz Paes Silva

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica
Maringá-PR

Fabiana Gomes da Silva Dantas

Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Dourados-MS

Kelly Mari Pires de Oliveira

Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Dourados-MS

Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina
Maringá-PR

Melyssa Negri

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina
Maringá-PR

RESUMO: A obtenção de corantes naturais de fungos apresenta algumas vantagens como ser de fonte renovável, de baixo impacto ambiental e alta capacidade de biodegradação, sendo mais harmônica com meio ambiente e menos

nociva à saúde do que os corantes sintéticos. Os pigmentos naturais têm ampla aplicação e podem ser utilizados nas indústrias têxtil, farmacêutica e alimentícia. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um bioprocessamento simples para a produção e extração de pigmentos de *Fusarium graminearum*, bem como avaliação de possíveis atividades biológicas do extrato. Para otimizar a produção de pigmento pelo fungo, este foi exposto a fermentação submersa e semi-sólida, variando a composição do meio, temperatura e pH. Além disso, o extrato de pigmentos foi exposto a diferentes condições físico-químicas e parâmetros de tingimento para avaliação de sua estabilidade. A confiabilidade do extrato foi determinada através de metodologias para avaliação de atividade antibacteriana, citotoxicidade e mutagenicidade. A produção de pigmentos pelo fungo apresentou potencial em meio PDA semissólido, pH 6, incubado a 27 °C na ausência de luz. Os pigmentos obtidos foram estáveis aos parâmetros testados: temperatura, pH, vapor quente e condições de tingimento. O extrato demonstrou baixa citotoxicidade, efeito antibacteriano e não apresentou potencial mutagênico. Esses resultados são animadores, pois atestam a confiabilidade do extrato para uso industrial.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação semissólida, Pigmentos, Fungos, Bioprocessamento, Citotoxicidade.

SHORT COMMUNICATION



Antifungal activity of *Annona coriacea* Mart. ethanol extracts against the aetiological agents of cryptococcosis

Adriana Araújo de Almeida-Apolonio^a, Fabiana Gomes da Silva Dantas^b, Allan Belarmino Rodrigues^c, Claudia Andréa Lima Cardoso^d, Melyssa Negri^e, Kelly Mari Pires de Oliveira^f and Marilene Rodrigues Chang^a

^aFaculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil; ^bFaculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Brazil; ^cFaculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Brazil; ^dDepartamento de Química, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, Brazil; ^eDepartamento de Análise Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil; ^fFaculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Brazil

ABSTRACT

Cryptococcosis is an opportunistic disease with a worldwide distribution. This disease is caused by fungi of the genus *Cryptococcus*, and its treatment is limited to several antifungals. In this study, the antifungal, cytotoxic and mutagenic properties of ethanol extracts from the bark and leaves of *Annona coriacea* were evaluated against the standard *Cryptococcus* species and clinical yeast specimens. Both extracts of *A. coriacea* showed inhibitory activity of 1.5 mg/mL for all of the yeasts tested. The number of viable cells at the lowest tested concentration was 0.187 mg/mL. The extracts that were tested showed inhibitory activity and reduced the fungal growth of the *Cryptococcus gattii* species and *Cryptococcus neoformans* species complexes, suggesting that this plant may be an effective alternative treatment for cryptococcosis.


ARTICLE HISTORY

Received 8 November 2017
Accepted 4 February 2018

KEYWORDS

Cryptococcus neoformans;
Cryptococcus gattii; medicinal
plant; antifungal activity

CONTACT Kelly Mari Pires de Oliveira ✉ kmpoliveira@hotmail.com

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1440221>.

Research Article

Control of *Cryptococcus Gattii* Biofilms by an Ethanolic Extract of *Cochlospermum Regium* (Schrank) Pilger Leaves

Adriana A. Almeida-Apolonio ¹, Wellington J. Cupozak-Pinheiro,²
Vagner M. Berres,³ Fabiana G. S. Dantas,⁴ Terezinha I. E. Svidzinski,⁵
Kelly M. P. Oliveira ³, and Marilene R. Chang¹

¹Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS 79070-900, Brazil

²Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS 79804-970, Brazil

³Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS 79804-970, Brazil

⁴Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS 79804-970, Brazil

⁵Departamento de Análise Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR 87020-900, Brazil

Correspondence should be addressed to Adriana A. Almeida-Apolonio; aaaraujo.a@hotmail.com

Received 19 March 2018; Revised 22 April 2018; Accepted 8 May 2018; Published 6 June 2018

Academic Editor: Carlos H. G. Martins

Copyright © 2018 Adriana A. Almeida-Apolonio et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cryptococcus gattii is an etiologic agent of cryptococcosis and a serious disease that affects immunocompromised and immunocompetent patients worldwide. The therapeutic arsenal used to treat cryptococcosis is limited to a few antifungal agents, and the ability of *C. gattii* to form biofilms may hinder treatment and decrease its susceptibility to antifungal agents. The objective of this study was to evaluate the antifungal and antibiofilm activities of an ethanolic extract of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger leaves against *C. gattii*. The antifungal activity was assessed by measuring the minimum inhibitory concentration (MIC) using the broth microdilution technique and interaction of the extract with fluconazole was performed of checkerboard assay. The antibiofilm activity of the extract was evaluated in 96-well polystyrene microplates, and the biofilms were quantified by counting colony forming units. The extract showed antifungal activity at concentrations of 62.5 to 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and when the extract was evaluated in combination with fluconazole, *C. gattii* was inhibited at sub-MIC levels. The antibiofilm activity of the extract against *C. gattii* was observed both during biofilm formation and on an already established biofilm. The results showed that the ethanolic extract of the leaves of *C. regium* shows promise for the development of antifungal drugs to treat cryptococcosis and to combat *C. gattii* biofilms.

1. Introduction

Cryptococcosis is a fungal infection that occurs worldwide. Despite the predominant result of opportunistic infections of immunocompromised patients, the incidence of infections among immunocompetent individuals is increasing [1–4]. Recently, studies have shown that cryptococcosis is a neglected tropical disease, although it is not recognized as such by the World Health Organization [5, 6]. Some factors that contributed to this conclusion included high mortality rates in treated patients (ranging from 20 to 60%) that can reach 100% in untreated patients [6].

Despite the importance of this disease, the treatment of cryptococcosis is limited to the antifungals fluconazole and amphotericin B, which are used alone or in combination with 5-flucytosine [7]. The primary etiological agents of cryptococcosis are species of the complexes *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* [8], which respond differently to the treatment established for meningoenzephalitis [9]. *C. gattii* is not only more clinically aggressive but also more difficult to control. Species of the *C. gattii* complex can compromise immunocompetent individuals and cause severe diseases of the central nervous system, such as meningitis, encephalitis, and meningoenzephalitis [9]. In addition, lesions and

Research Article

***In Vitro* Control of Uropathogenic Microorganisms with the Ethanolic Extract from the Leaves of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger**

Danny Ellen Meireles Leme,¹ Allan Belarmino Rodrigues,¹ Adriana Araújo de Almeida-Apolonio,² Fabiana Gomes da Silva Dantas,³ Melyssa Fernanda Norman Negri,⁴ Terezinha Inez Estivalet Svidzinski,⁴ Jonas da Silva Mota,⁵ Claudia Andrea Lima Cardoso,⁵ and Kelly Mari Pires de Oliveira^{3,6}

¹Faculty of Exact Sciences and Technology, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil

²Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

³Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil

⁴Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

⁵Course of Chemistry, State University of Mato Grosso do Sul, Dourados, MS, Brazil

⁶Faculty of Biological and Environmental Science, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil

Correspondence should be addressed to Kelly Mari Pires de Oliveira; kellyoliveira@ufgd.edu.br

Received 3 August 2017; Revised 3 November 2017; Accepted 9 November 2017; Published 11 December 2017

Academic Editor: Letizia Angiolella

Copyright © 2017 Danny Ellen Meireles Leme et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The roots of *Cochlospermum regium*, popularly known as “algodãozinho-do-cerrado,” are used for the treatment of genitourinary infections. However, the removal of their subterranean structures results in the death of the plant, and the use of the leaves becomes a viable alternative. Therefore, the antimicrobial activity of *Cochlospermum regium* leaf’s ethanolic extract and its action on the biofilm formation of microorganisms associated with urinary infection were evaluated. The total phenolic compounds, flavonoids, and tannins were quantified using the reagents Folin-Ciocalteu, aluminum chloride, and vanillin, respectively. The antimicrobial activity was evaluated by the broth microdilution method and the effect of the extract in the biofilm treatment was measured by the *drop plate* method. Cytotoxicity was evaluated by the method based on the reduction of MTS and the mutagenicity by the Ames test. The ethanolic extract of *C. regium* leaves presented 87.4 mg/EQ of flavonoids, 167.2 mg/EAG of total phenolic compounds, and 21.7 mg/ECA of condensed tannins. It presented reduction of the biofilm formation for *E. coli* and *C. tropicalis* and antimicrobial action of 1 mg/mL and 0.5 mg/mL, respectively. The extract showed no cytotoxicity and mutagenicity at the concentrations tested. This study demonstrated that *C. regium* leaves are a viable option for the treatment of genitourinary infections and for the species preservation.

1. Introduction

Urinary tract infection (UTI) is a public health problem that affects millions of people every year [1]. It is defined as the colonization of pathogenic microorganisms that affect the urinary system tissues causing infection [2]. Urinary infection of bacterial origin is most often caused by enteric Gram-negative bacteria, with *Escherichia coli* being the most

predominant microorganism [3, 4]. Opportunistic microorganisms such as yeast are also considered uropathogens, and the genus *Candida* has been reported as one of the most important [5]. Among yeasts of this genus, *Candida tropicalis* is among the most isolated ones in patients diagnosed with urinary infection [6].

A serious nosocomial problem currently faced in relation to these microorganisms is the formation of biofilm, which