



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ÉRIMA MARIA DE AMORIM

**AVALIAÇÃO DO EFEITO GENOTÓXICO, MUTAGÊNICO E TERATOGENICO DAS
PLANTAS MEDICINAIS *MYRACRODRUON URUNDEUVA* ALLEMÃO
(ANACARDIACEAE) E *SIDEROXYLON OBTUSIFOLIUM* (ROEM. & SCHULT.) T. D.
PENN. (SAPOTACEAE)**

Recife

2020

ÉRIMA MARIA DE AMORIM

**AVALIAÇÃO DO EFEITO GENOTÓXICO, MUTAGÊNICO E TERATOGENICO DAS
PLANTAS MEDICINAIS *MYRACRODRUON URUNDEUVA* ALLEMÃO
(ANACARDIACEAE) E *SIDEROXYLON OBTUSIFOLIUM* (ROEM. & SCHULT.) T. D.
PENN. (SAPOTACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia (RENORBIO), da
Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde

Orientador: Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Coorientadora: Profa. Dra. Claudia Rohde

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Amorim, Érika Maria de

Avaliação do efeito genotóxico, mutagênico e teratogênico das plantas medicinais *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) e *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T. D. Penn. (Sapotaceae) / Érika Maria de Amorim - 2020.

109 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Rafael Matos Ximenes

Coorientadora: Claudia Rohde

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2020.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. *Drosophila melanogaster* 2. Ensaio cometa 3. Medicina popular
I. Ximenes, Rafael Matos (Orientador) II. Rohde, Claudia
(Coorientadora) III. Título

615.3 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-206

ÉRIMA MARIA DE AMORIM

**AVALIAÇÃO DO EFEITO GENOTÓXICO, MUTAGÊNICO E TERATOGENICO DAS
PLANTAS MEDICINAIS *MYRACRODRUON URUNDEUVA* ALLEMÃO
(ANACARDIACEAE) E *SIDEROXYLON OBTUSIFOLIUM* (ROEM. & SCHULT.) T. D.
PENN. (SAPOTACEAE)**

Aprovada em: 28/02/2020

BANCA EXAMINADORA:

1º Examinador: Dr. Rafael Matos Ximenes – UFPE

2º Examinador: Dra. Jaciana dos Santos Aguiar – UFPE

3º Examinador: Dra. Marcia Silva do Nascimento – UFPE

4º Examinador: Dr. Cristiano Aparecido Chagas – UFPE

5º Examinador: Dr. Emerson Peter da Silva Falcão - UFPE

Dedico este trabalho
aos meus pais Severino Joaquim de Amorim e Cícera Jesuína da Conceição, as
minhas irmãs Erisbania Maria de Amorim e Érica Maria de Amorim, pelo apoio e
incentivo durante toda a minha caminhada, e ao meu amor Jaziel Valério Florêncio,
que com toda a paciência e amor esteve ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por guiar meus passos ao longo desta jornada, inspirar meus pensamentos, conter meus sentimentos, por estar sempre comigo em todas as minhas decisões, angústias e alegrias. Por ter me mostrado o caminho e me dado forças para continuar quando tudo parecia perdido.

Aos meus pais Severino Joaquim de Amorim e Cícera Jesuína da Conceição que são a essência do que sou. Obrigado por estarem sempre ao meu lado, apoiando as minhas decisões e torcendo por mim, mesmo que isso tenha sido ao custo da minha ausência do convívio familiar. Todas as palavras não seriam o suficiente para expressar todo o amor e gratidão que sinto. Vocês são o motivo da minha existência, o meu incentivo para levantar em cada derrota, o meu motivo de continuar sempre.

As minhas amadas irmãs Erisbania Maria de Amorim e Érica Maria de Amorim, ao meu cunhado Roberlan da Costa Borba e ao meu sobrinho Lucas Henrique da Costa Borba, meus agradecimentos especiais. Não tenho palavras para descrever todo amor e gratidão que tenho, obrigada por estarem comigo em todos os momentos, por partilharem comigo as tristezas, angústias e alegrias. Por acreditarem em mim até mais do que eu, por me darem forças quando eu já não tinha.

Ao meu esposo, Jaziel Valério Florêncio, todo o meu amor e gratidão, por escutar as minhas angústias, por estar sempre disposto a me ajudar, por entender as minhas ausências, por toda paciência, carinho e incentivo. Pelo apoio e conselhos para minha vida profissional e pessoal.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes, que aceitou me orientar, mesmo sem me conhecer, pelos valiosos ensinamentos, pela paciência e compreensão das minhas limitações. Pela oportunidade e confiança na orientação e valorosas contribuições ao longo de todas as etapas do meu doutorado, pelo bom convívio ao longo desse tempo de pesquisa, pelo apoio e conselhos, serei eternamente grata.

A minha Coorientadora, Profa. Dra. Claudia Rohde, a quem tenho grande apreço, por abrir as portas do laboratório para mim desde a iniciação científica, pelo carinho que vai além das atividades acadêmicas, pelos valiosos ensinamentos, paciência e compreensão ao longo de todos esses anos. Pela oportunidade, confiança e o bom convívio, pelo companheirismo e dedicação na resolução dos problemas ao longo de toda a minha vida acadêmica. Por sempre estar disponível a me ajudar.

Ao Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira, que nos cedeu os extratos para realização dos ensaios biológicos, agradeço a parceria e o incentivo para realização deste trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Genética CAV/UFPE, em especial a Rita Dayane Coutinho Silva e Ana Patrícia da Costa pelo carinho e companheirismo, por me propiciarem diversos momentos de alegria e descontração em meio a rotina cansativa do laboratório, pelas palavras de incentivo e confiança em meio às controvérsias da pesquisa, por escutarem minhas lamentações e terem sempre uma palavra amiga para me segurar, vocês foram essenciais em meus dias de pesquisa no laboratório.

Ao grupo da Mutagênese do Laboratório de Genética CAV/UFPE aqui representados por Cícero Jorge Verçosa, André Severino da Silva, Jéssica Celerino dos Santos, Samuel Lima de Santana e Edson Francisco do Carmo Neto, que estiveram sempre comigo, me incentivando e apoiando. A vocês um agradecimento todo especial pelo aprendizado em conjunto e partilha de momentos de grande desenvolvimento profissional e humanístico.

A André Severino da Silva, meu colega de turma, de pesquisa e amigo que se tornou irmão, todas as palavras do mundo não seriam suficientes para descrever toda admiração e gratidão que sinto, por todo apoio, incentivo, companheirismo, por partilhar comigo as tristezas, angústias e alegrias, por toda ajuda dispendida, por não medir esforços para me ajudar na minha vida profissional e pessoal. Você foi essencial para realização desse trabalho.

Ao meu amigo José Wellinton da Silva, todas as palavras do mundo não seriam suficientes para descrever toda admiração e gratidão que sinto por ter me levado a cursar o doutorado em Biotecnologia, mostrar todos os caminhos e dizer que eu era capaz. Sem você eu não teria chegado até aqui. Por estar ao lado em todos os momentos durante a realização dos experimentos, por todo apoio, incentivo, força, companheirismo, por partilhar comigo as tristezas, angústias e alegrias. Por toda ajuda dispendida, por não medir esforços para me ajudar na minha vida profissional e pessoal. Uma amizade que teve início na graduação e que se estendeu para a vida. A você minha eterna gratidão, admiração e amizade, sem você nada disso teria se realizado.

A Alisson Rodrigo da Silva Oliveira, meu amigo e companheiro de pesquisa, meus agradecimentos e admiração, por todo apoio, incentivo, por não medir esforços para me ajudar, por partilhar comigo as tristezas, angústias e alegrias. Amizade que vai além da pesquisa, que veio do cursinho pré-vestibular (CAVEST) e se seguiu para toda a vida. A você minha eterna gratidão, você foi essencial para a realização deste trabalho.

Aos colegas do grupo de pesquisa do Laboratório de Etnofarmacologia Aplicada, representados por João Alberto Lins de Lima, Raudiney Franklin Vasconcelos Mendes, Camila Alves da Silva, Jucielma Silva de Lima, Pérola Paloma Silva do Nascimento que me acolheram no laboratório da melhor forma possível, sempre me ajudando quando precisei, pelos momentos de alegrias e angústias compartilhados. Em especial a Maria de Fátima Rodrigues, minha companheira de pesquisa e amiga desde a graduação, por todo apoio, incentivo, companheirismo, por partilhar comigo as tristezas, angústias e alegrias, por toda ajuda dispendida, por não medir esforços para me ajudar na minha vida profissional e pessoal. Minha eterna gratidão e amizade. Você foi indispensável para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão, meu orientador no mestrado, sem o senhor eu não teria chegado até aqui. Por todo apoio e ensinamentos na minha vida pessoal e profissional, levarei sempre comigo suas palavras de sabedoria. Por estar sempre disposto a me ajudar. Meus eternos agradecimentos.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, agradeço a contribuição na minha formação científica e profissional.

Aos colegas de turma, em especial à Zilmar Meireles Pimenta Barros e Tamires Meira Menezes agradeço pelo magnífico convívio, por todo apoio, incentivo, companheirismo, por partilharem comigo as tristezas, angústias e alegrias e pela constante construção do conhecimento em conjunto.

RESUMO

As plantas medicinais, *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) e *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T. D. Penn. (Sapotaceae), conhecidas popularmente como aroeira-do-sertão e quixabeira são amplamente utilizadas para tratar inflamações e infecções do trato genital feminino, problemas estomacais e cicatrização de feridas. Apresentando propriedades descritas na literatura como ação gastroprotetora, anti-úlceras, anti-inflamatória e antimicrobiana. Apesar dos muitos usos na fitoterapia tradicional, existem poucos relatos dos seus efeitos tóxicos-genéticos e teratogênicos. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos genotóxicos e mutagênicos *in vivo* do decocto das folhas de *M. urundeuva* e *S. obtusifolium* em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, por meio do ensaio cometa e do teste de mutação e recombinação somática (SMART), além do potencial teratogênico em ratas Wistar. Os decoctos foram caracterizados por UPLC-ESI-qTOF-MS/MS e foram encontrados fenóis, flavonoides e saponinas, além de um derivado aminoácido não-proteico. O ensaio cometa foi realizado em hemócitos de *D. melanogaster*, linhagem Oregon-R, estudados após a alimentação dos indivíduos por 24 horas em meio de cultura hidratado com seis diferentes concentrações de cada um dos decoctos (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 mg/mL). Os resultados foram comparados com o grupo controle negativo (água destilada) e controle positivo (Ciclofosfamida, 1 mg/mL). No SMART, os organismos descendentes dos cruzamentos entre as linhagens de *D. melanogaster mwh* e *flr³* foram submetidos às mesmas concentrações, de ambas as plantas, e os resultados foram comparados com o grupo controle negativo (água destilada) e controle positivo (Doxorrubicina, 1,0 mg/mL). Para avaliar o potencial teratogênico, ratas Wistar prenhas receberam, na fase de organogênese (6º ao 15º dia pós-coito), as doses de 250, 500 e 1000 mg/kg dos decoctos, por via oral, sendo os resultados comparadas ao grupo controle negativo (água potável). No 21º dia de gestação, as fêmeas foram eutanasiadas em câmara de CO₂ e submetidas à laparotomia, para avaliação da performance reprodutiva. Os fetos foram avaliados quanto à embriofetotoxicidade, análise de anomalias e/ou malformações externas e internas. No ensaio cometa, todas as concentrações dos decoctos das folhas das plantas em estudo causaram efeito genotóxico. Os resultados foram corroborados pelo SMART, que demonstrou efeito mutagênico dos decoctos, em todas as concentrações testadas. No entanto, os decoctos nas doses testadas (250, 500 e 1000 mg/kg), não causaram embriofetotoxicidade, nem teratogenicidade na prole. O conjunto de resultados indica que os decoctos de folhas de *M. urundeuva* e *S. obtusifolium* têm efeito genotóxico e mutagênico para *D. melanogaster*, mas não foram tóxicos para ratas Wistar, nem para sua prole, de acordo com os parâmetros e condições avaliados.

Palavras-chave: Ensaio cometa. SMART. *Drosophila melanogaster*. medicina popular.

ABSTRACT

The medicinal plants, *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) and *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T. D. Penn. (Sapotaceae), popularly known as aroeira-do-sertão and quixabeira, are widely used to treat inflammation and infections of the female genital tract, stomach problems and wound healing. Presenting properties described in the literature as gastroprotective, anti-ulcer, anti-inflammatory, and antimicrobial. Despite the many uses in traditional herbal medicine, there are few reports of its toxic-genetic and teratogenic effects. In this context, the aim of this study was to investigate the in vivo genotoxic and mutagenic effects of *M. urundeuva* and *S. obtusifolium* leaf decoction on somatic cells of *Drosophila melanogaster*, through the application of the comet assay and the mutation and somatic recombination test (SMART), in addition to the teratogenic potential in Wistar rats. The decoctions were characterized by UPLC-ESI-qTOF-MS/MS and phenols, flavonoids and saponins were found, additionally to a non-protein amino acid derivative. The comet assay was performed on hemocytes of *D. melanogaster*, Oregon-R strain, studied after feeding the individuals for 24 hours in a hydrated culture medium with six different concentrations of each one of the decoctions (0.5; 1.0; 2.0; 4.0; 8.0 and 16.0 mg/mL). The results were compared with the negative control group (distilled water) and positive control group (Cyclophosphamide, 1 mg/mL). On SMART, the descendent organisms from the crosses between the strains of *D. melanogaster* *mwh* and *flr*³ were subjected to the same concentrations of both plants, and the results were compared with the negative control group (distilled water) and positive control (Doxorubicin, 1,0 mg/mL). To assess the teratogenic potential, pregnant Wistar rats received, in the organogenesis phase (6th to 15th day post-coitus), doses of 250, 500 and 1000 mg/kg of decoctions, orally, and the results were compared to the negative control group (drinking water). On the 21st day of gestation, the females were euthanized in a CO₂ chamber and submitted to laparotomy to assess their reproductive performance. Foetuses were evaluated for embryofetotoxicity, analysis of abnormalities and/or external and internal malformations. In the comet assay, all concentrations of the leaf decoctions of the plants under study caused a genotoxic effect. The results were corroborated by SMART, which demonstrated a mutagenic effect of decoctions at all concentrations tested. However, the decocts at the doses tested (250, 500 and 1000 mg/kg) did not cause embryofetotoxicity or teratogenicity in the offspring. The set of results indicates that *M. urundeuva* and *S. obtusifolium* leaf decoctions have genotoxic and mutagenic effects for *D. melanogaster* but were not toxic for Wistar rats or their offspring, according to the parameters and conditions evaluated.

Keywords: Comet assay. SMART. *Drosophila melanogaster*. folk medicine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Exemplar de <i>Myracrodruon urundeuva</i> . Fonte: Fernando Tagiba (http://www.biologo.com.br/plantas/fichas/aroeira.html)	21
Figura 2 –	Foto da casca de <i>Myracrodruon urundeuva</i> . Fonte: Fernando Tagiba (http://www.biologo.com.br/plantas/fichas/aroeira.html)	22
Figura 3 –	Foto das folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> . Fonte: Embrapa Pantanal (https://www.cpap.embrapa.br/plantas/ficha.php?especie=Myracrodruon%20urundeuva%20(Engl.)%20Fr.)	23
Figura 4 –	Figura 3. Exemplar da espécie <i>Sideroxylon obtusifolium</i> . Fonte: http://www.kew.org/science/tropamerica/imagetatabase/index.html	25
Figura 5 –	Folhas e frutos da espécie <i>Sideroxylon obtusifolium</i> . Fonte: http://www.kew.org/science/tropamerica/imagetatabase/index.html	25
Figura 6 –	<i>Drosophila melanogaster</i> (Mosca de fruta). Fonte: https://br.depositphotos.com/stock-photos/drosophila.html?qview=33084311	27
Figura 7 –	Classificação visual dos danos genéticos, baseada no comprimento da cauda e na quantidade de DNA da cabeça dos cometas. As imagens foram obtidas de hemócitos de <i>Drosophila melanogaster</i> Oregon R, tratados com os compostos do presente estudo	34
Figura 8 –	Pelo da asa <i>mwh</i> (à esquerda) e pelo da asa <i>flr³</i> (à direita)	35
Figura 9 –	Aspecto dos fenótipos das manchas de pelos das asas de <i>Drosophila melanogaster</i> , em três categorias: (A) simples pequena, (B) simples grande; (C) mancha gêmea (ANDRADE et al., 2003)	37
Figura 10 –	(A) Fetos corados com vermelho de alizarina para a análise esquelética. (B) Fetos fixados em Bodian para análise visceral	40
Figura 11 –	Cromatograma do decocto das folhas de <i>M. urundeuva</i>	42
Figura 12 –	Cromatograma do decocto das folhas de <i>Sideroxylon obtusifolium</i>	44
Figura 13 –	Índice de Dano (DI) médio em hemócitos de larvas de Oregon-R de <i>Drosophila melanogaster</i> (n = 3 para cada um). Barras verticais indicam desvio padrão. As letras a, b e c no topo das colunas indicaram diferenças estatisticamente significativas nos grupos estudados que possuem letras diferentes, na análise <i>post-hoc</i> de Bonferroni ($P \leq 0,05$)	48
Figura 14 –	Frequência de Dano (DF%) média nos hemócitos de larvas de Oregon-R de <i>Drosophila melanogaster</i> (n = 3 para cada um). Barras verticais indicam desvio padrão. As letras a e b no topo das colunas indicaram diferenças estatisticamente significativas nos grupos estudados, indicadas pela análise <i>post-hoc</i> de Bonferroni ($P \leq 0,05$)	49
Figura 15 –	Número médio de adultos sobreviventes de <i>D. melanogaster</i> submetidos ao teste SMART, após exposição ao extrato de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	50

Figura 16 – Índice de Dano Médio (DI) em hemócitos de larvas de Oregon-R de <i>Drosophila melanogaster</i> (n=3 para cada um) tratados com concentrações de <i>Sideroxylon obtusifolium</i> . Barras verticais indicam desvio padrão. As letras a, b e c no topo das colunas indicaram diferenças estatisticamente significativas nos grupos estudados que possuem letras diferentes, na análise <i>post-hoc</i> de Bonferroni ($P \leq 0,05$)	53
Figura 17 – Frequência média de dano (DF%) nos hemócitos de larvas de Oregon-R de <i>Drosophila melanogaster</i> (n = 3 para cada um) tratados com concentrações de <i>Sideroxylon obtusifolium</i> . Barras verticais indicam desvio padrão. As letras a e b no topo das colunas indicaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, indicadas pela análise <i>post-hoc</i> de Bonferroni ($P \leq 0,05$)	54
Figura 18 – Número médio de adultos sobreviventes de <i>D. melanogaster</i> submetidos ao teste SMART, após exposição ao extrato de <i>Sideroxylon obtusifolium</i>	55
Figura 19 – Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>M. urundeuva</i> (250, 500 ou 1000 mg/kg) por via oral sobre o ganho de massa (g) em ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6° ao 15° dia pós-coito). Os valores apresentam as médias $\pm$ D.P.M. (n= 6-8 / grupo)	57
Figura 20 – A. Efeito do extrato aquoso das cascas do caule de <i>M. urundeuva</i> (250, 500 ou 1000 mg/kg) por via oral sobre o consumo de água (mL). B. Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>M. urundeuva</i> (250, 500 ou 1000 mg/kg) por via oral sobre o consumo de ração (g)	58
Figura 21 – Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>S. obtusifolium</i> (250, 500 ou 1000 mg/kg) por via oral sobre o ganho de massa (g) em ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6° ao 15° dia pós-coito). Os valores apresentam as médias $\pm$ D.P.M. (n= 6-8 / grupo)	58
Figura 22 – A. Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>S. obtusifolium</i> (250, 500 ou 1000 mg/kg) por via oral sobre o consumo de água (mL). B. Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>S. obtusifolium</i> (250, 500 ou 1000 mg/kg) por via oral sobre o consumo de ração (g)	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Estruturas observadas na análise visceral de acordo com as secções seriadas de WILSON (1965)	40
Tabela 2 –	Compostos detectados e identificados no decocto das folhas de <i>M. urundeuva</i> por UPLC-ESI-qTOF-MS/MS no modo de ionização negativo.....	43
Tabela 3 –	Compostos detectados e identificados no decocto das folhas de <i>S. obtusifolium</i> por UPLC-ESI-qTOF-MS/MS no modo de ionização negativo.....	45
Tabela 4 –	Resultados do número de danos genéticos observados em larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> Oregon R submetidas a tratamento controle negativo, positivo e a diferentes concentrações da decocção das folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> (MU), em três réplicas (a, b, c) e os respectivos valores de média e desvio padrão....	47
Tabela 5 –	Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste Bonferroni das comparações entre o Índice de Dano e Frequência de Dano, nos grupos controle negativo, controle positivo e diferentes concentrações do extrato da casca de <i>Myracrodruon urundeuva</i> , submetidos às larvas da linhagem Oregon-R de <i>Drosophila melanogaster</i>	48
Tabela 6 –	Frequência e número de manchas de pelos mutantes em moscas trans-heterozigotas (<i>mwh/flr³</i>) e heterozigotas balanceadoras (<i>mwh/TM³</i>) de <i>Drosophila melanogaster</i> submetidas ao tratamento com <i>Myracrodruon urundeuva</i> , após cruzamento padrão (ST), e avaliação dos efeitos genotóxicos.....	51
Tabela 7 –	Resultados do número de danos genéticos observados em larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> Oregon R submetidas a tratamento controle negativo, positivo e a diferentes concentrações da decocção das folhas de <i>Sideroxylon obtusifolium</i> (SO), em três réplicas (a, b, c) e os respectivos valores de média e desvio padrão.....	52
Tabela 8 –	Avaliação do índice de dano genético em larvas da linhagem Oregon-R de <i>Drosophila melanogaster</i> comparado ao controle negativo e a diferentes concentrações do decocto das folhas de <i>Sideroxylon obtusifolium</i> . Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste Bonferroni.....	53
Tabela 9 –	Frequência e número de manchas de pelos mutantes em moscas trans-heterozigotas (<i>mwh/flr³</i>) e heterozigotas balanceadoras (<i>mwh/TM³</i>) de <i>Drosophila melanogaster</i> submetidas ao tratamento com extrato aquoso das folhas <i>Sideroxylon obtusifolium</i> , após cruzamento padrão e avaliação dos efeitos genotóxico.....	56
Tabela 10 –	Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> nas doses (250, 500 e 1000 mg/kg) por via oral sobre as massas absolutas (g) e relativas (%) dos órgãos em ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6° ao 15° dia) comparadas ao grupo controle.....	60
Tabela 11 –	Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Sideroxylon obtusifolium</i> nas doses (250, 500 e 1000 mg/kg) por via oral sobre as massas absolutas (g) e relativas (%) dos órgãos em ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6° ao 15° dia) comparadas ao grupo controle.....	60
Tabela 12 –	Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> (EaMu 250, 500 e 1000 mg/kg) por via oral sobre os parâmetros reprodutivos em ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6° ao 15° dia)	61

Tabela 13 – Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Sideroxylon obtusifolium</i> (EaSO 250, 500 e 1000 mg/kg) por via oral sobre os parâmetros reprodutivos em ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6º ao 15º dia)	61
Tabela 14 – Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> (250, 500 e 1000 mg/kg) por via oral sobre as malformações e anomalias externas e internas (esquelética e visceral) sobre fetos e proles de ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6º ao 15º dia)	62
Tabela 15 – Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Sideroxylon obtusifolium</i> . (250, 500 e 1000 mg/kg) por via oral sobre as malformações e anomalias externas e internas (esquelética e visceral) sobre fetos e proles de ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6º ao 15º dia)	63
Tabela 16 – Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Myracrodruon urundeuva</i> (250, 500 e 1000 mg/kg) por via oral sobre os pontos de ossificação fetos e proles de ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6º ao 15º dia)	64
Tabela 17 – Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>Sideroxylon obtusifolium</i> (250, 500 e 1000 mg/kg) por via oral sobre os pontos de ossificação fetos e proles de ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6º ao 15º dia)	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	OBJETIVOS.....	18
1.1.1	Objetivo geral.....	18
1.1.2	Objetivos específicos.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	O USO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	19
2.2	<i>MYRACRODRUON URUNDEUVA</i> ALEMÃO.....	20
2.3	<i>SIDEROXYLON OBTUSIFOLIUM</i> (ROEM. & SCHULT.) T. D. PENN.....	24
2.4	O FENÔMENO MUTAÇÃO E O GÊNERO <i>DROSOPHILA</i>	26
2.5	TOXICIDADE REPRODUTIVA.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	31
3.2	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS POR UPLC-ESI-QTOF-MS/MS.....	31
3.3	ENSAIO COMETA.....	32
3.3.1	Tratamento das larvas de <i>Drosophila melanogaster</i>	32
3.3.2	Extração da hemolinfa.....	32
3.3.3	Montagem das lâminas, tratamento e eletroforese.....	33
3.3.4	Análises microscópicas e Testes estatísticos.....	33
3.4	TESTE DE MUTAÇÃO E RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA (SMART)	35
3.4.1	Cruzamentos específicos e diluições dos compostos.....	35
3.4.2	Montagem das lâminas.....	35
3.4.3	Análises microscópicas e testes estatísticos.....	35
3.5	TOXICIDADE REPRODUTIVA.....	37
3.5.1	Animais.....	37
3.5.2	Período de acasalamento e administração dos extratos.....	37
3.5.3	Avaliação da toxicidade aguda e performance reprodutiva materna.....	38
3.6	TERATOGENICIDADE.....	39
3.6.1	Análise das anomalias e/ou malformações externas.....	39
3.6.2	Análise das anomalias e/ou malformações esqueléticas, contagem dos pontos de ossificação, e análise e /ou malformações viscerais.....	39

3.6.3	Análise estatística.....	41
4	RESULTADOS.....	42
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS DECOCTOS SECOS DAS FOLHAS DE <i>MYRACRODRUON URUNDEUVA</i> E <i>SIDEROXYLON OBTUSIFOLIUM</i>	42
4.2	AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO DECOCTO DAS FOLHAS DE <i>MYRACRODRUON URUNDEUVA</i> PELO ENSAIO COMETA.....	46
4.3	AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DO DECOCTO DAS FOLHAS DE <i>MYRACRODRUON URUNDEUVA</i> , UTILIZANDO O TESTE SMART.....	49
4.4	AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO DECOCTO DAS FOLHAS DE <i>SIDEROXYLON OBTUSIFOLIUM</i> PELO ENSAIO COMETA.....	51
4.5	AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DO DECOCTO DAS FOLHAS DE <i>SIDEROXYLON OBTUSIFOLIUM</i> , UTILIZANDO O TESTE SMART.....	54
4.6	ESTUDO DA TERATOGENICIDADE DO DECOCTO DAS FOLHAS DE <i>MYRACRODRUON URUNDEUVA</i> E <i>SIDEROXYLON OBTUSIFOLIUM</i> EM RATAS WISTAR.....	57
5	DISCUSSÃO.....	65
6	CONCLUSÃO.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70
	APÊNDICE A – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NO DECOCTO DAS FOLHAS DE <i>MYRACRODRUON</i> <i>URUNDEUVA</i>	84
	APÊNDICE B – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NO DECOCTO DAS FOLHAS DE <i>SIDEROXYLON</i> <i>OBTUSIFOLIUM</i>	93
	ANEXO A – OFÍCIO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL.....	100
	ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO: GENOTOXICASSESSMENT OF THE DRY DECOCTION OF <i>MYRACRODRUON URUNDEUVA</i> ALLEMÃO (ANACARDIACEAE) LEAVES IN SOMATIC CELLS OF <i>DROSOPHILA</i> <i>MELANOGASTER</i> BY THE COMET AND SMART ASSAYS.....	101

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais e a ingestão de ervas e folhas para alívio e cura de doenças talvez tenha sido uma de suas primeiras formas de utilização (VIEGAS-JÚNIOR; BOLZANI, 2006). A cultura do uso de plantas medicinais na forma de chás, infusões, lambedores, dentre outros, tem sido difundida de geração em geração através de raizeiros, curandeiros e benzedeiras (DANTAS; GUIMARÃES, 2007). No entanto, quando a população faz uso indiscriminado destes produtos, sem o devido conhecimento científico, podem surgir problemas de saúde devido a efeitos tóxicos e/ou genotóxicos associados às concentrações e às quantidades elevadas utilizadas (OUEDRAOGO et al., 2012).

No cenário brasileiro do uso de plantas medicinais, destaca-se a espécie vegetal *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae), conhecida popularmente como aroeira-do-sertão e amplamente distribuída no Brasil. Ela é indicada no tratamento de ferimentos na pele e mucosas; sendo também, utilizada em gastrites, úlceras do estômago e do duodeno, bem como no tratamento do aparelho genital feminino, em cervicite e hemorroidas (MATOS, 2002; SOUSA et al., 2004). Além da aroeira-do-sertão, também se pode destacar *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T. D. Penn. (Sapotaceae), conhecida como quixabeira e indicada em casos de sangramentos, úlcera duodenal, gastrite, inflamações crônicas, injúrias genitais, inflamação ovariana, cólicas, problemas renais e cardíacos, diabetes, na cicatrização de feridas e em dores no geral (AGRA et al., 2007).

Apesar do amplo uso destas duas espécies como produto fitoterápico, poucos trabalhos trazem dados sólidos a respeito dos seus mecanismos de ação, principalmente decorrentes de seu uso crônico, deixando uma grande lacuna no conhecimento sobre seus possíveis efeitos negativos para o material genético e para a reprodução. Diante do exposto, é de grande relevância estudos que abordem os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos ocasionados pelo uso prolongado da aroeira-do-sertão e da quixabeira.

A mutação se caracteriza como qualquer alteração no DNA transmissível às células. Por ser fonte primária de variabilidade genética, pode ocasionar diversos processos patológicos por meio de modificações nas cadeias polipeptídicas, que resultam em alterações e/ou bloqueios das vias metabólicas, com consequências que podem até mesmo ser letais (SNUSTAD; SIMMONS, 2001). Soma-se a isto a possibilidade de ocorrência de toxicidade reprodutiva, representada pela capacidade de substâncias ativas de origem natural ou sintética causarem efeitos adversos durante o período gestacional em mamíferos ou até mesmo malformação na prole (ANVISA, 2013).

Devido ao fato de os organismos estarem constantemente expostos a agentes mutagênicos e teratogênicos, diversos métodos podem ser aplicados para avaliar o efeito tóxico-genético, como os

provocados por plantas de uso popular e por seus respectivos compostos isolados. Para estes estudos, destacam-se o ensaio cometa (ou eletroforese de célula única) e o Teste de Mutação e Recombinação Somática – SMART (do inglês, *Somatic Mutation and Recombination Test*), que estudam os efeitos em células somáticas do organismo modelo *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae). Esta espécie é um organismo modelo bem aceito na genética toxicológica, devido ao fato de possuir um genoma pequeno e totalmente sequenciado (ADAMS et al., 2000), e apresentar mais de 60% de similaridade com genes relacionados a doenças genéticas humanas (PANDEY; NICHOLS, 2011; GLADSTONE; SU, 2011; MARCOS; CARMONA, 2019). Por outro lado, nos estudos de teratogênese, em que se avaliam os efeitos colaterais de produtos, sejam eles químicos ou naturais sobre a prole, o organismo modelo mais indicado são os ratos devido a sua similaridade metabólica e gestacionais com os humanos (DAMASCENO et al., 2008).

Mesmo diante da ampla utilização popular de *M. urundeuva* e *S. obtusifolium* e das inúmeras atividades farmacológicas já comprovadas destas espécies, são poucos os estudos referentes aos efeitos de genotoxicidade e de toxicidade reprodutiva. Neste sentido, o presente trabalho avaliou os efeitos genotóxicos do decocto de *M. urundeuva* e *S. obtusifolium* em *D. melanogaster* e o efeito sobre a reprodução em ratas Wistar submetidas aos compostos de modo a ampliar o conhecimento sobre os efeitos do uso crônico destas espécies, a fim de garantir a segurança de seu uso na saúde humana.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o possível efeito genotóxico e mutagênico *in vivo* das plantas medicinais *Myracrodruon urundeuva* e *Sideroxylon obtusifolium*, no organismo modelo *Drosophila melanogaster* e investigar o potencial teratogênico em ratas Wistar.

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente os decoctos das folhas de *Myracrodruon urundeuva* e *Sideroxylon obtusifolium*;
- Investigar, qualitativa e quantitativamente, o potencial mutagênico e/ou recombinogênico dos decoctos de *M. urundeuva* e *S. obtusifolium* em células de descendentes adultos de cruzamentos específicos de *Drosophila melanogaster*;
- Avaliar o potencial genotóxico dos decoctos de *M. urundeuva* e *S. obtusifolium* em células da hemolinfa de larvas de *Drosophila melanogaster*;
- Caracterizar o potencial efeito teratogênico dos decoctos de *M. urundeuva* e *S. obtusifolium* em ratas Wistar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O USO DE PLANTAS MEDICINAIS

O uso de produtos naturais para fins terapêuticos compreende umas das práticas mais antigas de tratamento de saúde (VEIGA-JÚNIOR; MELLO, 2008). Este costume é passado de geração em geração, por meio de familiares, curandeiros, raizeiros e benzedeiros. Geralmente, as pessoas utilizam os produtos na forma de infusões, chás, lambedores, dentre outros (DANTAS; GUIMARÃES, 2007). Atualmente, uma planta é considerada medicinal pela Organização Mundial de Saúde quando possui, em um ou em vários de seus órgãos, substâncias usadas para fins terapêuticos, ou que possam ser pressupostos para síntese de medicamentos (BIESKI, 2005).

Ao longo do século XX, a descoberta de métodos analíticos e ensaios farmacológicos permitiram estudar melhor as plantas medicinais usadas na cura de enfermidades por meio do consumo de chás. Na literatura é possível encontrar vários estudos que se empenham na descoberta de novos agentes bioativos derivados de produtos vegetais e outros produtos naturais que tenham demonstrado eficácia no tratamento de enfermidades (GEHRKE et al., 2013; EREN; ÖZATA, 2014), juntamente com a caracterização de substâncias ativas no organismo humano (LEITE, 2009; SELLAMI, 2018).

A fitoterapia é o ramo do conhecimento que faz uso de plantas medicinais para tratar doenças, porém apenas nos casos em que há evidências documentadas. Assim, todo produto natural, tal como um extrato, tintura, pomada, ou cápsula, que utiliza como matéria-prima qualquer parte de uma planta com conhecido efeito farmacológico, pode ser considerado um medicamento fitoterápico. Desta forma, um fitoterápico é considerado um medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, para o qual já foi testada tanto sua eficácia, quanto os riscos de seu uso, além da reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2006).

No Brasil, o uso de plantas medicinais é muito comum, o que favorece o interesse pelos estudos das propriedades fitoterápica destes compostos. E isso pode estar associado ao alto custo dos medicamentos, ou à dificuldade de acesso ao Sistema Único de Saúde (SUS) pela população que vive em zona rural. Diversos estudos feitos no Brasil apontam para uma tendência atual do uso de recursos naturais, ou remédios caseiros, como uma alternativa para substituir medicamentos sintéticos ou como auxiliares terapêuticos (VEIGA-JÚNIOR, 2008; BATTISTI et al., 2013; GADELHA et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2014; ZENI et al., 2017). Nesse sentido, o governo federal do Brasil instituiu o Grupo de Trabalho Interministerial para elaboração do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), que estabelece ações que objetivam a garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no país (BRASIL,

2009). O maior acesso pode se constituir em um recurso terapêutico muito útil à população, por ser eficiente e de baixo custo, além de disponível, visto que o Brasil detém uma elevada diversidade de espécies vegetais.

Em sua maioria, os usuários de plantas medicinais e fitoterápicos para a cura de doenças são pessoas adultas e idosas, que utilizam esse meio de tratamento pela crença, passada de geração em geração, e acreditam que não há efeitos adversos (ALEXANDRE, 2008). No entanto, grande parte das plantas utilizadas para fins medicinais não têm comprovação científica do seu uso, muito menos sobre seus possíveis efeitos tóxicos, sendo, por isso, necessário submetê-las a testes toxicológicos que comprovem sua segurança (ALMEIDA et al., 2010).

O uso plantas medicinais pode, portanto, ser inadequado e causar efeitos tóxicos, reações alérgicas ou mesmo o aparecimento de algumas doenças. Assim, o estudo da toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de plantas popularmente usadas como remédios são importantes para evitar reações adversas e para garantir uma maior segurança e eficácia dos fins medicamentosos (SILVEIRA et al., 2008).

No Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos anos e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem elaborando normas para a regulamentação destes produtos. Isso vem sendo feito desde a Portaria n. 6 de 1995, que estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos, passando pela Resolução RDC n° 17, de 16 de abril de 2010, até a RDC n° 26, de 13 de maio de 2014. Os estudos não clínicos de segurança propostos pela ANVISA (2013) no *Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos*, 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 (Administração, Distribuição, Metabolismo e Excreção – ADME).

2.2 MYRACRODRUON URUNDEUVA ALLEMÃO

Dentre as plantas nativas do Brasil com uso terapêutico popular destaca-se *Myracrodruon urundeuva* Allemão, pertencente à família Anacardiaceae, e conhecida popularmente como aroeira-preta, aroeira-do-sertão, aroeira-do-cerrado. Esta espécie arbórea se distribui amplamente no Brasil, nas fitofisionomias da Caatinga, Cerrado e Floresta Atlântica. No Nordeste do país, *M. urundeuva* é frequente nos estados do Ceará e Bahia, mas também ocorre no Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, São Paulo e Paraná (LORENZI; MATOS, 2002). Apesar de sua ampla distribuição no Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste brasileiro, ela é considerada uma espécie vulnerável à extinção

(BRASIL, 2009), reflexo das diferentes formas de utilização de fonte madeireira e de combustível. Seu porte varia conforme a região de sua ocorrência, podendo atingir entre 5 e 15 m de altura na Caatinga e no Cerrado (com 15 a 60 cm de diâmetro), até 30 m de altura (e 100 cm de diâmetro) em regiões de florestas tropicais (ANDRADE et al., 2000) (**Figura 1**).

Essa espécie vem sendo muito explorada em função das propriedades químicas, biológicas e medicinais. De acordo com Macedo et al. (2018) moradores de Quincuncá, Ceará, relatam seu uso terapêutico para o tratamento de inflamação, cicatrização, gastrite, ferida, tosse, inflamação dos ovários, dor de garganta, rins, problemas ginecológicos, câncer, bronquite, dor generalizada, úlcera, entre outros. Estudo feitos com esta espécie demonstraram seus diversos efeitos, tais como anti-ulcerogênico e protetor da mucosa gástrica (SOUZA et al., 2007; CARLINI et al., 2010), anti-inflamatório (SOUZA et al., 2007), antibacteriano e antifúngico (SÁ et al., 2009).



Figura 1 – Exemplar de *Myracrodruon urundeuva*. Fonte: Fernando Tagiba (<http://www.biologo.com.br/plantas/fichas/arozeira.html>).

Na medicina popular nordestina *M. urundeuva* é também bastante utilizada sob a forma de banho-de-assento (semicúpio) feito com o extrato aquoso da entrecasca (**Figura 2**). O banho é usado para o tratamento de doenças dermatológicas, ginecológicas, tratamento caseiro de afecções cutâneas e problemas urinários (MATOS, 2000).



Figura 2 – Foto da casca de *Myracrodruon urundeuva*. Fonte: Fernando Tagiba (<http://www.biologo.com.br/plantas/fichas/aroeira.html>).

O chá da sua casca é utilizado no combate de gripe e bronquite, pois tem efeito balsâmicos e tranquilizante. Em virtude da presença, de grandes quantidades de taninos na casca, tem sido muito utilizada na indústria de curtimento de couros e como cicatrizante natural (SOUZA et al., 2007). *M. urundeuva* apresenta substâncias fenólicas, flavonoides e chalconas dimétricas (MATOS, 2000). Segundo Nobre-Júnior et al. (2009), chalconas são capazes de reduzir o estresse oxidativo, tendo efeito neuroprotetor.

As folhas de *M. urundeuva* (**Figura3**) são também utilizadas para diversos tratamentos, especialmente para úlcera (ALMEIDA et al., 2010). Figueredo, et al (2019) realizaram um estudo de caracterização química do extrato etanólico das folhas de *M. urundeuva*, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), e encontraram flavonoídes e compostos fenólicos. Segundo os autores os componentes majotitários foram a luteolina, o ácido gálico, a catequina, o ácido clorogénico, ácido caféico, a rutina, a quercitrina, isoquercitrina, quercetina e a apigenina.

Carvalho e Oliveira (2012) avaliaram o efeito tóxico da aroeira-do-sertão por meio do ensaio de toxicidade *in vitro* em sangue humano do extrato metanólico seco de suas folhas. Os autores não encontrando presença de atividade hemolítica, na concentração de 100 mg/mL, apesar de serem encontrados saponinas no extrato. Segundo Francis, (2002) saponinas fazem parte do sistema de defesa desta planta, e são substâncias naturalmente tóxicas (DEWICK, 2002), assim como os alcalóides, podendo interagir com a membrana dos eritrócitos e causar ação hemolítica. Já para

Monteiro et al. (2005), os taninos seriam os principais constituintes de *M. urundeuva* e teriam a capacidade de interagir com proteínas e outras macromoléculas, causando atividades tóxicas, e até mesmo, resistência as plantas (VIANA, 2003).

Segundo Figueredo et al. (2019), não há atividade antifúngica relevante de extratos etanólicos de *M. urundeuva*, frente as cepas de *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, na concentração inibitória mínima de $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. No entanto, o extrato apresentou atividade antioxidante relevante, demonstrado pelo resultado de 5,00361 mg equivalentes de FeSO_4 por grama de extrato, destacando-se na capacidade de reduzir Fe^{+3} a Fe^{+2} . Essa atividade antioxidante é atribuída aos elevados níveis de compostos fenólicos e de flavonoides (MORAES-BRAGA, 2012).



Figura 3 – Foto das folhas de *Myracrodruon urundeuva*. Fonte: Embrapa Pantanal ([https://www.cpap.embrapa.br/plantas/ficha.php?especie=Myracrodruon%20urundeuva%20\(Engl.\)%20Fr.](https://www.cpap.embrapa.br/plantas/ficha.php?especie=Myracrodruon%20urundeuva%20(Engl.)%20Fr.))

Estudos realizados por Souza et al. (2011) demonstraram regeneração completa do tecido epitelial em ratos tratados com o extrato etanólico da casca de aroeira, em comparação com os grupos controles, enquanto o processo inflamatório persistiu e a regeneração do tecido ocorreu através da fibrose. Os extratos da casca da aroeira têm ação anti-inflamatória, cicatrizante, anti-úlceras, anti-histamínico e analgésicos comprovada cientificamente (SOUZA et al., 2011).

Por outro lado, Oliveira (2013) demonstrou que o extrato etanólico das folhas de *M. urundeuva* apresenta toxicidade *in vitro* e ações estrogênica na dose de 125 mg/kg e antiestrogênica

na dose de 1000 mg/kg em ratas Wistar. E em estudos realizados por Carlini et al. (2010, 2013) houve comprovação de efeito tóxico da decocção da casca do caule de *M. urundeuva* administrado cronicamente por 61 dias nas doses 13,8 e 138 mg/kg. Os resultados indicaram que houve malformações esqueléticas nos filhotes das ratas tratadas durante a prenhez (13,8 e 138,0 mg/kg, por 18 dias).

Resende et al. (2015) avaliaram, por meio do teste de Ames (um ensaio bacteriano), a mutagenicidade e a antimutagenicidade dos extratos hidroalcoólicos de *M. urundeuva*, concluindo que nenhum dos extratos apresentou efeito mutagênico e que ambos apresentaram efeito protetor contra diferentes mutágenos. Montanari et al. (2012) verificaram atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas *M. urundeuva* contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

Apesar de *M. urundeuva* ser bastante utilizada pela comunidade como uma alternativa eficaz e inofensiva no tratamento de doenças, fundamentado em conhecimentos populares que são disseminados de geração a geração, sua real potencialidade farmacológica e a possível toxidez precisam ser melhor analisadas, para garantir formas mais seguras para seu uso pela população (FANK-DE-CARVALHO; GRACIANO-RIBEIRO, 2005).

2.3 *SIDEROXYLON OBTUSIFOLIUM* (ROEM. & SCHULT.) T. D. PENN.

Sideroxylon obtusifolium pertence à família Sapotaceae. É conhecida popularmente por quixabeira, uma árvore nativa da flora brasileira e encontrada no bioma de Caatinga, desde o Nordeste semiárido até a região Sudeste (BELTRÃO et al., 2008; ALBUQUERQUE et al., 2010).

É uma planta arbórea (**Figura 4**), com uma copa ampla é perenifólia, de tronco grosso e áspero, com ramos espinhosos rígidos e longos, de 1,5 a 4 cm de comprimento (LIMA et al., 2006). As folhas são alternas, simples, inteiras e coriáceas. Suas flores são pequenas e perfumadas, formando inflorescência do tipo fascículo axilares (LORENZI; MATOS, 2008; GOMES et al., 2008). Seus frutos são comestíveis e possuem um grande valor nutricional (NASCIMENTO et al., 2011) (**Figura 5**).

A quixabeira é uma planta bastante utilizada na medicina popular para o tratamento de inflamações, cicatrização, dores no corpo e ainda para inchaço nas pernas (RANGEL et al., 2010). Devido à utilização pelas comunidades locais da região e pelos fins terapêuticos, é possível encontrar o caule, as folhas e a casca da *S. obtusifolium* sendo comercializados em mercados públicos, a exemplo do Mercado Público de Recife (Pernambuco, Brasil) (ALBUQUERQUE et al., 2007). Além dessas atividades existem relatos de fortes valores nutricionais como a presença de vitamina A devido o betacaroteno, carboidratos, lipídios e proteínas importantes para a saúde humana (NASCIMENTO, 2011).



Figura 4 – Exemplar da espécie *Sideroxylon obtusifolium*. Fonte: <http://www.kew.org/science/tropamerica/imagetatabase/index.html>.



Figura 5 – Folhas e frutos da espécie *Sideroxylon obtusifolium*. Fonte: <http://www.kew.org/science/tropamerica/imagetatabase/index.html>.

Os estudos de caracterização fitoquímica demonstram que o extrato etanólico da casca interna de *S. obtusifolium* contém flavonóis, flavanonas, flavononols, fenóis, saponinas, taninos, esteróides, triterpenos e xantonas (ARAÚJO- NETO et al., 2010). Oliveira et al. (2012) encontraram no extrato etanólico das folhas de *S. obtusifolium*, analisados por HPLC-DAD/MS, além de saponinas, também catequina, quercetina-3-O-(O- α -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[α -ramnopiranosil

(1 → 6)]-β-D-galactopiranosídeo), quercetina-3-O-(O-α-L-ramnopiranosil-(1 → 2)-O-[β-D-glicopiranosil (1 → 3)]-β-D-galactopiranosídeo), quercetina-3-O-(O-α-L-ramnopiranosil-(1 → 2)-O-[β-D-glicopiranosil-(1 → 3)]-β-D-galactopiranosídeo), kaempferol-3-O-(O-α-ramnopiranosil-(1 → 2)-O-[β-glicopiranosil (1 → 3)]-β-glicopiranosídeo).

Na literatura, diversos estudos científicos comprovam as atividades terapêuticas da quixaba. Araújo-Neto et al. (2010) demonstraram que o extrato etanólico da casca de *S. obtusifolium* reduziu significativamente a resposta edematogênica evocada pela carragenina e apresentou atividade antinociceptiva induzida por ácido acético e formalina em ratos, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg. Aquino et al. (2017) relataram que N-metil-(2S,4R)-*trans*-4-hidroxi-L-prolina (NMP) isolada do extrato metanólico da folha de *S. obtusifolium* reduziu a atividade inflamatória induzida em camundongos.

O estudo realizado por Neto et al. (2017) indicaram que o extrato etanólico da quixaba e suas diferentes frações (obtidas pelo método de difusão em disco) têm atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Pereira et al. (2013) utilizaram o extrato etanólico da casca de *S. obtusifolium* - nas doses de 200 e 400 mg/kg - para tratar cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida, em ratas. De acordo com os dados destes autores, o extrato diminui a atividade da mieloperoxidase induzida pela ciclofosfamida no tecido da bexiga, mas causou lipoperoxidação neste tecido, bem como no baço, indicando que este não é indicado para tratar cistite.

2.4 O FENÔMENO DA MUTAÇÃO E O GÊNERO *DROSOPHILA*

Mutação refere-se a qualquer alteração na sequência do DNA, sendo considerada fonte primária de variabilidade nos processos evolutivos, que proporciona novas combinações genéticas e assim, permite uma adaptação dos organismos às mudanças do meio ambiente. A transmissão desse evento genético para os descendentes poderá ocorrer apenas se a linhagem celular envolvida for uma célula germinativa (SNUSTAD; SIMONS, 2001).

A ocorrência de eventos mutacionais pode ser aumentada pela exposição do organismo a agentes mutagênicos, a chamada mutação induzida. O potencial ou eficiência desses agentes é avaliado pelo incremento da frequência de mutações em relação ao nível basal, quando se analisa um organismo a ele exposto (SIVIERO; MACHADO-SANTELLI, 2008). Na maioria das vezes, as mutações exercem um efeito negativo no fenótipo, podendo determinar a perda do controle do ciclo celular e o aparecimento de tumores e aberrações (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

Dentre os organismos utilizados para monitoramento dos efeitos genotóxicos e mutagênicos, destaca-se *Drosophila melanogaster* (**Figura 6**), popularmente conhecida como mosca-da-fruta. Este organismo é utilizado há mais de 100 anos em pesquisas genéticas e, mais recentemente, em diversos testes para o monitoramento de agentes genotóxicos (VOGEL et al., 1999). Thomas Hunt Morgan no ano de 1910 realizou os primeiros estudos da teoria cromossômica e da hereditariedade, usando este organismo como modelo. Já no Brasil as primeiras publicações com *Drosophila* em estudos genéticos datam por volta de 1943 (ROCHA et al., 2013). Desde esta data, *D. melanogaster* se tornou indispensável em estudos genéticos, sendo utilizada em diversos ensaios, como por exemplo, em estudo de patologias humanas, passando a ser exemplo de organismo-alternativo ao uso de mamíferos em experimentação científica (DOKE; DHAWALE, 2015).

Isto decorre da semelhança genética entre o genoma humano e o da *Drosophila*, mostrando alta conservação evolutiva, tanto no nível da sequência do DNA, quanto em relação às funções dos genes, que são conservados entre os dois organismos (LENZ et al., 2013). Dados obtidos de análises proteômicas indicam que 60% dos 289 genes relacionados a patologias humanas apresentam homólogos em *Drosophila*, e destes, 75% demonstram sequências proteicas similares nestes dois organismos (TICKOO; RUSSEL, 2002).



Figura 6 – *Drosophila melanogaster* (mosca de fruta). Fonte: <https://br.depositphotos.com/stock-photos/drosophila.html?view=33084311>.

Mesmo que camundongos apresentem diversas vantagens em pesquisas científicas, eles também apresentam limitações, como o custo elevado para a manutenção dos indivíduos, número mínimo de indivíduos utilizados nos experimentos, e tempo de reprodução longo. Essas condições experimentais podem ser facilitadas pelo uso de *D. melanogaster* como modelo experimental. Entre outras vantagens do uso desta espécie está seu pequeno genoma eucarioto, fácil cultivo e reprodução em laboratório, e rápido ciclo de vida, em cerca de 9 dias. O fato de o genoma passar por diversas

alterações, nas diferentes fases de vida (embrião, larva e adulto) faz deste organismo um modelo experimental útil para realizar triagens em grande escala e em todo o genoma (LENZ et al, 2013).

A avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos é feita mediante testes *in vivo* e *in vitro* bem padronizados, que utilizam diferentes sistemas biológicos. O principal objetivo dessa avaliação consiste em quantificar o perigo de mutação do material genético e, conseqüentemente, a transmissão hereditária destas mutações. Esses testes são, na maioria das vezes, empregados para prever o desenvolvimento de câncer (SIVIERO; MACHADO-SANTELLI, 2008). E dentre os testes utilizados para o estudo do potencial mutagênico e recombinogênico de produtos químicos ou naturais estão o Teste de Mutação e Recombina o Somática – SMART, descrito por Graf et al. (1984), e o Ensaio cometa, também conhecido como eletroforese de célula única, descrito por Ostling e Johanson (1984) e modificado por Singh et al. (1988).

O teste SMART detecta simultaneamente recombina o mitótica e mutações g nicas e cromoss micas por meio da análise dos genótipos trans-heterozigotos, para os genes marcadores *mwh* e *flr³* (*mwh/flr³*), e heterozigotos para o cromossomo balanceador *TM3* (*mwh/TM3*) (RIGO, 2009). Esse teste caracteriza pelos mutantes nas asas da mosca, que por sua vez, é causado por perda de heterozigose dos genes marcadores específicos, reflexo de danos ao nível do DNA (GRAF et al, 1984; DIAS, 2008). Este bioensaio vem sendo amplamente utilizado na detecção de efeitos citotóxicos, genotóxicos e antigenot xicos de agentes químicos e misturas complexas (KAYA et al, 2002).

Diversos estudos relatam resultados com o organismo-modelo *D. melanogaster*, entre eles Aciole et al. (2014) que detectaram o efeito tóxico-genético do larvicida natural dilapiol e do espinosade (um metabólito secundário bacteriano); Cardoso et al. (2015), que avaliaram o efeito mutagênico de extratos de produtos naturais, como a própolis; Amorim (2016) que estudou a atividade mutag nica de metabólitos secundários liqu nicos, entre tantos outros estudos.

O Ensaio cometa é um método que investiga danos genéticos para aplicação ao biomonitoramento humano (URIOL et al, 2013) e do ambiente, em resposta a uma série de agentes genotóxicos. Este método é sensível e permite a detecção de quebras simples ou duplas na molécula do DNA da célula, em um meio alcalino (AZQUETA; COLLINS, 2013). Para monitorar efeitos genotóxicos, os pesquisadores utilizaram células nucleadas de mamíferos, (GODSCHALK et al., 2013; COLLINS et al., 2014). Mais recentemente, este teste tem sido aplicado em *D. melanogaster* (GAIVÃO; SIERRA, 2014) e muitos estudos têm surgido para testar efeitos genotóxicos, como de compostos do chumbo (CARMONA et al., 2011), indutores do estresse oxidativo (SHARMA et al., 2011), nanop rticulas (CARMONA et al., 2015), genotoxicidade ambiental associada   radiação natural (VERÇOSA et al., 2017), efeitos da poluição urbana (SANTANA et al., 2018), entre outros.

2.5 TOXICIDADE REPRODUTIVA

A toxicidade reprodutiva é caracterizada pela capacidade de substâncias ativas causarem efeitos adversos durante o período gestacional em mamíferos ou até mesmo malformação na prole (ANVISA, 2013). Segundo Woldemeskel (2017) a toxicidade de produtos químicos tem afetado principalmente a reprodução, aumentando desta forma os casos de toxicidade reprodutiva no mundo. Daí vem a necessidade da realização de estudos a fim de minimizar esses efeitos na população.

Dentre os organismos indicados para avaliação da toxicidade reprodutiva estão os ratos, uma vez que compartilham com seres humanos algumas características gestacionais típicas dos mamíferos (DAMASCENO et al., 2008). Uma das principais é o intervalo entre o coito e a implantação do blastocisto no útero, embora o período gestacional das ratas seja de 22 dias, aproximadamente, e em humanos seja de 270 dias, aproximadamente (ALMEIDA, 2009). Esses dados seguem a norma da OECD que recomenda que os testes de toxicidade no desenvolvimento sejam realizados nas espécies mais relevantes como um roedor ou rato, além de uma espécie não-roedora, preferencialmente o coelho. Sendo requerida justificativa se outra espécie for usada (OECD, 2015).

A gestação dos mamíferos é compreendida por três períodos: a pré-implantação, a organogênese e a fetal. Nas ratas o período de pré-implantação vai do dia 0 ao 5º dia de prenhez, caracterizado pela implantação do conceito no útero e divisão celular. É seguido pelo período de organogênese que vai do 6º ao 15º dia de gestação, que é constituído pela formação e diferenciação dos órgãos. No período fetal, que vai do 15º ao 21º dia de gestação, o feto está completamente formado, acontecendo apenas o crescimento e especialização de algumas células (DAMASCENO et al., 2008).

Segundo Sanseverino et al. (2005), o desenvolvimento de malformações e suas manifestações no desenvolvimento anormal do feto aumentam à medida que se incrementa a dose do agente tóxico, variando desde nenhum efeito, passando pelos danos funcionais e malformações, até a morte do embrião. A interferência no desenvolvimento embrionário pela ação de um agente teratogênico depende de diversos fatores, dentre eles destacam-se a concentração e o mecanismo específico do teratogênico, e o período de exposição do embrião (SANSEVERINO et al., 2005).

Na prenhez, o metabolismo de alguns órgãos torna-se mais susceptível a danos, e é indispensável um funcionamento materno normal para o adequado desenvolvimento do feto (MELLO; LANGELOH, 2006). Durante a gestação, o metabolismo materno pode ser influenciado por compostos químicos, que podem de alguma forma afetar o sucesso da implantação, ou o desenvolvimento e crescimento do feto (DARUICH et al., 2001). Por esse motivo, gestantes preferem fazer uso das plantas medicinais indicadas por familiares, ao invés dos medicamentos, pois

acreditam que por serem de origem natural esses compostos não afetarão o desenvolvimento do feto. Essa crença leva muitas mulheres grávidas a utilizarem as plantas medicinais indiscriminadamente (ARAÚJO et al., 2016).

No entanto, é importante apresentar à população estudos de toxicidade para poder diminuir essa crença de que extratos vegetais são desprovidos de efeitos tóxicos ou adversos (LAPA et al., 2010). Costa et al. (2012) realizaram um estudo de revisão de diversas plantas medicinais com algum efeito tóxico sobre a reprodução. Dentre as plantas analisadas está a sena (*Senna alexandrina* Mill, Fabaceae), que possui antraquinonas que podem induzir contrações uterina, aumentar o fluxo sanguíneo para útero, acarretando risco de perda do feto. Os autores também apresentam resultados para arruda (*Ruta graveolens* L., Rutaceae), que possui efeito abortivo; para o boldo-do-chile (*Peumus boldus* Molina, Monimiaceae), para a malva-santa ou falso-boldo (*Plectranthus barbatus* Andr., Lamiaceae), que tem efeitos abortivo e teratogênico; da buchinha-do-norte ou cabacinha (*Luffa operculata* (L.) Cogn., Cucurbitaceae), a qual é relacionada a envenenamentos e diminuição da taxa de natalidade; e da losna ou absinto (*Artemisia absinthium* L., Asteraceae), que provoca convulsões, epilepsia e aborto.

Diante destes resultados, gestantes precisam ser orientadas sobre os riscos que as plantas medicinais oferecem quando utilizadas de forma indiscriminada. E para isso, se fazem necessários mais estudos que garantam tanto a eficácia quanto a segurança de produtos de origem natural, e em doses que sejam seguras (COSTA et al., 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

As folhas de *Myracrodruon urundeuva* foram coletadas em fevereiro de 2012 no setor de horticultura da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza, Ceará, Brasil), de espécimes com 3 anos de idade. As folhas de *Sideroxylon obtusifolium* foram coletadas na Chapada do Araripe, estado do Ceará. A exsicata de *M. urundeuva* foi identificada e depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, sob o número EAC 41.033, enquanto a exsicata de *S. obtusifolium* foi identificada e depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri (URCA), sob o número HCDAL 10.648.

As folhas frescas (600 g) de cada espécie foram fervidas com 2,5 L de água por 2 horas em um balão de fundo redondo. Os líquidos provenientes da decocção foram filtrados e depois liofilizados. No momento do uso, o decocto liofilizado foi dissolvido em água destilada para obtenção de uma solução mãe (16 mg/mL), a qual foi utilizada para obtenção das diferentes concentrações (8,0, 4,0, 2,0, 1,0 e 0,5 mg / mL) testadas nos ensaios com *Drosophila melanogaster*. Os dois decoctos foram preparados e cedidos pelo Prof. Dr. Edilberto R. Silveira, da Universidade Federal do Ceará.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS POR UPLC-ESI-QTOF-MS/MS

Os decoctos foram analisados por um sistema Acquity UPLC (Waters®), acoplado a um sistema de detecção de massas quadrupolo/tempo de voo (qTOF, Waters®) pertencente a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Agroindústria Tropical, em Fortaleza, sob supervisão do Dr. Kirley Marques Canuto. As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters® Acquity UPLC BEH (150 x 2,1 mm, 1,7 µm), temperatura fixa em 40 °C, fases móveis solução de ácido fórmico a 0,1% em água, gradiente variando de 2% a 95% B (15 min), fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de 5 µL. Os espectros de massas de alta resolução (XEVO-QToF) no modo ESI negativo foram adquiridos na faixa de 110-1190 Da, temperatura da fonte fixa em 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. Leucina encefalina foi utilizada para calibração (*lock mass*) e o instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters®). A análise dos cromatogramas e espectros de massas foi realizada com o software MestReNova 12.0 (Mestrelab Research, Espanha).

3.3 O ENSAIO COMETA

3.3.1 Tratamento das larvas de *Drosophila melanogaster*

Fêmeas adultas de *Drosophila melanogaster* da linhagem Oregon-R foram postas para ovopositar por 8h em meio adequado, preparado com 24 horas de antecedência, e contendo 500 g fermento fresco (Itaiquara Alimentos S.A), 2 colheres de açúcar e 20 mL de água destilada. A mistura foi aquecida em banho-maria a 37°C por aproximadamente 10 minutos. Após 72h, as larvas crescidas neste meio de ovoposição, a base de fermento, foram lavadas com água destilada (com auxílio de uma peneira e uma rede de tecido). Cerca de 80 larvas foram selecionadas e transferidas para o meio de tratamento composto por 0,9 g purê de batata desidratado, acrescido de 3 mL dos decoctos das folhas *Myracrodruon urundeuva* e *Sideroxylon obtusifolium* na diluição desejada (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 e 16.0 mg/mL). Também foi estabelecido um grupo controle negativo (transferido para um meio hidratado com 3 mL água destilada) e um grupo controle positivo (tratado com 3 mL do composto genotóxico Ciclofosfamida monohidratada, diluída em água destilada a 1 mg/mL (Genuxal-Baxter Hospitalar Ltda., São Paulo/SP, Brasil, lote nº 4K963J) seguindo as recomendações estabelecidas por (SHARMA et al, 2011). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

3.3.2 Extração da hemolinfa

Após 24 horas de contato das larvas com os decoctos, nas suas respectivas doses, iniciou-se a extração dos hemócitos presentes na hemolinfa das larvas de *D. melanogaster*. Das 80 larvas colocadas nos meios de tratamentos foram selecionadas 60, para constituir uma réplica de cada grupo tratado. No total, foram estabelecidas três réplicas para cada tratamento, ou seja, foram avaliados hemócitos obtidos de 180 larvas em cada dose. As larvas de cada réplica (60 delas) foram mantidas em uma placa de Petri e lavadas duas vezes com água destilada para a retirada de resíduos de meio de cultivo.

Logo após a lavagem, as larvas foram resfriadas a 4° C por 1 min para a diminuição da taxa metabólica, facilitando a sua manipulação. Seguido do resfriamento, as larvas foram postas em uma placa escavada tipo Kline com 12 poços, contendo solução de EDTA, para evitar a coagulação da hemolinfa. Em microscópio estereoscópico (lupa) e com a ajuda de um bisturi (lâmina de aço de 11 mm para procedimentos cirúrgicos) e uma pinça de relojoeiro nº 5 foi realizado um corte lateral na cutícula de cada indivíduo.

A hemolinfa saída das larvas foi depositada no fundo da placa escavada e transferida para um tubo de microcentrífuga (1,5 mL), com a ajuda de uma micropipeta. A mistura do material biológico com EDTA foi centrifugado duas vezes a 3.000 rpm por 3 minutos, e descartado 100 µL

do sobrenadante. Para completar o volume do tubo foi acrescentado mais 100 μL de EDTA, e submetida a mais uma centrifugação, nas mesmas condições.

3.3.3 Montagem das lâminas, tratamento e eletroforese

As lâminas de vidro a serem utilizadas para o Ensaio Cometa foram previamente lixadas, lavadas em água destilada e esterilizadas com álcool. Em seguida, foram banhadas em uma solução 1,5 % de agarose padrão. Após o preparo das lâminas, estas foram montadas com uma camada de 60 μL de suspensão celular (hemócitos de larvas e EDTA) e homogeneizado em 100 μL de solução de 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão (agarose LM) a 37°C. Esta etapa foi realizada na ausência da luz, por se tratar de uma fase fotossensível. O homogeneizado foi aplicado na lâmina e sobre o material foi colocada uma lamínula (24 mm por 60 mm).

As lâminas foram submetidas a 4°C por 10 min com o objetivo de solidificar o material. Após esse tempo as lamínulas foram retiradas e as lâminas com o material biológico foram submersas em solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 1 M NaOH; 10 mM Tris; 1% Triton X-100 e 10% DMSO) ajustada para pH 10, e mantidas a 4°C por 72 h. Ao término do período de lise celular, as lâminas foram submetidas a uma solução tampão a 4°C (1M NaOH; 200 mM EDTA, pH > 13) por um período de 20 min. Logo após, foi realizada a corrida eletroforética por 20 min a 40 V/cm e 300 mA, em uma cuba de 40 cm. Após a corrida, as lâminas foram cuidadosamente recolhidas e imersas na solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 min. Após a neutralização, as lâminas foram submetidas à fixação, sendo imersas em etanol absoluto por 5 min, e armazenadas a 4°C até o momento da análise microscópica.

3.3.4 Análises microscópicas e Testes estatísticos

Para a análise microscópica, as lâminas foram coradas com 50 μL de solução de GelRed (Biotium), diluído em água deionizada na proporção de 1:500, e preparada imediatamente antes da análise em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2), com objetiva de 40X e filtro Alexa Fluor 546. O programa de captura de imagens foi o Axiovision versão 4.8.2.0. Para cada tratamento foram preparadas cinco lâminas com o material celular. A análise consistiu-se na observação de 100 nucleóides, sendo 50 em cada uma das duas lâminas, de cada uma das três réplicas de cada tratamento (total de 300 nucleóides analisados em cada tratamento). Após a corrida eletroforética, os nucleóides (visualizados na forma de cometas) foram classificados visualmente nas categorias de zero a quatro (0 a 4), dependendo das suas características, seguindo os parâmetros visuais definidos neste trabalho (**Figura 7**), com base em Verçosa et al. (2017). A **classe 0** compreende os nucleóides considerados intactos, ou seja, sem danos causados pela exposição aos tratamentos; a **classe 1**

corresponde os cometas com danos mínimos; **classe 2**, aos cometas com danos médios; a **classe 3**, aos cometas com danos intensos; e a **classe 4** correspondeu os cometas com danos máximos. O tamanho da cauda e da cabeça do cometa foram os parâmetros utilizados para a classificação (Figura 7).

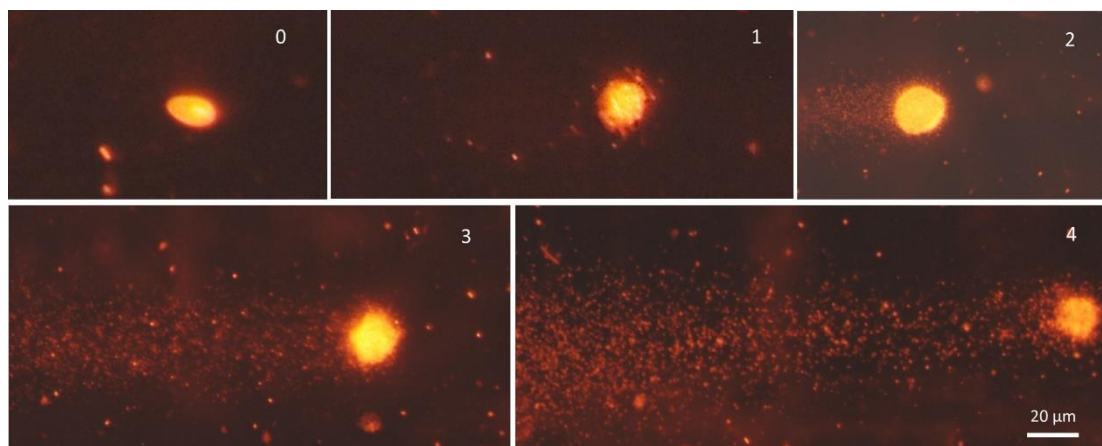


Figura 7 – Classificação visual dos danos genéticos, baseada no comprimento da cauda e na quantidade de DNA da cabeça dos cometas. As imagens foram obtidas de hemócitos de *Drosophila melanogaster* Oregon R, tratados com os compostos do presente estudo.

Em cada réplica de todos os tratamentos foi observado um total de 100 nucleóides, totalizando 300 nucleóides por concentração. Para avaliar os cometas contabilizados foram calculados dois parâmetros, o Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD%) (COLLINS et al, 2008).

O Índice de Dano pode variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x dano 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x dano 4). O ID total foi calculado usando a fórmula:

$$\text{ID} = 0 (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe 0}) + 1 (\text{n}^\circ \text{ classe 1}) + 2 (\text{n}^\circ \text{ classe 2}) + 3 (\text{n}^\circ \text{ classe 3}) + 4 (\text{n}^\circ \text{ classe 4})$$

A Frequência de Dano (FD%) representa a porcentagem de todos os cometas com danos (classe 1 até a classe 4) em relação ao total de cometas contabilizados, que corresponde desde a classe 0 até a classe 4 (nº total). Para calcular FD% foi usada a seguinte fórmula:

$$\text{FD\%} = [(\text{n}^\circ \text{ total} - \text{n}^\circ \text{ classe 0}) 100] / \text{n}^\circ \text{ total}$$

Para a análise estatística final dos resultados foram realizadas comparações entre as médias das réplicas de cada tratamento, por meio do teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA), e o pós-teste de Bonferroni no *software* STATA versão 12. O nível de significância mínimo em todos os testes foi $P \leq 0,05$.

3.4 TESTE DE MUTAÇÃO E RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA (SMART)

3.4.1 Cruzamentos específicos e diluições dos compostos

Para aplicação do teste SMART foi realizado o cruzamento padrão entre fêmeas *flr³* (*flare*) virgens e machos *mwh* (pelos múltiplos) que originou larvas descendentes com duas constituições genótípicas: (i) *mwh* *+/+ flr³* (trans-heterozigotas - TR) e (ii) *mwh* *+/TM³*, BdS (heterozigotas – TM³) (FREI et al, 1992). Os fenótipos do pelo das asas denominado *mwh* e *flr³* podem visualizados nas imagens da **Figuras 8** (ANDRADE et al., 2003).

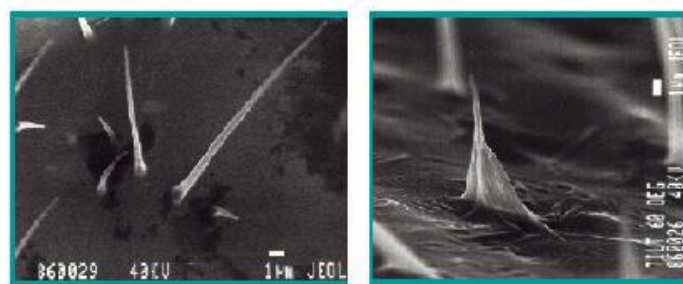


Figura 8 – Pelo da asa *mwh* (à esquerda) e pelo da asa *flr³* (à direita).

O cruzamento *flr³* x *mwh* foi realizado em cinco potes de vidro, cada um com 80 fêmeas *flr³* virgens e 40 machos *mwh*, que permaneceram juntos, por três dias, acasalando. Após este tempo de cruzamento as fêmeas foram colocadas para ovopositar durante 8 horas em meio de ovoposição, composto por 500 g fermento fresco (Itaiquara Alimentos S.A), 2 colheres de açúcar e 20 mL de água destilada. A mistura foi aquecida em banho-maria a 37°C por aproximadamente 10 min. Esse processo foi repetido por 3 dias consecutivos, para obtenção do número desejado de larvas.

Ao atingirem o terceiro estágio larval, 72h após a ovoposição, os indivíduos foram retirados do meio de ovoposição com ajuda de água destilada, peneira e rede de tecido para a lavagem e separação de cada larva. Foram contadas 100 larvas para cada uma das concentrações a serem testadas. As larvas foram em seguida transferidas para potes de acrílico contendo 0,9 g de purê de batata desidratado (Yoki SA), denominado meio de tratamento, que representa um meio de cultivo pobre em nutrientes, a base de amido (ANDRADE et al., 2003). Este meio de purê de batata foi previamente hidratado com 3 mL da decocção das folhas de *Myracrodruon urundeuva* ou de *Sideroxylon obtusifolium* nas concentrações de 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 e 16.0 mg/mL. Um grupo controle negativo foi constituído por larvas alimentadas em purê de batata hidratado com 3 mL de água destilada. O grupo controle positivo recebeu o purê de batata hidratado com Doxorubicina (DXR) a 1,0 mg/mL (Rubidox liofilizado, Laboratório Químico Farmacêutico Bergamo Ltda., São Paulo, SP, Brasil, lote n° 1078999). Todos os testes foram realizados em duplicata (dois tubos por cada diluição, perfazendo um total de 200 larvas por dose). As larvas permaneceram no meio de

tratamento, se alimentando dos extratos vegetais e do meio de batata. Após a metamorfose e eclosão da forma adulta, estas foram contadas para estabelecimento da curva de sobrevivência, e preservados em álcool 70% para a montagem final das asas e análises dos possíveis fenótipos mutantes.

3.4.2 Montagem das lâminas

A montagem das asas em lâminas de vidro seguiu a descrição de Graf et al. (1984). As asas dos adultos fêmeas e machos eclodidos foram separadas do corpo com auxílio de duas pinças de relojoeiro n° 5 e mergulhadas em solução de Faure (preparada com 30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato cloral e 50 mL de água). Após este procedimento as asas foram retiradas da solução e distendidas sobre a superfície de lâminas de vidro, onde foram mantidas por um período de 24 h para secagem. Posteriormente, foram cobertas com lamínulas (24 mm por 32 mm), contendo uma gota da solução de Faure, permanecendo por mais 24 h pressionadas com cubos de metal - com peso total de aproximadamente 400g - visando uma perfeita aderência das asas às lâminas. Depois de secas, as lâminas foram vedadas com base incolor para evitar a possível entrada de ar. Foram montadas lâminas com os dois genótipos dos indivíduos descendentes: *mwh*^{+/+}*flr*³ (Trans-Heterozigotos-TR); e *mwh*^{+/}TM³, Bds (heterozigotas-TM³), com cinco pares de asas, de cinco fêmeas, e cinco pares de asas, de cinco machos, em cada lâmina.

3.4.3 Análises microscópicas e testes estatísticos

As lâminas com as preparações das asas foram analisadas no microscópio óptico (Nikon) com objetiva de 40x. A análise e quantificação das alterações genéticas se deu pelo registro da frequência e do tipo de mancha encontrada, que foram classificadas como manchas simples pequena, quando apresentaram de um ou dois pelos com fenótipo apenas *mwh* ou apenas *flr*³; manchas simples grandes, quando apresentaram manchas *mwh* ou *flr*³ e com mais de três pelos mutantes juntos; ou manchas gêmeas, quando ocorrem os dois tipos de pelos juntos, *mwh* e *flr*³ (Figura 9).

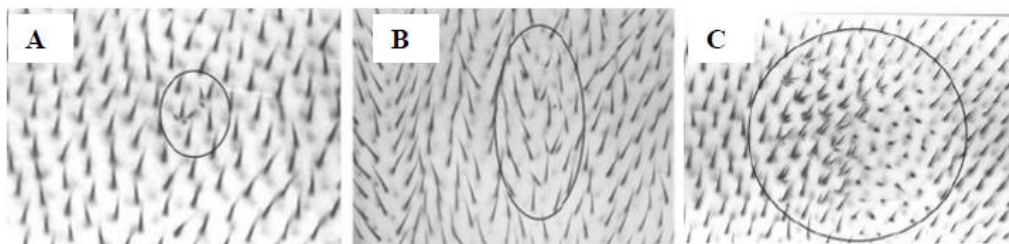


Figura 9 – Aspecto dos fenótipos das manchas de pelos das asas de *Drosophila melanogaster*, em três categorias: (A) simples pequena, (B) simples grande; (C) mancha gêmea (ANDRADE et al., 2003).

Os resultados dos tratamentos dos extratos aquosos de folhas de *M. urundeuva* e *S. obtusifolium* (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 e 16.0 mg/mL) foram comparados aos resultados do grupo controle negativo, por meio do teste condicional binomial de Kastembaum e Bowman (1970). O nível de significância dos resultados foi avaliado segundo Frei e Würigler (1988), que estabeleceram quatro diagnósticos possíveis: positivo (+), fraco positivo (f+), negativo (-) e inconclusivo (i). O potencial genotóxico foi definido pela regra de que a identificação de efeito mutagênico requer que o total de manchas mutantes seja duas vezes maior no tratamento do que no grupo controle negativo, sem que ocorra, obrigatoriamente, uma relação dose-resposta (CUNHA et al., 2001; TIBURI et al., 2002).

3.5 TOXICIDADE REPRODUTIVA

3.5.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar (machos e fêmeas), com cerca de 2 meses de idade e peso em torno de 180g a 220g provenientes do Biotério Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco. Estes passaram por um período de adaptação, mantidos sob condições controladas de iluminação, recebendo água e dieta (Presence®) *ad libitum* e foram mantidos em condições ambientais normais (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal (CEEAA) da Universidade Federal de Pernambuco, processo nº 0015/2017. O estudo seguiu as recomendações das diretrizes da *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OECD) para teste de toxicidade reprodutiva (Guideline 421) (OECD, 2015).

3.5.2 Período de acasalamento e Administração dos extratos

Após o período de adaptação, as fêmeas nulíparas foram colocadas junto com os machos adultos durante a fase escura do ciclo ambiental na proporção de 2:1. No dia seguinte, as fêmeas foram retiradas das gaiolas e foram realizados os esfregaços dos lavados vaginais, realizados com

auxílio de uma micropipeta, com 10 µL de solução de cloreto de sódio a 0,9% com avaliação, a fresco, em microscopia óptica (aumento 40x) conforme a descrição de Marcondes et al. (2002). A observação de espermatozoides no lavado, com a presença de células que caracterizam a fase estro do ciclo estral, identificou as ratas prenhes (COOPER et al., 1993). Assim, a presença do espermatozoide caracterizou a cópula, determinando o dia 0 de prenhez. Ao ser confirmada a prenhez, as ratas foram divididas aleatoriamente em 4 grupos experimentais: G1-controle negativo (água potável), G2-250 mg/kg, G3-500 mg/kg e G4-1000 mg/kg de 6 a 8 animais para cada dose do decocto de ambas as plantas. A administração das doses foi realizada durante o período de organogênese, que corresponde do 6º ao 15º dia pós-coito.

3.5.3 Avaliação da toxicidade aguda e performance reprodutiva materna

As ratas prenhas foram avaliadas quanto à sobrevivência, aparência alterada e quaisquer sinais clínicos de toxicidade aguda, tais como: diarreia, piloereção, estresse, tremores, salivação e sangramento. A massa corpórea e o consumo de água e ração foram mensurados de 3 em 3 dias (OECD, 2015). O ganho de massa corporal, foi calculado o ganho total durante o período de prenhez e também o ganho de massa corrigido, equivalente a subtração entre a massa do útero gravídico e a massa final das ratas. No 21º dia de prenhez foi realizada a eutanásia, por inalação de CO₂, e em seguida, foi realizada a histerectomia e o útero gravídico foi pesado com todo seu conteúdo. Os fetos e placentas foram removidos e os números de implantações, reabsorções (se existentes) e fetos (vivos ou mortos), calculados. Os ovários foram removidos, pesados e observados quanto ao número de corpos lúteos.

Uma necropsia foi realizada nas progenitoras para analisar as características externas macroscópicas do coração, fígado, rins, pulmões, pâncreas, baço, timo e adrenais. Esses órgãos foram removidos e pesados individualmente. As massas dos órgãos foram expressas em termos absolutos e relativos (g e g/100 de massa corporal, respectivamente) (OECD, 2008).

A taxa de embriões perdidos antes de sua implantação foi calculada segundo Almeida e Lemônica (2000):

$$(\text{N}^{\circ} \text{ de corpos lúteos} - \text{N}^{\circ} \text{ de implantes} / \text{N}^{\circ} \text{ de corpos lúteos}) \times 100$$

Cálculo da taxa de embriões perdidos após serem implantados:

$$(\text{N}^{\circ} \text{ de implantações} - \text{N}^{\circ} \text{ de fetos vivos} / \text{N}^{\circ} \text{ de implantações}) \times 100$$

As taxas de reabsorções foram calculadas por:

$$(N^{\circ} \text{ de reabsorções} / N^{\circ} \text{ de implantações}) \times 100$$

Para a avaliar a embriofetotoxicidade, os fetos foram secos e pesados e realizada a sexagem através da observação da distância anogenital (definida como a distância entre o centro do ânus e o centro da prega genital). Livre do cordão umbilical e membrana as placentas foram secas e pesadas para verificar a massa das placentas e o índice placentário.

A avaliação do comprometimento dos pesos dos fetos, foi calculado o índice placentário por:

$$\text{Peso das placentas} / \text{Peso dos fetos}$$

3.6 TERATOGENICIDADE

3.6.1 Análise das anomalias e/ou malformações externas

Após a pesagem, os fetos foram examinados externamente, quanto a presença dos olhos, boca, implantação das orelhas, conformação craniana, membros anteriores e posteriores, perfuração anal e cauda (WILSON, 1965).

3.6.2 Análise das anomalias e/ou malformações esqueléticas, contagem dos pontos de ossificação, e análise das anomalias e/ou malformações viscerais

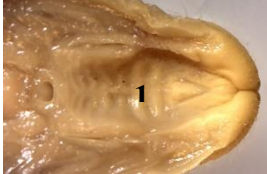
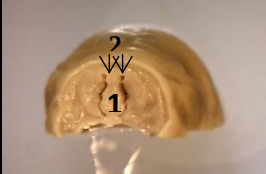
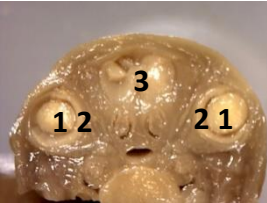
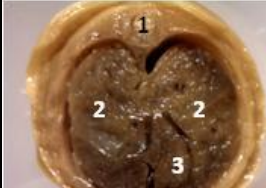
Após a análise de malformações externas dos fetos, metade de cada ninhada foi colocada em acetona PA (24 h), em seguida postos em álcool 70% (12 h), seguido de mais 12h e posteriormente eviscerados, diafanizados e corados com vermelho de alizarina por 24h (**Figura 10 A**) conforme a metodologia descrita por Staples e Schnell (1964), sendo mantidos em glicerina 100% até a análise. As análises foram realizadas com o auxílio de um estereomicroscópio Nikon, modelo SMZ 645 (C-W 10 x A/22).

As anomalias e/ou malformações e os pontos de ossificação foram observados e contados, segundo Aliverti et al. (1979). A outra metade da ninhada foi fixada em solução de Bodian (96h) (**Figura 10 B**) para subsequente exame visceral pelo método de secção seriada (WILSON, 1965). A análise visceral foi constituída de uma observação detalhada das secções da cabeça, pescoço, tórax e pelve de acordo com os modelos definidos na **Tabela 1**.



Figura 10 – (A) Fetos corados com vermelho de alizarina para a análise esquelética. (B) Fetos fixados em Bodian para análise visceral. Fonte: Arquivo pessoal da autora.

Tabela 1 – Estruturas observadas na análise visceral de acordo com as secções seriadas de Wilson (1965).

Secções	Estruturas observadas	Secções	Estruturas observadas
	Secção da cabeça. 1- Palato		Secção da cabeça 1- Septo Nasal 2- Coana
	Secção da cabeça 1- Cristalino 2- Retina 3- Bulbo Olfatório		Secção da cabeça 1- Seio venoso 2- Ventrículos laterais 3- Terceiro ventrículo
	Secção do pescoço 1- Traqueia 2- Esôfago 3- Medula espinhal		Secção do tórax 1- Medula espinhal 2- Pulmão 3- Coração
	Secção da pelve 1- Testículos 2- Bexiga		Secção da pelve 1- Ovários 2- Tubas uterinas 3- Bexiga

Fonte: (OLIVEIRA, 2015).

3.6.3 Análise estatística

As análises estatísticas médias, $\pm$ desvio padrão da média, foram realizadas no *software* GraphPadPrism 8.0. A homogeneidade das variâncias foi testada pelo método de Shapiro-Wilk. Nos casos em que a variância foi homogênea, os dados foram analisados por ANOVA, seguido, do pós-teste de Newman-Kews. Quando os dados não assumiram distribuição normal foram empregados os testes não paramétricos de Kruskall-Wallis, com pós-teste de Dunn. O nível de significância estabelecido para todos os testes foi de $P \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS DECOCTOS SECOS DAS FOLHAS DE *MYRACRODRUON URUNDEUVA* E *SIDEROXYLON OBTUSIFOLIUM*

Após liofilizados, foram obtidos 83,1 g (~ 14%) de decocto seco para *M. urundeuva* e 34,86 g para *S. obtusifolium*. A análise do decocto das folhas de *M. urundeuva* por UPLC-ESI-qTOF-MS/MS revelou a presença de alguns compostos com MS característicos de galotaninos e outros compostos fenólicos, o que está de acordo com estudos prévios com o extrato etanólico das folhas realizado por Silva (2011). A **Figura 11** mostra o cromatograma do decocto das folhas de *M. urundeuva*, com os tempos de retenção dos picos.

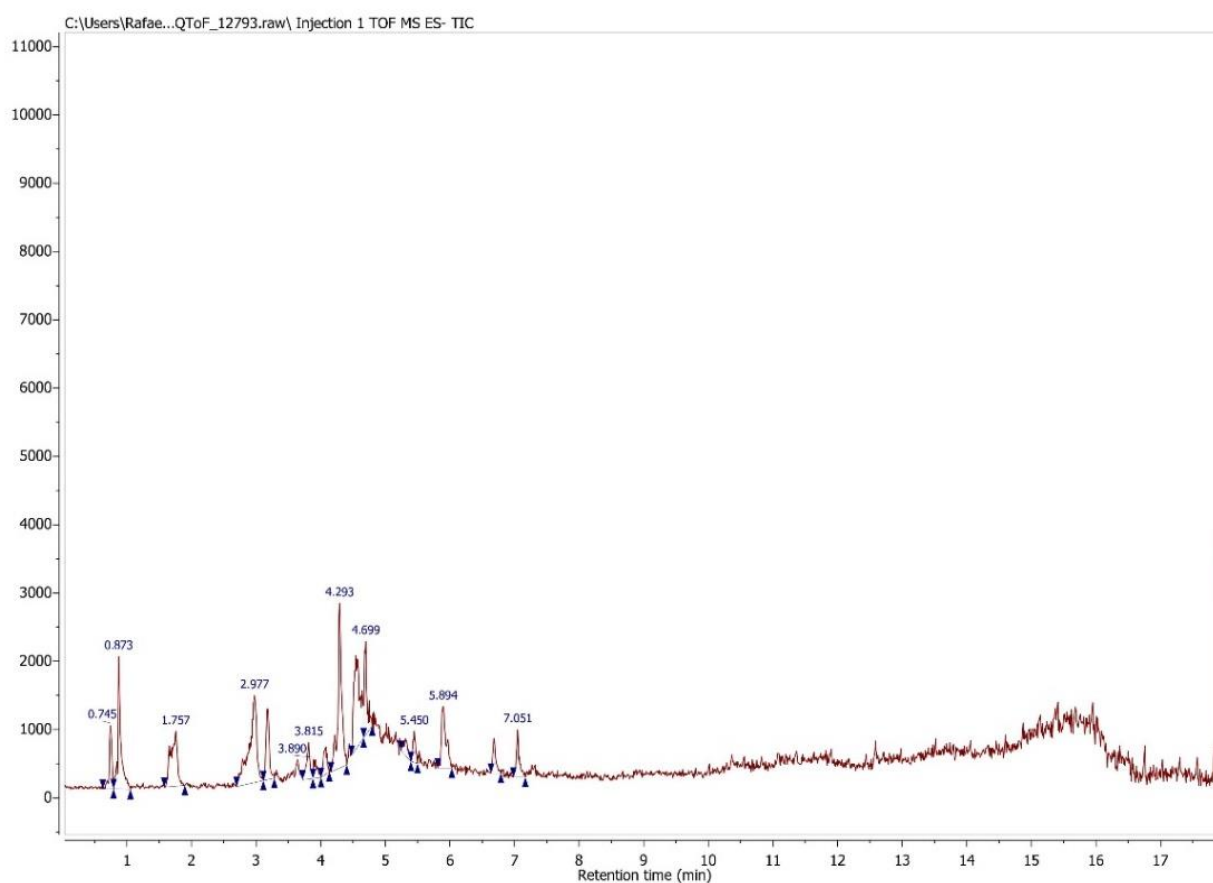


Figura 11 – Cromatograma do decocto das folhas de *M. urundeuva*.

Foram encontrados 17 picos no decocto das folhas de *M. urundeuva*, dos quais 16 foram identificados a partir da comparação dos espectros de massas com dados descritos na literatura (**Tabela 2**). Os compostos encontrados são pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários: dois aminoácidos não-proteicos (**2** e **6**), um ácido carboxílico (**3**), cinco derivados de

ácidos fenólicos simples (**4**, **5**, **7**, **12**, **13**), três flavonoides (**9**, **15** e **16**), um flavonoide glicosilado (**14**), um biflavonoide (**17**) e três galotaninos (**8**, **10** e **11**).

Tabela 2 – Compostos detectados e identificados no decocto das folhas de *M. urundeuva* por UPLC-ESI-qTOF-MS/MS no modo de ionização negativo.

Pico	TR (mi)	MS [M-H] ⁻	MS/MS	Fórmula molecular	Identificação	Referências
1	0,74	248,9611	235,9275	-	NI	
2	0,85	144,9848	100,9232	C ₆ H ₁₁ NO ₃	<i>N</i> -metil-(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)- <i>trans</i> -4-hidróxi-L-prolina	Aquino et al. (2019)
3	0,88	191,0542	173,0411	C ₇ H ₁₂ O ₆	Ácido quínico	Aquino et al. (2019)
4	1,76	125,0199	79,0190	C ₆ H ₆ O ₃	Pirogalol	Aquino et al. (2019)
5	2,97	169,0131	125,0215	C ₇ H ₆ O ₅	Ácido gálico	Aquino et al. (2019)
6	3,18	124,0126	78,0091	C ₂ H ₇ NO ₃ S	Taurina	Kataoka; Ohnishi (1986) Horai et al. (2010)
7	3,82	321,0282	169,0115 146,9411	C ₁₄ H ₁₀ O ₉	Ácido digálico	Aquino et al. (2019)
8	3,91	787,1315	633,1072 465,0924 169,0145	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -galoil- β -D-glicopiranosídeo	Aquino et al. (2019)
9	4,06	609,1691	447,0946 300,0260	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Rutina	
10	4,29	939,1399	769,1066 617,0931 169,0112	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -galoil- β -D-glicopiranosídeo	Aquino et al. (2019)
11	4,57	1091,1464	939,1347 769,1319 465,0906 295,0491 183,0235 169,0104	C ₄₈ H ₃₆ O ₃₀	3- <i>O</i> -(<i>m</i> -digaloil)-1,2,4,6-Tetra- <i>O</i> -galoil- β -D-glicopiranosídeo	Aquino et al. (2019)
12	4,69	183,0280	169,0095	C ₈ H ₈ O ₅	Metil galato	Aquino et al. (2019)
13	5,32	335,0440	183,0300	C ₁₅ H ₁₂ O ₉	Metil digalato	Aquino et al. (2019)
14	5,44	599,1120	469,0346 301,0361 169,0141	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₅	Quercetina 3- <i>O</i> -galoil- α -L-ramnopiranosídeo	Aquino et al. (2019)
15	5,90	301,0343	151,0033 107,0116	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Quercetina	Aquino et al. (2019)
16	6,68	285,0419	187,0383 116,9292	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Kaempferol	March; Miao (2004)
17	7,06	537,0894	375,0480	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	Amentoflavona	Yao et al. (2017)

Na análise do decocto das folhas de *S. obtusifolium*, foram identificados a presença de alguns compostos com MS característicos de saponinas e flavonóides, o que está de acordo com estudos realizados por Oliveira et al. (2012) que isolou diversos flavonoides glicosilados e saponinas triterpênicas do ácido protobássico do extrato etanólico das folhas de *S. obtusifolium*. O cromatograma do decocto das folhas *S. obtusifolium*, com os tempos de retenção dos picos, está apresentado na **Figura 12**.

Foram encontrados doze compostos no decocto das folhas de *S. obtusifolium*, dos quais 11 foram identificados a partir da comparação dos espectros de massas com dados da literatura (**Tabela 3**). Os compostos identificados estão distribuídos em diferentes grupos químicos, sendo um aminoácido não-proteico (indicado como número 2 na Tabela 3), um fenilpropanoide (número 3), um flavan-3-ol (4), quatro flavonoides glicosídeos (5, 6, 7 e 8) e quatro saponinas triterpênicas (9, 10, 11 e 12).

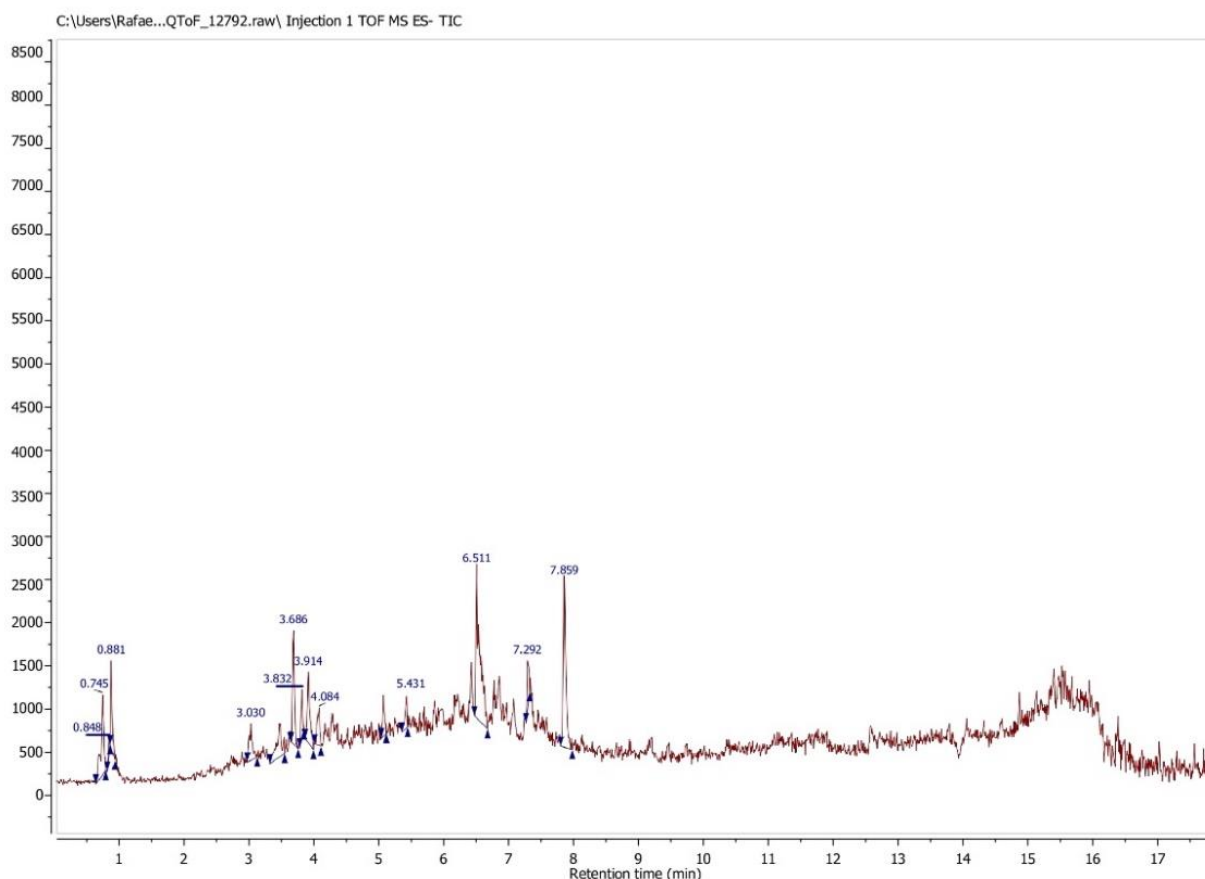


Figura 12 – Cromatograma do decocto das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*.

Tabela 3 – Compostos detectados e identificados no decocto das folhas de *S. obtusifolium* por UPLC-ESI-qTOF-MS/MS no modo de ionização negativo.

Pico	TR (min)	MS [M-H] ⁻	MS/MS	Fórmula molecular	Identificação	Referências
1	0,74	248,9571	235,9247 206,9109 158,9774	-	NI	
2	0,85	144,0647	127,9529	C ₆ H ₁₁ NO ₃	N-metil-(2S,4R)-trans-4-hidróxi-L-prolina	Aquino et al. (2017)
3	0,88	162,8411 [M-2H] ⁻	118,7307	C ₉ H ₈ O ₃	Ácido <i>p</i> -cumárico	Li et al. (2016)
4	3,03	289,0729	245,0772 203,0700	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	(epi) catequina	Jaiswal et al. (2012) Jiang et al. (2019)
5	3,69	755,2185	625,1587 300,0276	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	Quercetina-3-O-(O- α -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[α -ramnopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-galactopiranosídeo)	Oliveira et al. (2012)
6	3,83	771,2149	625,1941 300,0325	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	Quercetina-3-O-(O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[β -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-galactopiranosídeo)	Oliveira et al. (2012)
7	3,91	739,2322	284,0350	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	Kaempferol-3-O-(O- α -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[α -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-galactopiranosídeo)	Oliveira et al. (2012)
8	4,08	755,2067	609,1613 285,0321	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	Kaempferol-3-O-(O- α -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[β -glicopiranosil (1 $\rightarrow$ 3)]- β -glicopiranosídeo)	Oliveira et al. (2012)
9	5,43	> 1190	1121,5827 665,4194	-	Saponina do ácido protobássico I	Oliveira et al. (2012)
10	6,51	> 1190	1075,5507 665,4113	-	Saponina do ácido protobássico II	Oliveira et al. (2012)
11	7,29	> 1190	1177,6132 1059,6013	-	Saponina do ácido protobássico III	Oliveira et al. (2012)
12	7,86	665,4046	503,3434	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₁	Ácido protobássico hexosídeo	Chen et al. (2018)

4.2 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DO DECOCTO DAS FOLHAS DE *MYRACRODRUON URUNDEUVA* PELO ENSAIO COMETA

Os resultados da contagem dos danos (classes 0 a 4) e os valores calculados de ID e FD% por cada réplica (e suas respectivas médias) dos controles negativo, positivo e dos tratamentos com o decocto das folhas de *M. urundeuva* estão apresentados na **Tabela 4**. Comparando as médias obtidas das três réplicas de cada tratamento com o decocto, com a média obtida no controle negativo e positivo percebe-se que os valores foram superiores em todas as concentrações testadas, tanto para ID quanto FD%.

Os resultados globais da ANOVA foram estatisticamente significativos ($P \leq 0,005$) para os valores médios de ID e FD%, em todas as concentrações testadas quando comparadas ao controle negativo (**Tabela 5**).

De acordo com os resultados apresentados nas **Figuras 13 e 14**, para o ID e FD%, respectivamente, o decocto das folhas de *M. urundeuva* causou efeito positivo na indução de dano genético em todas as concentrações (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 mg/mL). É possível ainda perceber um claro efeito dose-dependente do decocto, ou seja, quanto maior a concentração da decocção aplicado aos indivíduos, maior foi o dano genético causado.

Houve também aumento significativo no ID e FD% nas concentrações mais altas aplicadas (8,0 e 16,0 mg/mL), em relação à frequência de dano do controle positivo, ou seja, estas concentrações causaram mais dano genético que o próprio controle positivo a ciclofosfamida.

Tabela 4 – Número de danos genéticos observados em larvas de *Drosophila melanogaster* Oregon R submetidas ao tratamento com o decocto das folhas de *Myracrodruon urundeuva* (MU), em três réplicas (^{a, b, c}) e os respectivos valores de média e desvio padrão.

Tratamentos	Nível de Dano					ID	FD %
	0	1	2	3	4		
Controle negativo ^a	83	14	3	0	0	20	17
Controle negativo ^b	85	14	1	0	0	16	15
Controle negativo ^c	79	15	6	0	0	27	21
Média	82,33	14,33	3,33	0	0	21,00	17,66
DP	3,05	0,57	2,51	0	0	5,56	3,05
Controle positivo ^a	34	17	17	23	9	156	66
Controle positivo ^b	43	15	6	24	12	147	57
Controle positivo ^c	22	21	32	19	6	166	78
Média	33,00	17,66	18,33	22,00	9,00	156,33	67,00
DP	10,53	3,05	13,05	2,64	3,00	9,50	10,53
MU 0,5 mg/mL ^a	37	45	9	8	1	91	63
MU 0,5 mg/mL ^b	40	16	14	22	8	142	60
MU 0,5 mg/mL ^c	42	14	8	30	6	144	58
Média	39,66	25,00	10,33	20,00	5,00	125,66	60,33
DP	2,51	17,34	3,21	11,13	3,60	30,03	2,51
MU 1,0 mg/mL ^a	28	39	14	16	3	127	72
MU 1,0 mg/mL ^b	44	27	11	13	5	108	56
MU 1,0 mg/mL ^c	20	41	15	19	5	148	80
Média	30,66	35,66	13,33	16,00	4,33	127,66	69,33
DP	12,22	7,57	2,08	3,00	1,15	20,00	12,22
MU 2,0 mg/mL ^a	26	18	17	26	13	182	74
MU 2,0 mg/mL ^b	26	31	9	26	8	159	74
MU 2,0 mg/mL ^c	31	14	11	37	7	175	69
Média	27,66	21,00	12,33	29,66	9,33	172,00	72,33
DP	2,88	8,88	4,16	6,35	3,21	11,78	2,88
MU 4,0 mg/mL ^a	23	27	21	21	8	164	77
MU 4,0 mg/mL ^b	26	23	20	23	8	164	74
MU 4,0 mg/mL ^c	26	17	17	29	11	182	74
Média	25,00	22,33	19,33	24,33	9,00	170,00	75,00
DP	1,73	5,03	2,08	4,16	1,73	10,39	1,73
MU 8,0 mg/mL ^a	15	19	17	32	17	217	85
MU 8,0 mg/mL ^b	18	16	21	33	12	205	82
MU 8,0 mg/mL ^c	3	21	12	49	15	252	97
Média	12,00	18,66	16,66	38,00	14,66	224,66	88,00
DP	7,93	2,51	4,50	9,53	2,51	24,41	7,93
MU 16,0 mg/mL ^a	6	18	22	41	13	237	94
MU 16,0 mg/mL ^b	4	19	18	42	17	249	96
MU 16,0 mg/mL ^c	6	20	18	45	11	235	94
Média	5,33	19,00	19,33	42,66	13,66	240,33	94,66
DP	1,15	1,00	2,30	2,08	3,05	7,57	1,15

Nível de dano: zero (0) representa ausência de dano genético e 1 a 4 são os níveis crescentes de dano genético. ID (índice de danos). FD% (Frequência de Dano). DP (desvio padrão).

Tabela 5 – Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste Bonferroni das comparações entre o Índice de Dano e Frequência de Dano, nos grupos controle negativo, controle positivo e diferentes concentrações do decocto das folhas de *Myracrodruon urundeuva*, submetidos às larvas da linhagem Oregon-R de *Drosophila melanogaster*.

Tratamento	Controle Positivo	Controle Negativo	MU 0,5 mg/mL	MU 1,0 mg/mL	MU 2,0 mg/mL	MU 4,0 mg/mL	MU 8,0 mg/mL
Índice Dano							
Controle negativo	0,0001*						
MU 0,5 mg/mL	1,0000	0,0001*					
MU 1,0 mg/mL	1,0000	0,0001*	1,0000				
MU 2,0 mg/mL	1,0000	0,0001*	0,1190	0,1610			
MU 4,0 mg/mL	1,0000	0,0001*	0,1610	0,2180	1,0000		
MU 8,0 mg/mL	0,0040*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0460*	0,0340*	
MU 16,0 mg/mL	0,0010*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0000*	0,0040*	0,0030*
Frequência Dano							
Controle negativo	0,0001*						
MU 0,5 mg/mL	1,0000	0,0010*					
MU 1,0 mg/mL	1,0000	0,0010*	1,0000				
MU 2,0 mg/mL	1,0000	0,0010*	1,0000	1,0000			
MU 4,0 mg/mL	1,0000	0,0010*	0,4330	1,0000	1,0000		
MU 8,0 mg/mL	0,0370*	0,0010*	0,0030*	0,0930	0,2960	0,8070	
MU 16,0 mg/mL	0,0030*	0,0010*	0,0010*	0,0070*	0,0220*	0,0630	1,0000

* Diferença significativa ($P \leq 0,05$).

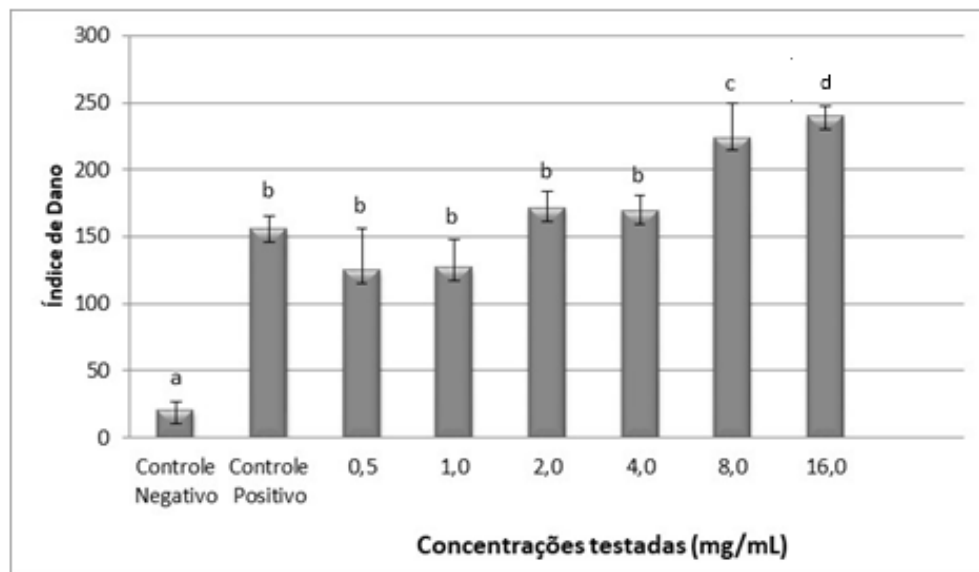


Figura 13 – Índice de Dano médio em hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster* ($n = 3$ para cada um). Barras verticais indicam o desvio padrão. As letras a, b, c e d no topo das colunas, quando iguais, indicam que não houve diferença, e as letras diferentes indicam que houve diferenças estatisticamente significativas nos grupos estudados, após análise *post-hoc* de Bonferroni ($P \leq 0,05$).

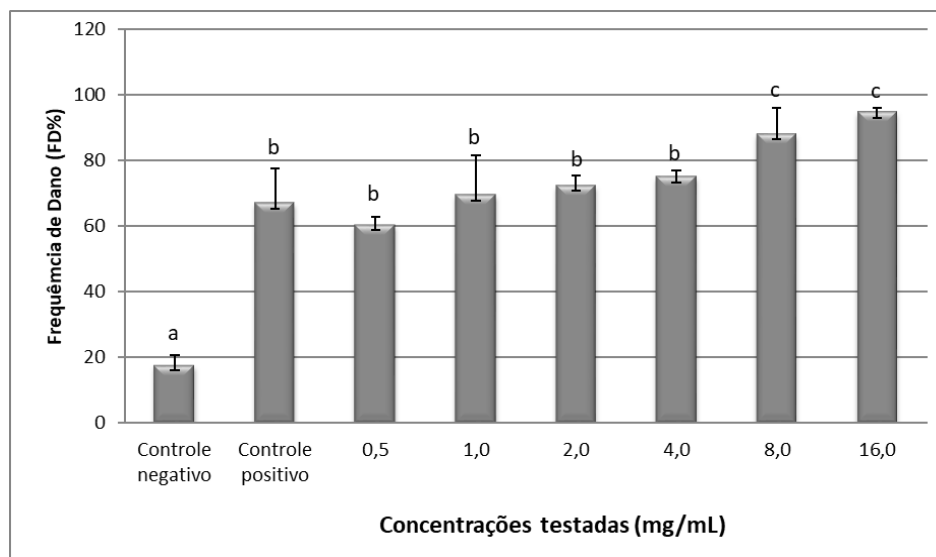


Figura 14 – Frequência de Dano média nos hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster* ($n = 3$ para cada um). Barras verticais indicam o desvio padrão. As letras a, b e c no topo das colunas, quando iguais, indicam que não houve diferença e as letras diferentes indicam que houve diferenças estatisticamente significativas nos grupos estudados, após análise *post-hoc* de Bonferroni ($P \leq 0,05$).

4.3 AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DO DECOCTO DAS FOLHAS DE *MYRACRODRUON URUNDEUVA*, UTILIZANDO O TESTE SMART

Foi realizado um teste de sobrevivência das larvas de terceiro estágio que foram expostas a diferentes doses do decocto das folhas de *M. urundeuva*. O gráfico da **Figura 15** indica o número médio de adultos sobreviventes no controle e nos tratamentos com o extrato. A figura demonstra que o extrato não alterou o número de sobreviventes nascidos do tratamento em nenhuma das doses testadas (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 mg/mL), quando comparado ao controle negativo (água destilada).

Os resultados da análise das asas dos adultos descendentes do cruzamento padrão (ST), tratados com o decocto das folhas de *M. urundeuva*, estão apresentados na **Tabela 6**. Os resultados apresentam efeitos tóxico-genéticos totais para ambos os marcadores, trans-heterozigotos (*mwh/flr³*) e heterozigotos balanceadores (*mwh/TM³*), para cada concentração, com número total analisado, frequência de diferentes pelos mutantes, total de manchas encontradas, e as médias das classes de tamanho das manchas e a frequência de indução de manchas por divisão celular. Como observado nessa tabela, as frequências de manchas espontâneas dos indivíduos do grupo controle negativo atingiram valores compatíveis com os resultados esperados (GRAF et al., 1984).

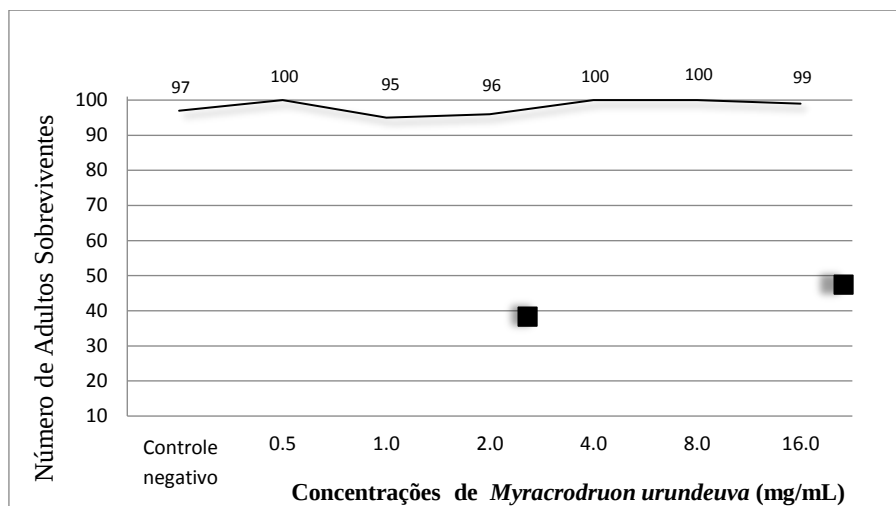


Figura 15 – Número médio de adultos sobreviventes de *D. melanogaster* submetidos ao teste SMART, após exposição ao decocto das folhas de *Myracrodruon urundeuva*.

A genotoxicidade final do extrato foi testada estatisticamente, conforme resultados da **Tabela 6**. Em indivíduos *trans-heterozigotos* tratados com o decocto das folhas de *M. urundeuva*, houve aumento significativo (+) das frequências de manchas simples pequenas, manchas simples grandes e do total de manchas, quando comparados às frequências espontâneas no controle negativo, o mesmo não aconteceu com relação à indução de manchas gêmeas, que apresentaram resultados inconclusivos (i).

Os resultados positivos da análise do total de manchas nos tratamentos com a decocção das folhas de *M. urundeuva* mostrados na **Tabela 6** indicam que o extrato foi capaz de induzir toxicidade genética em todas as doses testadas. A análise dos efeitos mutacionais induzidos pelo extrato de *M. urundeuva* nas asas dos indivíduos heterozigotos para o cromossomo TM³ demonstrou frequências de indução de manchas maiores que os valores encontrados no controle negativo, em todas as concentrações testadas. Caracterizando os dados como positivos para um efeito indutor de mutação do decocto das folhas de *M. urundeuva* em todas as concentrações testadas (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 mg/mL).

Tabela 6 – Frequência e número de manchas de pelos mutantes em moscas trans-heterozigotas (*mwh/flr³*) e heterozigotas balanceadoras (*mwh/TM³*) de *Drosophila melanogaster* submetidas ao tratamento com a decocção das folhas de *Myracrodruon urundeuva*, após cruzamento padrão, e avaliação dos efeitos genotóxicos.

Controle e diluições de <i>M.urundeuva</i> (mg/mL)	(N)	Frequência de manchas por indivíduo (nº de manchas) ^a						Total manchas ^c <i>mwh</i> (n)	Recom bi-nação % ^d	Muta-ção % ^e	
		Nº de moscas ^b (1–2 cells) (m = 2)		MSP ^b (>2 cells) (m = 5)		MG (m = 5)					Total manchas (m = 2)
MH (<i>mwh/flr</i> ³)											
Controle negativo	44	0,57 (25)		0,00 (00)		0,00 (00)		0,57 (25)		25	
0,5	44	0,75 (33)	i	0,16 (07)	+	0,05 (02)	i	0,95 (42)	+	40	9,47
1,0	44	0,84 (37)	i	0,20 (09)	+	0,00 (00)	i	1,05 (46)	+	46	26,67
2,0	44	0,82 (36)	i	0,32 (14)	+	0,00 (00)	i	1,14 (50)	+	50	38,60
4,0	44	1,07 (47)	+	0,16 (07)	+	0,05 (02)	i	1,27 (56)	+	54	47,24
8,0	44	1,14 (50)	+	0,16 (07)	+	0,02 (01)	i	1,32 (58)	+	57	0
16,0	44	1,20 (53)	+	0,23 (10)	+	0,02 (01)	i	1,45 (64)	+	63	0
BH (<i>mwh/TM3</i>)											
Controle negativo	45	0,51 (23)		0,02 (01)		— ^f		0,53 (24)		24	
0,5	45	0,93 (42)	+	0,11 (05)	i			1,04 (47)	+	47	
1,0	45	1,27 (57)	+	0,07 (03)	i			1,33 (60)	+	60	
2,0	45	1,44 (65)	+	0,13 (06)	i			1,58 (71)	+	71	
4,0	45	1,69 (76)	+	0,18 (08)	+			1,87 (84)	+	84	
8,0	45	1,76 (79)	+	0,16 (07)	+			1,32 (58)	+	90	
16,0	45	2,00 (90)	+	0,23 (10)	+			1,45 (64)	+	97	

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância 0,05. ^b Incluindo manchas simples *flr³* raras. ^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. ^d % de recombinação = 1 - [(frequência de manchas totais em indivíduos *mwh/TM³*) / (frequência de manchas totais em indivíduos *mwh/flr³*)] x 100. ^e % de mutação = 100 - (% de recombinação). ^f Apenas manchas *mwh* únicas podem ser observadas em heterozigotos *mwh* / *TM³*, pois o cromossomo balanceador *TM³* não possui uma mutação *flr³*. MSP: Manchas Simples Pequenas; MSG: Mancha Simples Grande; TM: Total de Manchas.

4.4 Avaliação da genotoxicidade do decocto das folhas de *Sideroxylon obtusifolium* pelo ensaio cometa

Os dados apresentados na **Tabela 7** mostram os danos genéticos médios (níveis 0 a 4), ID e FD% em indivíduos de *D. melanogaster* Oregon-R expostos às diferentes concentrações do decocto das folhas de *Sideroxylon obtusifolium* e grupos controle negativo e positivo. Os resultados mostram a alta incidência de dano três e quatro (com alteração do DNA) em comparação controle negativo que por sua vez não apresentou alteração no DNA. As médias das três réplicas de cada tratamento com o decocto, comparado a média obtida no controle negativo e positivo mostra que os valores foram superiores em todas as concentrações testadas, tanto para ID quanto FD% em relação aos grupos controles.

Tabela 7 – Avaliação de dano genético em larvas de *Drosophila melanogaster* Oregon R submetidas a controle negativo, positivo e a diferentes concentrações do decocto das folhas de *Sideroxylon obtusifolium* (SO), em três réplicas (^{a, b, c}).

Tratamentos	Nível de Dano					ID	FD %
	0	1	2	3	4		
Controle negativo ^a	83	14	3	0	0	20	17
Controle negativo ^b	85	14	1	0	0	16	15
Controle negativo ^c	79	15	6	0	0	27	21
Média	82,33	14,33	3,33	0	0	21,00	17,66
DP	3,05	0,57	2,51	0	0	5,56	3,05
Controle positivo ^a	34	17	17	23	9	156	66
Controle positivo ^b	43	15	6	24	12	147	57
Controle positivo ^c	22	21	32	19	6	166	78
Média	33,00	17,66	18,33	22,00	9,00	156,33	67,00
DP	10,53	3,05	13,05	2,64	3,00	9,50	10,53
SO 0,5 mg/mL ^a	19	9	12	45	15	228	81
SO 0,5 mg/mL ^b	14	15	38	24	9	199	86
SO 0,5 mg/mL ^c	22	10	7	46	15	222	78
Média	18,33	11,33	19,00	38,33	13,00	216,33	81,66
DP	4,04	3,21	16,64	12,42	3,46	15,30	4,04
SO 1,0 mg/mL ^a	18	18	19	36	9	200	82
SO 1,0 mg/mL ^b	15	9	13	57	6	230	85
SO 1,0 mg/mL ^c	10	12	19	45	14	241	90
Média	14,33	13,00	17,00	46,00	9,66	223,66	85,66
DP	4,04	4,58	3,46	10,53	4,04	21,22	4,04
SO 2,0 mg/mL ^a	10	12	14	48	16	248	90
SO 2,0 mg/mL ^b	11	10	14	49	16	249	89
SO 2,0 mg/mL ^c	8	8	22	48	14	252	92
Média	9,66	10,00	16,66	48,33	15,33	249,66	90,33
DP	1,52	2,00	4,61	0,57	1,15	2,08	1,52
SO 4,0 mg/mL ^a	9	7	18	45	21	262	91
SO 4,0 mg/mL ^b	12	8	13	53	14	249	88
SO 4,0 mg/mL ^c	11	9	16	48	16	249	89
Média	10,66	8,00	15,66	48,66	17,00	253,33	89,33
DP	1,52	1,00	2,51	4,04	3,60	7,50	1,52
SO 8,0 mg/mL ^a	7	8	11	52	22	274	93
SO 8,0 mg/mL ^b	7	7	12	52	22	275	93
SO 8,0 mg/mL ^c	4	8	14	55	19	277	96
Média	6,00	7,66	12,33	53,00	21,00	275,33	94,00
DP	1,73	0,57	1,52	1,73	1,73	1,52	1,73
SO 16,0 mg/mL ^a	5	8	13	45	29	285	95
SO 16,0 mg/mL ^b	6	9	12	46	27	279	94
SO 16,0 mg/mL ^c	5	8	18	41	28	279	95
Média	5,33	8,33	14,33	44,00	28,00	281,00	94,66
DP	0,57	0,57	3,21	2,64	1,00	3,46	0,57

Nível de dano: zero (0) representa ausência de dano genético e 1 a 4 são os níveis crescentes de dano genético. ID (índice de danos). FD% (Frequência de Dano). DP (desvio padrão).

Os resultados obtidos por meio do teste ANOVA e Bonferroni mostram que os grupos tratados foram estatisticamente diferentes dos grupo controle negativo ($P \leq 0,05$) para os valores médios de ID e FD%, em todas as concentrações testadas (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Avaliação do índice de dano genético em larvas da linhagem Oregon-R de *Drosophila melanogaster* comparado ao controle negativo e a diferentes concentrações do decocto das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*. Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste Bonferroni.

Tratamentos	Controle positivo	Controle negativo	SO 0,5 mg/mL	SO 1,0 mg/mL	SO 2,0 mg/mL	SO 4,0 mg/mL	SO 8,0 mg/mL
Índice Dano							
Controle Negativo	0,0001*						
SO 0,5 mg/mL	0,0001*	0,0001*					
SO 1,0 mg/mL	0,0001*	0,0001*	1,0000				
SO 2,0 mg/mL	0,0001*	0,0001*	1,0000	1,0000			
SO 4,0 mg/mL	0,0001*	0,0001*	1,0000	1,0000	0,1610		
SO 8,0 mg/mL	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0900	0,0001*	
SO 16,0 mg/mL	0,0001*	0,0001*	0,0080*	0,0400*	0,0001*	0,0150*	0,9090
Frequência Dano %							
Controle Negativo	0,0001*						
SO 0,5 mg/mL	0,0410*	0,0001*					
SO 1,0 mg/mL	0,0050*	0,0001*	1,0000				
SO 2,0 mg/mL	0,0001*	0,0001*	0,0840	0,4180			
SO 4,0 mg/mL	0,0590	0,0001*	1,0000	1,0000	0,7490		
SO 8,0 mg/mL	0,0001*	0,0001*	0,0710	0,6280	1,0000	0,0490*	
SO 16,0 mg/mL	0,0001*	0,0001*	0,1490	1,0000	1,0000	0,1010	1,0000

*Diferença significativa ($P \leq 0,05$)

Conforme as **Figuras 16 e 17**, os resultados indicam que o decocto das folhas de *S. obtusifolium* causou efeito positivo na indução de dano genético em todas as concentrações (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 mg/mL), em relação ao controle negativo. Além disso, não houve diferenças significativas entre as concentrações de *S. obtusifolium* testadas.

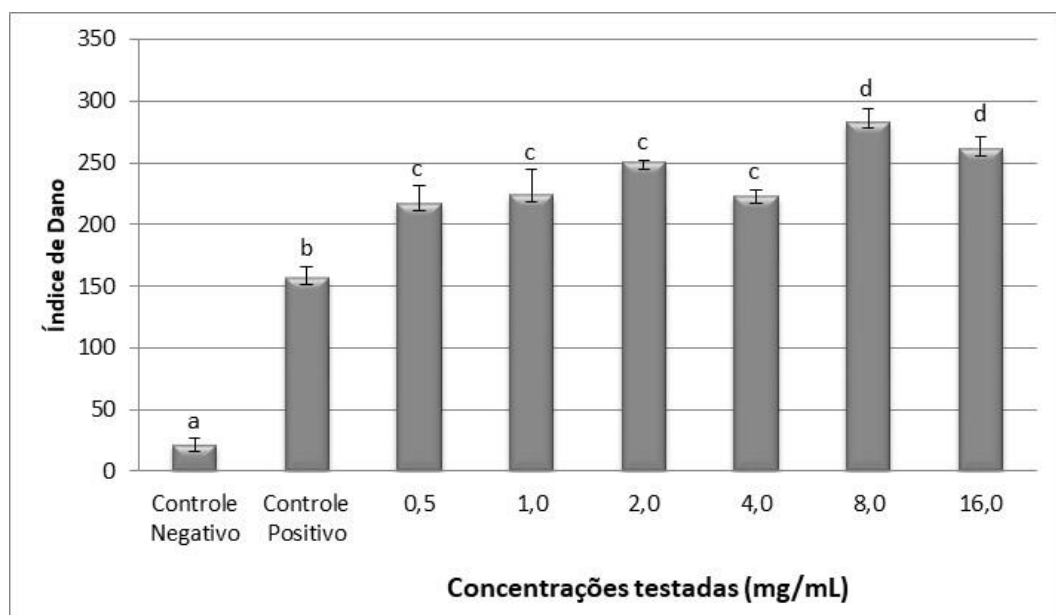


Figura 16 – Índice de Dano médio em hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster* ($n=3$ para cada um) tratados com concentrações de *Sideroxylon obtusifolium*. Barras verticais indicam o desvio padrão. As letras a, b, c e d no topo

das colunas, quando iguais, indicam que não houve diferença, e as letras diferentes indicam que houve diferenças estatisticamente significativas nos grupos estudados, após análise *post-hoc* de Bonferroni ($P \leq 0,05$).

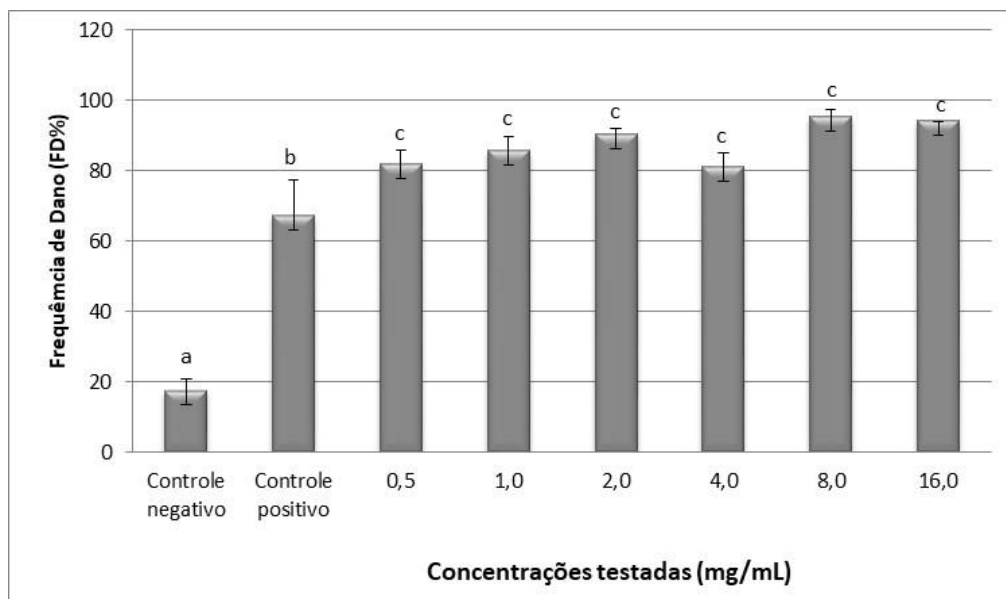


Figura 17 – Frequência média de dano (DF%) nos hemócitos de larvas de Oregon-R de *Drosophila melanogaster* ($n = 3$ para cada um) tratados com concentrações de *Sideroxylon obtusifolium*. Barras verticais indicam desvio padrão. As letras a, b e c no topo das colunas, quando iguais, indicam que não houve diferença e as letras diferentes indicam que houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, indicadas pela análise *post-hoc* de Bonferroni ($P \leq 0,05$).

4.5 AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DA DECOÇÃO DAS FOLHAS DE *SIDEROXYLON OBTUSIFOLIUM*, UTILIZANDO O TESTE SMART

Os resultados da sobrevivência das larvas de *D. melanogaster* submetidas às doses de *S. obtusifolium* (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 mg/mL) no teste SMART são mostrados na **Figura 18**. De acordo com a curva de sobrevivência obtida no presente estudo, as doses do decocto folhas de *S. obtusifolium* não apresentaram efeitos significativos sobre o número de sobreviventes tratados, que foi superior a 90% em todos os casos. Portanto, não houve efeito tóxico, nas condições experimentais aplicadas.

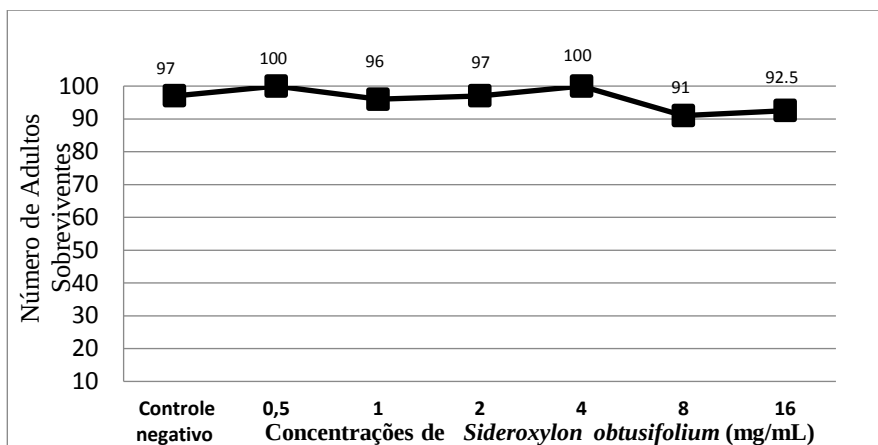


Figura 18 – Número médio de adultos sobreviventes de *D. melanogaster* submetidos ao teste SMART, após exposição ao extrato de *Sideroxylon obtusifolium*.

Na **Tabela 9** estão os resultados da frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes MH e BH provenientes do cruzamento ST tratados com as diferentes concentrações do decocto das folhas de *S. obtusifolium* (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 mg/mL).

Na avaliação da genotoxicidade, as doses utilizadas provocaram um aumento significativo ($P \leq 0,05$) na frequência das categorias de manchas mutantes (simples pequenas, simples grandes), em relação ao grupo controle negativo. Houve aumento significativo do potencial recombinogênico do decocto nos descendentes BH, nas categorias de manchas mutantes (simples pequenas, simples grandes) e no total de manchas, em todas as doses testadas. Disso conclui-se que a decocção das folhas de *S. obtusifolium*, nas condições experimentais aplicadas, foi mutagênico e recombinogênico.

Tabela 9 – Frequência e número de manchas de pelos mutantes em moscas trans-heterozigotas (*mwh/flr³*) e heterozigotas balanceadoras (*mwh/TM³*) de *Drosophila melanogaster* submetidas ao tratamento com o decocto das folhas *Sideroxylon obtusifolium*, após cruzamento padrão e avaliação dos efeitos genotóxicos.

Frequência de manchas por indivíduo (n° de manchas) ^a													
Controle e diluições de S., <i>obtusifolium</i> m (mg/mL)		(N)	N° de moscas ^b (1–2 cells) (m = 2)		MSP ^b (>2 cells) (m = 5)		MG (m = 5)		Total manchas (m = 2)		Total mancha s ^c <i>mwh</i> (n)	Recomb i-nação % ^d	Muta - ção % ^e
MH (<i>mwh/flr</i> ³)													
Controle negativo	40		0,58 (23)		0,00 (00)		0,00 (00)		0,58 (23)		23		
0,5	40		0,53 (21)	-	0,15 (06)	+	0,05 (02)	i	0,68 (27)	-	27	51,5	48,5
1,0	40		0,65 (26)	-	0,23 (09)	+	0,03 (01)	i	0,90 (36)	+	36	31,1	68,9
2,0	40		0,75 (30)	i	0,18 (07)	+	0,00 (00)	i	0,93 (37)	+	37	45,2	54,9
4,0	40		0,70 (28)	i	0,28 (11)	+	0,00 (00)	i	0,98 (39)	+	39	37,8	62,2
8,0	40		1,20 (48)	+	0,30 (12)	+	0,00 (00)	i	1,50 (60)	+	60	6,7	93,3
16,0	40		1,23 (49)	+	0,23 (09)	+	0,00 (00)	i	1,45 (58)	+	58	0	100,0
BH (<i>mwh/TM3</i>)													
Controle negativo	40		0,50 (20)		0,03 (01)		— ^f		0,53 (21)		21		
0,5	40		0,95 (38)	+	0,08 (03)	+			1,03 (41)	+	41		
1,0	40		1,18 (47)	+	0,00 (00)	+			1,18 (47)	+	47		
2,0	40		1,30 (52)	+	0,05 (02)	+			1,35 (54)	+	54		
4,0	40		1,38 (55)	+	0,00 (00)	+			1,35 (54)	+	55		
8,0	40		1,28 (51)	+	0,13 (05)	+			1,40 (56)	+	56		
16,0	40		1,43 (57)	+	0,03 (01)	+			1,45 (58)	+	58		

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância 0,05. ^bIncluindo manchas simples *flr³* raras. ^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. ^dd % de recombinação = 1 - [(frequência de manchas totais em indivíduos *mwh/TM³*) / (frequência de manchas totais em indivíduos *mwh/flr³*)] x 100. ^e% de mutação = 100 - (% de recombinação). ^fApenas manchas *mwh* únicas podem ser observadas em heterozigotos *mwh* / *TM³*, pois o cromossomo balanceador *TM³* não possui uma mutação *flr³*. MSP: Manchas Simples Pequenas; MSG: Mancha Simples Grande; TM: Total de Manchas.

4.6 ESTUDO DA TERATOGENICIDADE DO DECOCTO DAS FOLHAS DE *MYRACRODRUON URUNDEUVA* E *SIDEROXYLON OBTUSIFOLIUM* EM RATAS WISTAR

De acordo com os resultados obtidos os animais que receberam, por via oral, o decocto das folhas de *Myracrodruon urundeuva* e *Sideroxylon obtusifolium* (250, 500 e 1000 mg/kg), durante todo o período de organogênese, não apresentaram quaisquer sinais de toxicidade materna, como: diarreia, piloereção, estresse, tremores, salivação, sangramento ou morte. Em relação ao ganho de massa dos animais tratados com *M. urundeuva*, verificou-se que todos os grupos apresentaram um desenvolvimento ponderal semelhante durante todo o período de prenhez (**Figura 19**), não apresentando quaisquer diferenças entre as doses e o grupo controle.

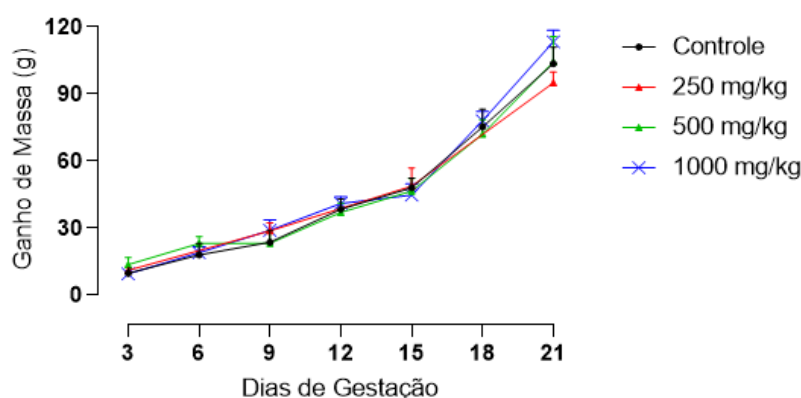


Figura 19 – Efeito do decocto das folhas de *M. urundeuva* (250, 500 e 1000 mg/kg) por via oral sobre o ganho de massa (g) em ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6º ao 15º dia pós-coito). Os valores apresentam as médias $\pm$ desvio padrão (n= 6-8 indivíduos/grupo).

O consumo de água e ração (**Figura 20 A e B**) das ratas que receberam o decocto das folhas de *M. urundeuva*, respectivamente, em todas as doses, não apresentaram diferença significativas, exceto para o consumo de água no grupo dos animais que receberam a dose de 250 mg/kg de *M. urundeuva*, no qual ocorreu um aumento em relação ao grupo controle. Porém, como este fenômeno não apareceu em todas as doses e não é dose-dependente, pode ser considerado um evento isolado relacionado com variações ambientais. Desta forma, pode-se inferir que a administração do decocto de *M. urundeuva* nas doses (250, 500 e 1000 mg/kg) não causou alteração visível na homeostase materna.

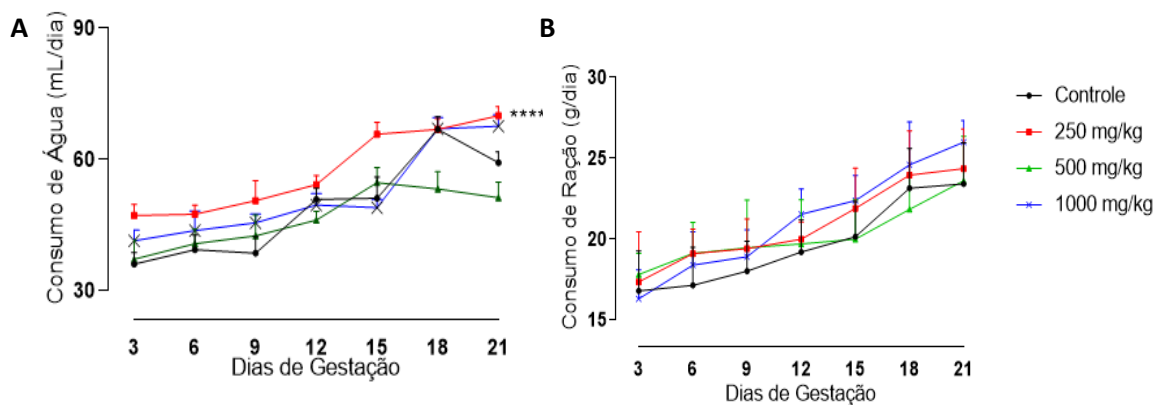


Figura 20 – A. Efeito da decoção das folhas de *M. urundeuva* (250, 500 ou 1000 mg/kg) por via oral sobre o consumo de água (mL). B. Efeito da decoção das folhas de *M. urundeuva* (250, 500 ou 1000 mg/kg) por via oral sobre o consumo de ração (g). Os valores apresentam as médias $\pm$ desvio padrão (n= 6-8 indivíduos/grupo).

Também não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados quanto ao consumo de água e ração. As ratas não apresentaram alterações sistêmicas ou sobre seu ciclo estral tratadas, por um período de 28 dias. Os animais tratados com *S. obtusifolium* apresentaram ganho de massa ponderal semelhante ao controle negativo em todas as doses testadas (**Figura 21**).

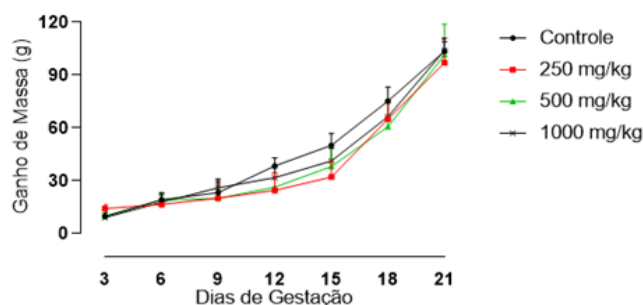


Figura 21 – Efeito do decocto das folhas de *S. obtusifolium* (250, 500 e 1000 mg/kg) por via oral sobre o ganho de massa (g) em ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6º ao 15º dia pós-coito). Os valores apresentam as médias $\pm$ desvio padrão (n= 6-8 indivíduos/grupo).

Os resultados obtidos do consumo de água e ração dos animais tratados com o decocto das folhas de *S. obtusifolium* (**Figura 22 A e B**) demonstram que houve diferença significativa no consumo de água dos animais tratados em relação ao grupo controle negativo aos 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias no grupo 250 mg/kg e aos 12 dias no grupo 1000 mg/kg. Já para o consumo de ração observa-se uma diferença significativa aos 18 dias nos três grupos (250, 500 e 1000 mg/kg) com relação ao controle negativo. Desta forma, as diferenças estatísticas apresentadas são fatos isolados, relacionados a diferenças ambientais, não a toxicidade do composto, uma vez que não apresentam uma diferença linear com relação aos dias e nem demonstram relação dose dependente. Portanto, de

acordo com os resultados apresentados o decocto das folhas de *S. obtusifolium* nas doses experimentais testadas não demonstrou toxicidade materna.

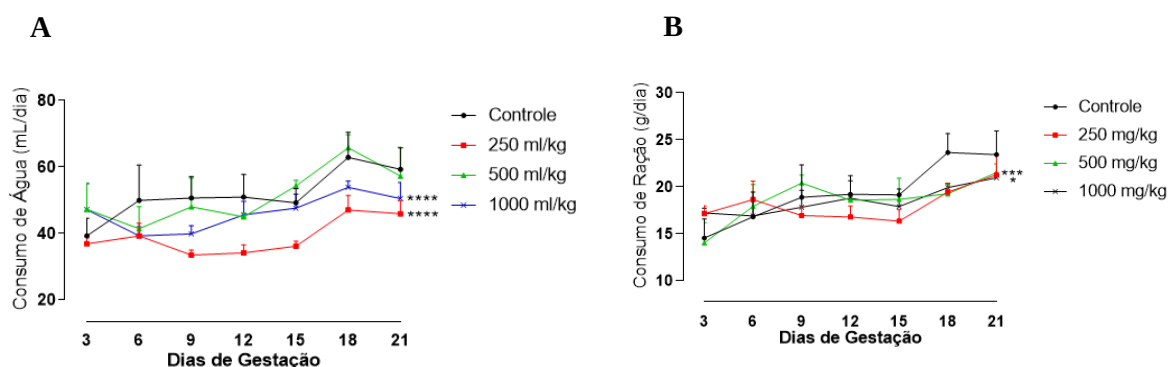


Figura 22 – A. Efeito do decocto das folhas de *S. obtusifolium* (250, 500 ou 1000 mg/kg) por via oral sobre o consumo de água (mL). **B.** Efeito do decocto das folhas de *S. obtusifolium* (250, 500 ou 1000 mg/kg) por via oral sobre o consumo de ração (g). Os valores apresentam as médias $\pm$ desvio padrão (n=6-8 indivíduos/grupo).

De acordo com os resultados apresentados nas **Tabelas 10 e 11**, a análise macroscópica externa dos órgãos das progenitoras não mostrou alterações significativas na cor ou textura, quando comparadas ao grupo controle. As massas absolutas e relativa dos órgãos também não se apresentaram alteradas pela administração dos decoctos de *Myracrodruon urundeuva* e *Sideroxylon obtusifolium* nas doses testadas.

Tabela 10 – Efeito do decocto das folhas de *Myracrodruon urundeuva* nas doses 250, 500 e 1000 mg/kg, testadas por via oral sobre as massas absolutas (g) e relativas (%) dos órgãos em ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6° ao 15° dia), comparadas ao grupo controle. Os valores apresentam as médias $\pm$ desvio padrão (n= 8 animais/grupo).

Órgãos	Controle	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg
Coração (g)	0,88 $\pm$ 0,16	0,82 $\pm$ 0,12	0,83 $\pm$ 0,13	0,91 $\pm$ 0,10
Coração (%)	0,29 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,02
Fígado (g)	11,52 $\pm$ 1,11	11,62 $\pm$ 1,11	11,34 $\pm$ 1,96	12,45 $\pm$ 0,88
Fígado (%)	3,92 $\pm$ 0,33	3,93 $\pm$ 0,27	3,87 $\pm$ 0,56	3,96 $\pm$ 0,24
Rins (g)	1,57 $\pm$ 0,09	1,56 $\pm$ 0,18	1,58 $\pm$ 0,09	1,62 $\pm$ 0,22
Rins (%)	0,53 $\pm$ 0,03	0,52 $\pm$ 0,05	0,54 $\pm$ 0,05	0,51 $\pm$ 0,07
Pulmões (g)	1,27 $\pm$ 0,23	1,25 $\pm$ 0,21	1,12 $\pm$ 0,11	1,42 $\pm$ 0,25
Pulmões (%)	0,43 $\pm$ 0,08	0,42 $\pm$ 0,06	0,38 $\pm$ 0,04	0,45 $\pm$ 0,08
Baço (g)	0,75 $\pm$ 0,28	0,66 $\pm$ 0,12	0,64 $\pm$ 0,10	0,72 $\pm$ 0,19
Baço (%)	0,25 $\pm$ 0,10	0,22 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,04	0,23 $\pm$ 0,05
Adrenais (g)	0,08 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,02
Adrenais (%)	0,02 $\pm$ 0,007	0,02 $\pm$ 0,004	0,02 $\pm$ 0,006	0,01 $\pm$ 0,008

Tabela 11 – Efeito do decocto das folhas de *Sideroxylon obtusifolium* nas doses 250, 500 e 1000 mg/kg por via oral sobre as massas absolutas (g) e relativas (%) dos órgãos em ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6° ao 15° dia) comparadas ao grupo controle. Os valores apresentam as médias $\pm$ desvio padrão (n= 8 animais/grupo).

Órgãos	Controle	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg
Coração (g)	0,83 $\pm$ 0,13	0,79 $\pm$ 0,11	0,78 $\pm$ 0,09	0,75 $\pm$ 0,08
Coração (%)	0,27 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,03
Fígado (g)	11,52 $\pm$ 1,11	11,21 $\pm$ 1,54	12,12 $\pm$ 0,65	11,02 $\pm$ 0,90
Fígado (%)	3,92 $\pm$ 0,33	3,97 $\pm$ 0,32	4,05 $\pm$ 0,27	3,84 $\pm$ 0,37
Rins (g)	1,57 $\pm$ 0,09	1,55 $\pm$ 0,29	1,42 $\pm$ 0,08	1,39 $\pm$ 0,13
Rins (%)	0,53 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,11	0,47 $\pm$ 0,03	0,48 $\pm$ 0,05
Pulmões (g)	1,27 $\pm$ 0,23	1,27 $\pm$ 0,27	1,24 $\pm$ 0,22	1,13 $\pm$ 0,27
Pulmões (%)	0,43 $\pm$ 0,08	0,45 $\pm$ 0,09	0,41 $\pm$ 0,08	0,39 $\pm$ 0,09
Baço (g)	0,75 $\pm$ 0,28	0,62 $\pm$ 0,08	0,66 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,15
Baço (%)	0,25 $\pm$ 0,10	0,22 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,05
Adrenais (g)	0,08 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,07	0,07 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01
Adrenais (%)	0,02 $\pm$ 0,007	0,03 $\pm$ 0,023	0,02 $\pm$ 0,003	0,02 $\pm$ 0,003

A performance reprodutiva materna foi avaliada no 21° dia de gestação, tanto dos grupos tratados com os decoctos das folhas de *M. urundeuva* e *S. obtusifolium*, quanto do controle. Diversos parâmetros foram analisados, dentre eles o número de corpos lúteos, implantações, fetos vivos, fetos mortos, perdas pós-implantação e o índice de reabsorção, nos quais não foram

observadas diferenças estatisticamente significativa entre nenhum dos parâmetros analisados quando comparados os grupos tratados com *M. urundeuva* e o grupo controle **Tabelas 12**. O grupo tratado com *S. obtusifolium* apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle para o número de implantações na dose de 250 mg/kg e para o número de corpos lúteos, implantações e fetos vivos na dose de 500 mg/kg, como mostrado na **Tabelas 13**.

Tabela 12 – Efeito do decocto das folhas de *Myracrodruon urundeuva* nas doses (250, 500 e 1000 mg/kg) por via oral sobre os parâmetros reprodutivos em ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6º ao 15º dia).

Parâmetros reprodutivos	Controle	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg
Número de ratas prenhes	10	8	8	8
Número de fetos vivos ¹	8,88 ± 0,92	9,28 ± 0,95	9,42 ± 1,61	10,00 ± 1,26
Número de fetos mortos ¹	0	0	0	0
Número de implantações ¹	9,11 ± 0,60	9,42 ± 1,27	9,42 ± 1,61	10,00 ± 1,26
Número de corpos lúteos ¹	9,11 ± 0,60	9,87 ± 1,45	10,25 ± 1,28	10,50 ± 0,83
Número de reabsorções ²	0	0	0	0
Índice de reabsorções ²	0	0	0	0
Taxa de perdas pós-implantação ²	0	0	0	0

Índice de reabsorções (nº de reabsorções/nº de implantações x 100) e Taxas de perdas de pós-implantação (nº de implantações – nº de fetos vivos/nº de implantações x 100). ¹Os valores apresentam as médias ± desvio padrão (n= 8-10 animais/grupo). ²Os valores apresentam a mediana.

Tabela 13 – Efeito do decocto das folhas de *Sideroxylon obtusifolium* nas doses (250, 500 e 1000 mg/kg) por via oral sobre os parâmetros reprodutivos em ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6º ao 15º dia).

Parâmetros reprodutivos	Controle	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg
Ratas Prenhes	10	8	8	8
Número de fetos vivos ¹	9,12 ± 0,64	10,57 ± 1,61	10,43 ± 1,61*	9,50 ± 1,76
Número de fetos mortos ¹	0	0	0	0
Número de implantações ¹	9,11 ± 0,60	10,57 ± 1,61*	10,43 ± 1,61*	10,00 ± 0,63
Número de corpos lúteos ¹	9,30 ± 0,82	10,25 ± 1,75	11,00 ± 1,29*	10,17 ± 0,40
Número de reabsorções ²	0	0	0	0
Índice de reabsorções ²	0	0	0	0
Taxa de perdas pós-implantação ²	0	0	0	0

Índice de reabsorções (nº de reabsorções/nº de implantações x 100) e Taxas de perdas de pós-implantação (nº de implantações – nº de fetos vivos/nº de implantações x 100). ¹Os valores apresentam as médias ± d.p.m. (n= 8-10/grupo). ²Os valores apresentam a mediana. *Estatisticamente diferente do grupo controle p ≤ 0,05 (ANOVA seguido por Newman-Keuls).

Para a verificar a existência de malformações no feto, foi realizada uma análise externa minuciosa, na qual foi verificada a abertura ocular, protusão de língua, inserção da orelha, presença de patas, dedos, cauda, hematomas, edemas, entre outros, seguida por uma análise visceral, de acordo com as orientações das secções seriadas de Wilson (1965), apresentadas anteriormente na **Tabela 1**, e uma análise detalhada esqueleto interno.

A administração do decocto das folhas de *M. urundeuva* e de *S. obtusifolium* (nas doses 250, 500 e 1000 mg/kg) durante o período de organogênese de fêmeas prenhes, não causaram alterações externas visíveis nos fetos quando comparados ao grupo controle negativo (**Tabelas 14 e 15**, respectivamente) e também não foram observadas malformações ou anomalias viscerais nos grupos tratados. Embora tenham sido encontradas alterações esqueléticas no esternóbrio, em todas as doses testadas, estas alterações não foram diferentes do controle negativo.

Tabela 14 – Efeito do decocto das folhas de *Myracrodruon urundeuva* nas doses (250, 500 e 1000 mg/kg) por via oral sobre as malformações e anomalias externas e internas (esquelética e visceral) sobre fetos e ninhadas de ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6º ao 15º dia).

Efeitos		Controle	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg
Malformações externas	Ninhadas afetadas	0/8	0/8	0/8	0/8
	Fetos afetados	0/80	0/77	0/71	0/78
Anomalias externas	Ninhadas afetadas	0/8	0/8	0/8	0/8
	Fetos afetados	0/80	0/77	0/71	0/78
Alterações esqueléticas	Ninhadas afetadas	4/8	3/8	3/8	3/8
	Fetos afetados	4/40	3/37	3/38	3/39
Anomalias esqueléticas	Ninhadas afetadas	0/8	0/8	0/8	0/8
	Fetos afetados	0/40	0/38	0/35	0/39
Anomalias viscerais	Ninhadas afetadas	0/8	0/8	0/8	0/8
	Fetos afetados	0/40	0/39	0/36	0/39
Alterações viscerais	Ninhadas afetadas	0/8	0/8	0/8	0/8
	Fetos afetados	0/40	0/39	0/36	0/39

Tabela 15 – Efeito do decocto das folhas de *Sideroxylon obtusifolium* (250, 500 e 1000 mg/kg) por via oral sobre as malformações e anomalias externas e internas (esquelética e visceral) sobre fetos e ninhadas de ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6° ao 15° dia).

Efeitos		Controle	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg
Malformações externas	Ninhadas afetadas	0/8	0/8	0/8	0/8
	Fetos afetados	0/80	0/74	0/76	0/78
Anomalias externas	Ninhadas afetadas	0/8	0/8	0/8	0/8
	Fetos afetados	0/80	0/74	0/76	0/78
Alterações esqueléticas	Ninhadas afetadas	4/8	1/8	3/8	4/8
	Fetos afetados	4/40	1/37	3/38	4/39
Anomalias esqueléticas	Ninhadas afetadas	0/8	0/8	0/8	0/8
	Fetos afetados	0/40	0/37	0/38	0/39
Anomalias viscerais	Ninhadas afetadas	0/8	0/8	0/8	0/8
	Fetos afetados	0/40	0/37	0/38	0/39
Alterações viscerais	Ninhadas afetadas	0/8	0/8	0/8	0/8
	Fetos afetados	0/40	0/37	0/38	0/39

Os resultados obtidos das análises do esqueleto interno dos fetos descendentes de progenitoras tratadas com o decocto de *M. urundeuva* e *S. obtusifolium* (doses 250, 500 e 1000 mg/kg), durante o período de organogênese (do 6° ao 15° dia de prenhez), estão apresentados nas **Tabelas 16 e 17**, respectivamente. Apenas a dose 250 mg/kg de *S. obtusifolium* gerou diferença redução significativa no número de vértebras caudais, comparado ao controle negativo, não apresentando diferença nas demais doses testadas e parâmetros analisados. Além dessa variação estar dentro do esperado, não ocorreram alterações desse tipo nas doses mais altas que 250 mg/kg. As doses testadas de *M. urundeuva* não causaram alterações significativas nas estruturas ósseas dos fetos, quando comparados ao controle negativo, nas condições experimentais testadas.

Tabela 16 – Efeito do decocto das folhas de *Myracrodruon urundeuva* (250, 500 e 1000 mg/kg), administrado por via oral, sobre os pontos de ossificação de fetos e proles de ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6° ao 15° dia).

Pontos de ossificação	Controle	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg
Esternébrio	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Falanges posteriores	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
Falanges anteriores	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
Metacarpo	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
Metatarso	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00
Vértebras caudais	3,00 ± 0,26	2,75 ± 0,16	2,60 ± 0,34	3,06 ± 0,62
Total	25,67 ± 0,57	25,65 ± 0,32	25,26 ± 0,64	25,69 ± 0,58

Os valores representam as médias ± desvio padrão (n = 8 indivíduos/grupo).

Tabela 17 – Efeito do decocto das folhas de *Sideroxylon obtusifolium* (250, 500 e 1000 mg/kg), administrado por via oral, sobre os pontos de ossificação de fetos e proles de ratas Wistar prenhes tratadas durante o período de organogênese (6° ao 15° dia).

Pontos de ossificação	Controle	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg
Esternébrio	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00
Falanges posteriores	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
Falanges anteriores	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
Metacarpo	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
Metatarso	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00
Vértebras caudais	3,00 ± 0,26	2,23 ± 0,56**	2,89 ± 0,18	2,79 ± 0,52
Total	25,80 ± 0,29	25,10 ± 0,58	25,50 ± 0,49	24,97 ± 1,03

Os valores representam as médias ± desvio padrão (n = 8 indivíduos/grupo).

**Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA, seguido pelo pós-teste de Dunn, $p \leq 0,01$).

Os resultados indicam que os decoctos de *Myracrodruon urundeuva* e *Sideroxylon obtusifolium*, nas doses 250, 500 e 1000 mg/kg administrados por via oral, durante o período de organogênese, não causaram toxicidade materna e ou fetal, e nem efeito teratogênico dos decoctos nos fetos, nas condições experimentais testadas.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi avaliada a genotoxicidade e mutagenicidade do decocto seco das folhas de *M. urundeuva* e *S. obtusifolium* em células somáticas de *D. melanogaster* usando o Ensaio Cometa e o teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART), além da toxicidade materna em ratas Wistar e teratogênese em sua prole.

De acordo com Gleit et al. (2016), comparar os resultados do Ensaio cometa com dados de outros sistemas de teste é altamente recomendado (OLIVE; BANATH 2006). Além disso, testes genotoxicidade *in vivo*, como os aqui realizados com células somáticas de *D. melanogaster* são, em geral, considerados mais específicos que os testes *in vitro* (BOLOGNESI et al. 2017). O Ensaio Cometa é útil para detectar quebras de fita simples do DNA que não foram reparadas até a etapa da lise da membrana celular. Além disso, pode ser usado para estudos de reparo de DNA, fornecendo informações importantes sobre a cinética e tipo de lesão reparada, embora seja incapaz de inferir a confiabilidade ao processo de reparo (GLEIT et al. 2016).

Nos resultados do Ensaio cometa aqui apresentados, o dano no DNA foi dependente da concentração testada dos extratos vegetais de ambas as plantas, em todas as doses (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0 mg/mL), todas significativamente superiores ao controle negativo. No teste SMART, que avalia os danos estabelecidos, ou seja, após passarem por sistema de reparo celular, todas as concentrações testadas apresentaram aumento significativo nas frequências de pequenas e grandes manchas de pelos mutantes, em relação ao controle negativo. Houve efeito dose-dependentes (efeito crescente de mutação à medida que a dose dos extratos administrados também aumentou) e ocorrência preponderante de eventos de mutação, em relação ao efeito de recombinação.

De acordo com Cavalcante et al. (2006) as plantas apresentam defesas químicas contra microorganismos e herbívoros por meio de substâncias decorrentes de seu metabolismo primário e secundário, como os alcalóides, flavonóides, saponinas, taninos e terpenos. Estes, por sua vez, possuem diversos efeitos, como repelente, deterrente alimentar, inibidor de crescimento e efeito tóxico.

As análises fitoquímicas do decocto das folhas de *M. urundeuva* realizadas aqui por UPLC-ESI-qTOF-MS/MS identificaram a presença galotaninos, fenóis, flavonoides e flavonoides glicosilados, corroborando trabalhos anteriores descritos na literatura. Em análises da composição química da decocção a seco de folhas de *M. Urundeuva*, realizada por Aquino et al. (2019), os autores demonstraram a presença de 24 metabólitos secundários, principalmente ácidos fenólicos simples e seus ésteres, flavonoides, flavonoides glicosilados e galotaninos. Resultados semelhantes foram obtidos com extratos hidroalcoólicos de folhas de *M. urundeuva* por Silva et al. (2011) e

Resende et al. (2015). Geralmente, a presença de derivados do ácido gálico, galotaninos e flavonóides em decoctos é uma informação importante sobre a segurança e possíveis atividades biológicas relacionadas.

A caracterização química do decocto das folhas de *Sideroxylon obtusifolium* por UPLC-ESI-qTOF-MS/MS aqui realizadas, demonstrou presença de fenóis, saponinas e flavonoides glicosilados, sendo os dois últimos os principais compostos encontrados. Esses achados estão de acordo com dados apresentados na literatura (ARAÚJO-NETO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012). Araújo-Neto et al. (2010), em estudos de caracterização fitoquímica, demonstram que o extrato etanólico da casca interna de *S. obtusifolium* contém flavonóis, flavanonas, fenóis, saponinas, taninos, esteroides, triterpenos e xantonas. Oliveira et al. (2012) encontraram no extrato EtOH das folhas de *S. obtusifolium*, analisados por HPLC-DAD/MS, tanto saponinas quanto flavonoides como seus principais constituintes.

As saponinas encontradas nos vegetais apresentam diversos efeitos biológicos e funcionais nos sistemas biológicos, como o corpo animal, difíceis de serem esclarecidos, provavelmente, devido ao amplo número de saponinas com estruturas químicas semelhantes e à complexidade dos metabolismos celulares (FRANCIS et al. 2002). De acordo com Taiz e Zeiger (2004) as saponinas são terpenóides encontrados em espécies vegetais, caracterizadas por sua solubilidade e ação tóxica. Segundo Mello e Silva-Filho (2002) os taninos inativam enzimas digestivas e criam um complexo de taninos e proteínas de difícil digestão, diminuindo o crescimento e sobrevivência de insetos.

Para Galati e O'brien (2004), os flavonoides, incluindo as isoflavonas, são encontrados em diversos suplementos presentes na dieta, bem como os fenóis, que possuem estruturas e propriedades farmacológicas semelhantes. Segundo os autores, a ingestão de megadoses prolongadas de flavonóides e isoflavonas podem causar efeitos indesejáveis, uma vez que, por meio de oxidação por peroxidases, os flavonóides com anel fenol produzem radicais de fenoxila citotóxicos, co-oxida lipídios insaturados, GSH, NADH e ácidos nucleicos, além espécies reativas de oxigênio (ROS) e toxicidade mitocondrial (GALATI et al., 1999, 2000).

Sousa et al. (2003), em estudos com extratos de plantas com alto teor de tanino, mostraram ausência de genotoxicidade e efeito antigenotóxico no teste de Ames em *Salmonella typhimurium*. Duarte et al. (1999) demonstraram que o efeito genotóxico gerado pelo café instantâneo, no teste de Ames, estão associados ao seu conteúdo fenólico. No entanto, Abraham (1994) e Nagpal e Abraham (2019) relataram no mesmo produto efeito antigenotóxico e antimutagênico no teste da asa de *D. melanogaster* e em micronúcleos de camundongos (ABRAHAM, 1989; GERIYOL et al. 2015).

Embora a presença de derivados do ácido fenólico e flavonóides em plantas medicinais e seus derivados sejam considerados benéficos, devido à sua atividade antioxidante e outras

propriedades biológicas, muitos estudos relataram a toxicidade desses compostos quando ingeridos em níveis mais altos do que os encontrados em uma dieta vegetariana típica (DUTHIE et al. 1997; SKIBOLA E SMITH 2000; HOBBS et al. 2015). Compostos formados por ácidos tânico, ácidos elágico, gálico e flavonóides mostraram genotoxicidade em *S. typhimurium*, em *D. melanogaster*, na linhagem celular B14 de hamster e também em linfócitos humanos (LEHMANN et al. 2000; LABIENIEC; GABRYELAK 2003; BUYUKLEYLA et al. 2012; HOBBS et al. 2015).

Estes efeitos genotóxicos podem estar associados à ingestão de grandes quantidades de chás de ervas ricas em taninos (KAPADIA et al. 1983; OTERDOOM 1985). Lu et al. (2013) demonstraram que o galato de epigallocatequina, o flavonóide mais abundante encontrado no chá verde e frequentemente usado como um suplemento antioxidante, aumentou o risco de câncer de pulmão e pele humana ao induzir morte celular e danos ao DNA, através de um mecanismo redutor.

Em estudo de revisão realizado por Sponchiado et al. (2016) para valiar a genotoxicidade de plantas medicinais, foram avaliados 458 artigos publicados entre 2000 e 2015, e destes, mais de um quarto (28,4%) relatou resultados positivos para efeitos genotóxicos, mostrando a importância da abordagem estudos que avaliem os efeitos tóxicos-genéticos de medicamentos a base de plantas.

De acordo com os achados genotóxicos e mutagênicos aqui apresentados para o decocto de folhas de *M. urundeuva* e os anteriores descrito na literatura como os resultados apresentados por Oliveira (2013), há toxicidade *in vitro* e ações estrogênica e antiestrogênica nas doses 125 mg/kg e 1000 mg/kg em ratas Wistar. Almeida et al. (2010) em estudos de toxicidade pré-clínico agudo por 14 dias em camundongos indicou toxicidade nas doses 0,31 mg administrada por via intraperitoneal do extrato hidroalcoólicos das folhas de *M. urundeuva*. No entanto, Resende et al. (2015), por meio do teste de Ames demonstrou que os extrato hidroalcoólico de *M. urundeuva*, não apresentaram efeito mutagênico, mas sim, efeito protetor contra diferentes mutágenos.

Os resultados aqui apresentados demonstram que as doses testadas do decocto das folhas de *M. urundeuva* e *S. obtusifolium* não apresentaram toxicidade materna em ratas Wistar, quando administrado por via oral, e não geraram malformações esqueléticas nos descendentes. Os parâmetros maternos avaliados, tais como sinais clínicos de toxicidade, ganho de massa corporal e consumo de água e alimentos, permitem uma avaliação eficaz da integridade da homeostase materna (ALMEIDA, 2000). Segundo Chahoud et al. (1999), a redução do ganho de peso corpóreo, ocorrência de óbitos maternos durante o período de tratamento, a redução do consumo de água e/ou ração, aparecimento de sinais clínicos e alterações no peso e/ou morfologia dos órgãos indicam a toxicidade materna.

O ganho ponderal de massa corpórea e o consumo de água e ração são importantes índices da saúde geral do animal, sendo assim, a diminuição destes parâmetros durante a administração de

um composto são fortes indicadores de toxicidade (JAHN; GÜNZEL, 1997). Sendo assim, pode-se considerar que os extratos de *M. urundeuva* e *S. obtusifolium* não apresentaram toxicidade materna em ratas Wistar prenhes, evidenciado pela baixa influência nos parâmetros ponderais nas condições experimentais testadas (MEDEIROS et al., 2014)

Oliveira et al. (2016) demonstraram ausência de alterações comportamentais visíveis com o extrato etanólico das folhas de *M. urundeuva* nas doses 125, 250, 500 e 1000 mg/kg, bem como manutenção do ganho de peso ao longo do período independentes de ser um grupo tratado ou controle. Também não houve diferença significativa entre os grupos avaliados quanto ao consumo de água e ração. As ratas tratadas não apresentaram alterações sistêmicas ou sobre seu ciclo estral, por um período de 28 dias.

Ainda de acordo com Oliveira et al. (2016), o extrato etanólico das folhas de *M. urundeuva* nas doses 125, 250, 500 e 1000 mg/kg não apresentaram alterações macroscópicas visíveis nos órgãos coração, pulmão, rins, adrenais, baço, fígado. A massa relativa dos órgãos também não diferiu entre os grupos tratados e controle, com exceção das adrenais dos animais tratados na dose de 125 mg/kg, que demonstraram um aumento significativo em relação ao grupo controle. Por outro lado, Carlini et al. (2013) demonstraram efeito tóxico da decocção da casca do caule de *M. urundeuva* administrado cronicamente por 61 dias nas doses 13,8 e 138 mg/kg, além de malformações esqueléticas nos descendentes das ratas tratadas durante a prenhez.

O estudo realizado por Pereira et al. (2013) demonstrou que o extrato etanólico da casca de *S. Obtusifolium*, nas doses de 200 e 400 mg/kg, diminuiu a atividade da mieloperoxidase induzida pela Ciclofosfamida no tecido da bexiga, mas causou efeito tóxico por meio da lipoperoxidação neste tecido, bem como no baço. Anos depois, Pereira et al. (2016) identificaram na fração *n*-butanol de folhas de *S. obtusifolium* atividade antifúngica frente a *Candida albicans*, além de atividade citotóxica *in vitro* em macrófagos murine e queratinócitos humanos. Ruela et al. (2011) demonstraram efeito tóxico da fração de acetato de etila da casca do caule de *S. obtusifolium*, por meio de teste de toxicidade aguda em camundongos com DL₅₀ de 777 mg/kg administrado por via intraperitoneal. Bobach et al. (2014) indicaram que o extrato de acetato de etila de *S. obtusifolium* exibiu atividade antiandrogênica demonstrada pela citotoxicidade de células LNCaP sob a influência da testosterona.

Os resultados aqui apresentados abrem novas perspectivas de estudos na área de genotoxicidade, toxicidade reprodutiva e teratogênese de plantas medicinais. E demonstram que as plantas *Myracrodruon urundeuva* e *Sideroxylon obtusifolium* e oferecem risco ao seu uso seguro, uma vez que os resultados dos diversos estudos apresentam controvérsias em relação ao potencial de toxicidade destas plantas.

6 CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico dos decoctos de *M. urundeuva* demonstrou a presença de galotaninos, fenóis, flavonoides simples e glicosilados no decocto de *M. urundeuva*, e de saponinas triterpênicas e flavonoides glicosilados no decocto de *S. obtusifolium*.

Apesar de não tóxicos para as moscas adultas, ambos os decoctos foram genotóxicos para células somáticas de *D. melanogaster* em todas as concentrações testadas. Os decoctos induziram eventos mutagênicos, avaliados pelo teste SMART. No geral, os resultados permitem dizer que os decoctos de folhas de *M. urundeuva* e *S. obtusifolium*, são agentes genotóxicos e mutagênicos, capazes de gerar mutações de pontos ou mutações cromossômicas, nas condições experimentais deste estudo.

No entanto, os decoctos testados em ratas Wistar prenhes não apresentaram toxicidade materna e/ou fetal.

Desta forma, mais estudos sobre os potenciais riscos dos decoctos de folhas de *M. urundeuva* e *S. obtusifolium* em outros organismos modelo *in vivo* e outras metodologias experimentais são necessários para garantir sua segurança de uso.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. K. Antigenotoxicity of coffee in the drosophila assay for somatic mutation and recombination. **Mutagenesis**, v. 9, n.4, p. 383–386, 1994.
- ABRAHAM, S. K. Inhibition of in vivo genotoxicity by coffee. **Food Chem Toxicol**, v. 27, n.12, p.787–792, 1989.
- ACIOLE, E.H.P.; GUIMARAES, N.N.; SILVA, A.S.; AMORIM, E.M.; NUNOMURA, S.M., GARCIA, A.C.L.; CUNHA, K.S.; ROHDE, C. Genetic toxicity of dillapiol and spinosad larvicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Pest Management Science**, v. 70, p. 559-565, 2014.
- ADAMS, M.D.; CELNIKER, S.E.; HOLT, R.A.; EVANS, C.A.; GOCAYNE, J.D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**. v. 287, n. 5461, p. 2185-2195, 2000.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.114-40, 2007.
- ALBUQUERQUE, U.P. et al. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 76-91, 2007.
- ALBUQUERQUE, UP.; NUNES, AT.; ALMEIDA, ALS.; ALMEIDA, CMAD.; LINS NETO et al. **Caatinga: biodiversidade e qualidade de vida**. Bauru/SP, Canal 6, 2010.
- ALEXANDRE, R. F.; BAGANTINI, F.; SIMÕES, C. M. O. Interactions between pharmaceuticals and herbal medicines or *Ginko Ginseng* herbal. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 117-126, 2008.
- ALIVERTI, V.; BONANOMI, L.; GIAVINI, E.; LEONE V,G.; MARIANI, L. The extent of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. **Teratology**, v. 20, p. 237–242, 1979.
- ALLOCCA, M; ZOLA, S; BELLOSTA, P. The fruit fly, *Drosophila melanogaster*: Modeling of human diseases (part II). In: Perveen FK, editor. *Drosophila melanogaster* - Model for recent advances in genetics and terapeutics. **London, U.K.: InTech**. 56, pp. 131–1, 2018.
- ALMEIDA, A. C.; SOBRINHON, E. M.; PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R.; COSTA, J. P. R. Acute toxicity of leaf hydroalcoholic extracts of *Lippia sidoides*, *Myracrodruon urundeuva*, *Stryphnodendron adstringens* and of *Caryocar brasiliense* administered by intraperitoneal route. **Ciência Rural**, v. 40, n.1, p.200-203, 2010.
- ALMEIDA, F. C. G.; LEMONICA, I. P. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 53-60, 2000.
- ALMEIDA, J.M, **Embriologia veterinária comparada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- ALMEIDA, M.C. S. et al. Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p.1877-1881, 2010.

AMORIM, E.M. **Estudo da mutagenicidade de metabólitos secundários liquênicos, utilizando o teste SMART e Ensaio cometa em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

ANDRADE, H.H.R.; LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In: Ribeiro, L, R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. **Mutagênese Ambiental**, 1ª ed, Canoas, editora: ULBRA, p. 281- 307, 2003.

ANDRADE, M.W. et al. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n.1, p.174-180, 2000.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **Brasília. ALP, H**, p. 970-975, 2013.

AQUINO, N.C.; QUEIROZ, E.F.; MARCOURT, L.; FREITAS, L.B.N.; ARAÚJO, E.V.O. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the decoction from leaves of a cultivated specimen of *Myracrodruon urundeuva*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.30, n. 8, p. 1616-1623, 2019.

AQUINO, P. E. A., MAGALHÃES, T. R., NICOLAU, L. A. D., LEAL, L. K. A. M., AQUINO, N. C., SANTOS, S. M., VIANA, G. S. B. The anti-inflammatory effects of N-methyl-(2S, 4R)-trans-4-hydroxy-l-proline from *Syderoxylon obtusifolium* are related to its inhibition of TNF-alpha and inflammatory enzymes. **Phytomedicine**, v. 24, p.14-23, 2017.

ARAÚJO, C.R.F., SANTIAGO, F.G., PEIXOTO, M.I., OLIVEIRA, J.O.D., COUTINHO, M.S. Use of medicinal plants with teratogenic and abortive effects by pregnant women in a city in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 38, n.3, p.127-131, 2016.

ARAÚJO-NETO, V. et al. Therapeutic benefits of *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. ex Roem. & Schult.) TD Penn., Sapotaceae, in experimental models of pain and inflammation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 933-938, 2010.

ATSAMO, A.D., NGUELEFACK, T.B., DATTÉ, J.Y., KAMANYI, A. Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) in rodents. **Journal of Ethnopharmacology** v. 134, p. 697-702, 2011.

ATSUNAMI, K.M., TSUKA, H.O. Structural Revisions of Blumenol C Glucoside and Byzantionoside B. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.58, p.438–441, 2010.

AZQUETA A.; COLLINS A.R. The essential Comet Assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of Toxicology**, v. 87, p. 949-968, 2013.

BATTISTI, C.; GARLET, T. M. B.; L. ESSI, L.; HORBACH, R. K. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, p. 338–348, 2013.

BELTRÃO, A.E; TOMAZ, A.C; BELTRÃO, F.A; MARINHO, P. *In vitro* biomass production of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem & Schult). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, V. 18, p 696-698, 2008.

BIESKI, I.G.C. **Plantas medicinais e aromáticas no sistema único de saúde da região sul de Cuiabá-MT**. Monografia (Especialização em Plantas Medicinais) – UFLA, Lavras, Minas Gerais 92f. 2005.

BOBACH, C.; SCHURWANZ, J.; FRANKE, K.; DENKERT, A.; VAN SUNG, T.; KUSTER, R., WESSJOHANN, L. A. Multiple readout assay for hormonal (androgenic and antiandrogenic) and cytotoxic activity of plant and fungal extracts based on differential prostate cancer cell line behavior. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n.1, p. 721-730, 2014.

BOLOGNESI, C; CASTOLD, A.F; CREBELLI, R; BARTHÉLÉMY, E; MAURICI, D; WÖLFLE, D; VOLK, K.; CASTLE, L. Genotoxicity of the *Myracrodruon urundeuva* for the safety assessment of substances used in food contact materials prior to their authorization in the European Union. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 58, p. 361–374, 2017.

BOULLATA, J. I; PHARM, D; NACE, A. M; PHARM, D. Safety issues with herbal medicine. **Pharmacotherapy**, v. 20, p.257–269, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 136 p. : il. – (Série C. Projetos, Programas e Relatórios).

CARDOSO, M.N.; SANTOS, A.L.P.; ALVES, M.V.; VALADARES, B.L.B. Avaliação de amostras de própolis vermelha do estado de Sergipe (Brasil) pelo Teste de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster*. **Scientia Plena**, v. 11, p. 1-8, 2015.

CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; RODRIGUES, E.; TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiacaceae (aroeira-do-sertão). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 140-146, 2010.

CARLINI, E.A., DUARTE-ALMEIDA, J.M., TABACH, R. Assessment of the toxicity of the brazilian pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira-do-sertão). **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 692-698, 2013.

CARMONA, E.R.; CREUS, A.; MARCOS, R. Genotoxicity testing of two lead-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 724, p. 35-40, 2011.

CARMONA, E.R; ESCOBAR, B; VALES, G; MARCOS, R. Genotoxic testing of titanium dioxide anatase nanoparticles using the wing-spot test and the comet assay in *Drosophila*. **Mutation Research**, v. 778, p. 12-21, 2015.

CARVALHO, M. S.; OLIVEIRA, D. A. Estudo da atividade citotóxica de *Myracrodruon urundeuva* FR. Allemão. **Revista Eletrônica de Biologia**, v.5, n.3, p. 1-7, 2012.

- CAVALCANTE, G.M.; MOREIRA, A.F.C.; VASCONCELOS, S.D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 9-14, 2006.
- CHAHOU, I.; LIGENSA, A.; DIETZEL, L., FAQI, A.S. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reproductive Toxicology**, v.13, p. 375-381, 1999.
- CHEN, H.Y., LIU, J.F., TSAI, S.F., LIN, Y. L., LEE, S.S. Cytotoxic protobassic acid saponins from the kernels of *Palaquium formosanum*. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n.2, p.557-564, 2018.
- COLLINS A.; et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutation Research** v. 759, p. 27-39, 2014.
- COLLINS A.R., et al. The Comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143-151, 2008.
- COOPER, R.I.; GOLDMAN, J.M; VANDENBERGH, J.G. Monitoring of the estrus cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. **Female Reproductive Toxicology**, v. 3, p. 45-56, 1993.
- COSTA, K.C.S. et al. Medicinal plants with teratogenic potential: current considerations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 427-433, 2012.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORDC, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v.26, p. 1001-1043, 2009.
- CUNHA, K.S., REGULY, M.L., GRAF, U., ANDRADE, H.H.R. Taxanes: The genetic toxicity of paclitaxel and docetaxel in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutagenesis**, v. 16, p.79-84, 2001.
- DAMASCENO, D.C. et al. **Anomalias congênitas: estudos experimentais**. Belo Horizonte: Coopmed, 2008.
- DANTAS, I.C; GUIMARÃES, F.R. Plantas medicinais comercializadas no município de Campina Grande, PB. **Revista de Biologia e Farmácia**, v.1, n.1, p. 150-155, 2007.
- DARUICH, J.; ZIRULNIK, F.; GIMENEZ, M.S. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats on their fetuses. **Environmental Research Section**, v.85, p. 226-231, 2001.
- DEBBIEA, S; GRAEME, L; PIERREC, D; ELIZABETHD, W; KELVIN, C. Pharmacovigilance of herbal medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 3, p. 513–518, 2012.
- DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic aproroach**. John Wiley & Sons LTD, 2° ed., p.291-300. 2002.
- DIAS, C.D. **Efeito protetor do Betacaroteno contra a ação genotóxica da doxorrubicina, em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica), Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

- DOKE, S.K.; DHAWALE, S.C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, p. 223–229, 2015.
- DUARTE, M.P; LAIRES, A; GASPAR, J; LEÃO, D; OLIVEIRA, J.S; RUEFF, J. Genotoxicity of instant coffee: Possible involvement of phenolic compounds. **Mutation Research**, v. 442, n.1, p. 43-51, 1999.
- DUTHIE, S.J; JOHNSON, W; DOBSON, V.L. The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells. **Mutation Research**, v.390, n.1–2, p.141–151, 1997.
- EKOR, M. The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Pharmacology**, v.4, n.177, p.1–10, 2013.
- EMA - European Medicines Agency. 2008. Guideline on the assessment of genotoxicity of herbal substances/preparations. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientificguideline/guidelineassessment-genotoxicity-herbal-substances/preparations_en.pdf. Accessed 17 April 2019.
- EREN, Y AND ÖZATA A. Determination of mutagenic and cytotoxic effects of *Limonium globuliferum* aqueous extracts by *Allium*, Ames, and MTT tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p 51-59, 2014.
- FANK-DE-CARVALHO, S.M.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Arquitetura, anatomia e histoquímica das folhas de *Gomphrena arborescens* L. F. (Amaranthaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 377-390, 2005.
- FIELD, J.A; LETTINGA, G. Toxicity of tannic compounds to microorganisms. FREI, H. *et al.* The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 279, p.21-33, 1992.
- FIGUEREDO, F. G.; LOPES, J.; CAVALCANTE, M.; SANTOS, F.; AGUIAR, J.; MATIAS, E. *et al.* Caracterização química e avaliação da atividade antifúngica e antioxidante do extrato etanólico de *Myracrodruon urundeuva* All. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 6, p.111-118, 2019.
- FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition [online]**, v.88, p. 587 605, 2002.
- FREI, H., WURGLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive results. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308, 1988.
- GADELHA, C.S.; PINTO JUNIOR, V.M.; BEZERRA, K.K.S.; PEREIRA, B.B.M.; MARACAJÁ, P.B. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista Verde**, v. 8, n. 5, p. 208-212, 2013.
- GAIVÃO, I.; SIERRA, M. *Drosophila* comet assay: insights, uses, and future perspectives. **Frontiers in Genetics**, v.5, article 304, 2014.

GALATI, G.; CHAN, T.; WU, B.; O'BRIEN, P. J. Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 12, p.521 – 525, 1999.

GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 287-303, 2004.

GALATI, G.; TENG, S.; MORIDANI, M. Y.; CHAN, T. S.; O'BRIEN, P. J. Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. **Drug Metab. Drug Interact.**, v.17, p.311 – 349, 2000

GEHRKE, I.T.S. et al. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 486-491, 2013.

GERIYOL, P; BASAVANNEPPA, H.B; DHANANJAYA, B.L. Protecting effect of caffeine against vinblastine (an anticancer drug) induced genotoxicity in mice. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 38, n.2, p.188–195, 2015.

GLEI, M; SCHNEIDER, T; SCHLÖRMANN, W. Comet assay: An essential tool in toxicological research. **Archives of Toxicology**, v. 90, p.2315–2336, 2016.

GODSCHALK, R.W.; et al. DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: an inter-laboratory comparison within the European Comet assay validation group (ECVAG). **Mutation Research**, v. 757, p. 60-67, 2013.

GOMES, R.; PINHEIRO, M.C.B.; LIMA, H.A. Fenologia reprodutiva de quatro espécies de Sapotaceae na restinga de Maricá, RJ. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 4, p.679-687, 2008.

GRAF, U. et al. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, n. 2, p. 153-188, 1984.

GLADSTONE, M.; SU, T.T. Chemical genetics and drug screening in *Drosophila* cancer models. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 38, p. 497-504, 2011.

HOBBS, C.A; SWARTZ, C; MARONPOT, R; DAVIS, J; RECIO, L; KOYANAGI, M; HAYASHI, S. Genotoxicity evaluation of the flavonoid, myricitrin, and its aglycone, myricetin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 283-292, 2015.

HORAI, H.; ARITA, M.; KANAYA, S.; NIHEI, Y.; IKEDA, T. et al. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal of Mass Spectrometry**, v.45, n.7, p.703-14. 2010.

JAISWAL, R., JAYASINGHE, L., KUHNERT, N. Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the *Rhododendron* genus (Ericaceae) by tandem LC–MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47(4), p.502-515, 2012.

JAHN, A.I.; GÜNZEL, P.K.H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment. **Reproductive Toxicology**, v.11, n.2/3, p.171-178, 1997.

JIANG, Y., LIU, R., CHEN, J., LIU, M., LIU, M., LIU, B., LIU, S. Application of multifold characteristic ion filtering combined with statistical analysis for comprehensive profiling of chemical constituents in anti-renal interstitial fibrosis I decoction by ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1600, p.197-208, 2019.

KAPADIA, G.J; RAO, G.S; MORTON, J.F. Herbal tea consumption and esophageal cancer. In: Stich HF, editor. **Carcinogens and Mutagens in the Environment**. Boca Raton, FL: CRC Press, V. 3. pp. 3–12,1983.

KASTENBAUM, M.A.; BOWMAN, K.O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, **Mutation Research**, v 9, p. 527-549, 1970.

KATAOKA, H., OHNISHI, N. Occurrence of taurine in plants. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, n.7, p.1887-1888, 1986.

KAYA, B., CREUS, A., VELÁSQUEZ, A., YANIKOGLU, A., MARCOS, R. Genotoxicity is modulated by ascorbic acid studies the wing spot test in *Drosophila*. **Mutation Research**, v. 520, p. 93-101,2002.

KELLEY, C.J., HARRUFF, R.C., CARMACK, M. The Polyphenolic acids of *Lithospermum ruderale*. II. Carbon-13 nuclear magnetic resonance of lithospermic and rosmarinic acids. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 41, p.449–455, 1976.

KULKARNI, A., SUZUKI, S., ETOH, H. Antioxidant compounds from *Eucalyptus grandis* biomass by subcritical liquid water extraction. **Journal of Wood Science**, v 54, p. 153-157,2008
LABIENIEC, M; GABRYELAK, T. Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14. **Mutation Research**, v. 539, p. 127–135, 2003.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O, SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 247-262, 2010.

LEHMANN, M; GRAF, U; REGULY, M.L; ANDRADE, H.H.R. Interference of tannic acid on the genotoxicity of mitomycin C, methylmethanesulfonate, and nitrogen mustard in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 36, p.195-200, 2000.

LEITE, J.P.V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

LENZ, S., KARSTEN, P., SCHULZ, JB, VOIGT, A. *Drosophila* as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. **Journal of Neurochemistry**, v. 127, n. 4, p. 453-460, 2013.

LI, N., LIU, C., MI, S., WANG, N., ZHENG, X., LI, Y., ... & XU, X. Simultaneous determination of oleanolic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, kaempferol and quercetin in rat plasma by LC–MS–MS and application to a pharmacokinetic study of *Oldenlandia diffusa* extract in rats. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, n.10, p.885-892, 2012.

- LIMA, J.L.S.; FURTADO, D.A.; PEREIRA, J.P.G.; BARACUHY, J.G.V.; XAVIER, H.S. **Plantas Medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil**. Campina Grande: Ludigraf Editora E Gráfica, 2006.
- LOPES, E.L., NETO, M.A., SILVEIRA, E.R., PESSOA, O.D.L., BRAZ-FILHO, R. Flavonoides e sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth. **Química Nova**, v. 35, p. 2169–2172, 2012.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Plantarum, p.512, 2002.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2008.
- LU, L.Y; OU, N; LU, Q. Antioxidant induces DNA damage, cell death and mutagenicity in human lung and skin normal cells. **Scientific Reports** v. 3, 3169, 2013.
- MACEDO, J.G.F.; MENEZES, I.R.A. Analysis of the variability of therapeutic indications of medicinal species in the Northeast of Brazil: Comparative study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, ID 6769193, 2018.
- MARCH, R.E., MIAO, X.S. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 231, n. 2-3, p.157-167, 2004.
- MARCOS, R.; CARMONA, E.E. **The wing-spot and the comet tests as useful assays for detecting genotoxicity in *Drosophila***. In: DHAWAN A.; BAJPAYEE M. (eds). *Methods in Molecular Biology. Genotoxicity Assessment, Methods and Protocols*. Humana Press, Springer Nature, New York, Chapter 19, p. 337-348, 2019.
- MARCONDES, F. K; BIANCHI, F. J; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 609-614, 2002.
- MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais – Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária 2000.
- MATOS, F. J. de A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 4ª ed. Fortaleza: UFC, 2002.
- MEDEIROS, M. A.; CORREA, F. R; DANTAS, F. P.M.; SANTOS, J.R.S.; MEDEIROS R. M.T. Efeitos teratogênicos de *Prosopis juliflora* em ratos e análise da toxicidade das vagens. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.11, p1089-1093, 2014.
- MELLO, J.R.B.; LANGELOH, A. avaliação da toxidade reprodutiva e teratogenicidade. In RHODEN, E.L.; RHODEN, C.R (Eds). **Princípios e técnicas em experimentação animal**. Porto Alegre: UFRGS, p. 455-464, 2006.
- MELLO, M.O.; SILVA-FILHO, M.C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.14, p.71-81, 2002.

MENCHERINI, T. et al. HPLC-PDA-MS and NMR characterization of a hydroalcoholic extract of *Citrus aurantium* L. var. amara peel with antiedematogenic activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 8, p. 1686-1693, 2012.

MONTANARI, R. M. et al. Exposure to Anacardiaceae volatile oils and their constituents induces lipid peroxidation within food-borne bacteria cells. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9728-9740, 2012.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v.28, p.892-896, 2005.

MOON, J.H., TSUSHIDA, T., NAKAHARA, K., TERAOKA, J. Identification of quercetin 3-O- α -D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. **Free Radical Biology & Medicine**, v.30, p. 1274–1285, 2001.

MORAIS-BRAGA, M.F.B. **Prospecção Química do Extrato Etanólico das Folhas de *Lygodium venustum* Sw. (lygodiaceae) e Avaliação das Bioatividades Antioxidante, Antiepileptogênica, Antipromastigótica, Citotóxica e Antimicrobiana de Extrato e Frações (in vitro)**. Dissertação (mestrado)- Programa de Pós – Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri - 2012.

MOREIRA, D.D.L.; TEIXEIRA, S.S.; MONTEIRO, M.H.D.; OLIVEIRA, A.C.A.X.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Traditional use and safety of herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.24, p. 248-257, 2014.

MOURA, A.C.S., VILEGAS, W., SANTOS, L.C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* Linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar. **Química Nova**, v. 34, p.1136–1140, 2011.

NAGPAL, I; ABRAHAM, S.K. Coffee mitigates cyclophosphamide-induced genotoxic damage in *Drosophila melanogaster* germ cells. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 5, p.502–508, 2019.

NASCIMENTO, V. T., DE MOURA, N. P., DA SILVA VASCONCELOS, M. A., MACIEL, M. I. S., DE ALBUQUERQUE, U. P. Chemical characterization of native wild plants of dry seasonal forests of the semi-arid region of northeastern Brazil. **Food Research International**, v. 44, n.7, p.2112-2119, 2011.

NETO, F. C.; FERNANDES, F.H.A.; KOGAWA, A. C.; SALGADO, H.R.N. Antimicrobial activity of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. and Schult) T.D. Penn. (Sapotaceae). **EC Microbiology**, v.11., p. 250-256, 2017.

NISHIZAWA, M., YAMAGISHI, T., NONAKA, G., NISHIOKA, I., RAGAN, M.A. Gallotannins of the freshwater green alga *Spizogryra* Sp. **Phytochemistry**, v. 24, p. 2411–2413, 1985.

NOBRE-JÚNIOR, H.V.; OLIVEIRA, R.A.; MAIA, F.D.; NOGUEIRA, M.A.; DE MORAES, M.O.; BANDEIRA, M.A. et al. Neuroprotective effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-Hydroxydopamine-Induced cytotoxicity in rat mesencephalic cells. **Neurochem Res**, v.34, n. 6, p:1066–1075, 2009.

OECD - Organisation for Economic Cooperation and Development. **Draft OECD guideline for the testing of chemicals. Guidance no. 421. Reproduction/Developmental Toxicity Screening**

Test, Adapted July 28, 2015. Disponível em: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9715241e.pdf>. Acesso em: 17 Março 2019.

OLIVE, P.L; BANATH, J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, v.1, p. 23–29, 2006.

OLIVEIRA, A. P. et al. Metabolite profiling of the leaves of the Brazilian folk medicine *Sideroxylon obtusifolium*. **Planta Medica**, v. 78, n. 07, p. 703-710, 2012.

OLIVEIRA, A.R.S. **Estudo toxicológico reprodutivo de *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) em ratas Wistar**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

OLIVEIRA, J. M. G. **Determinação da atividade antioxidante e toxicidade *in vitro* e *in vivo* de *Myracrodruon urundeuva* Allem**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Farmacologia), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

OLIVEIRA, J. M. G., et al. Toxicidade subaguda do extrato etanólico das folhas de *Myracrodruon urundeuva* sobre o ciclo estral de ratas Wistar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 539-546, 2016.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Micro electrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, p. 291-298, 1984.

OTERDOOM, H. J. Tannin, sorghum and oesophageal cancer. **Lancet**, v. 8450, p. 330, 1985.

OUEDRAOGO, M. et al. Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 3, p. 492-512, 2012.

PANDEY, U.B; NICHOLS, C.D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 63, p. 411-436, 2011.

PEREIRA, D. S., MORAIS, J. P., SANTANA, D. G., SANTOS, C. A., THOMAZZI, S. M., et al. Effects of the ethanol extract of the inner bark of *Syderoxylum obtusifolium* in the cyclophosphamide-induced cystitis in rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.7, n.20, p 1411-1417, 2013.

PEREIRA, J. V., FREIRES, I. A., CASTILHO, A. R., DA CUNHA, M. G., ALVES, H. D. S., & ROSALEN, P. L. Antifungal potential of *Sideroxylon obtusifolium* and *Syzygium cumini* and their mode of action against *Candida albicans*. **Pharmaceutical Biology**, v.54, n.10, p. 2312-2319, 2016.

PICCINELLI, A.L. et al. HPLC-PDA-MS and NMR characterization of C-glycosyl flavones in a hydroalcoholic extract of *Citrus aurantifolia* leaves with antiplatelet activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 1574-1581, 2008.

RANGEL, C.D.F.C.B., RAMOS, M.A., AMORIM, E.L.C., ALBUQUERQUE, U.P.A. Comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n.3, p. 674-684, 2010.

RAND, M.D. Drosophotoxicology: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, p.74–83, 2010.

RESENDE, F. A; CAMPOS, D.L; SILVA, V.C; GRANDIS, R.A; SOUZA, L.P; JUNIOR, C.S.L; ROCHA, C.Q; SANTOS, L.C; VILEGAS, W; VARANDA, E.A. Mutagenicity and chemopreventive activities of *Astronium* species assessed by Ames test. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.72, p. 506–513, 2015.

RIGO, M.P. **Estudo da atividade bioantimutagênica do licopeno em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada), Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2009.

ROCHA, L.D.L.S.; FARIA, J.C.N.M.; CRUZ, A.H.S.; REIS, A.A.S.; SANTOS, R.S. *Drosophila*: um importante modelo biológico para a pesquisa e o ensino de Genética. **Scire Salutis**, v. 3, n. 1, p. 37-48, 2013.

RUELA HS, LEAL ICR, ALMEIDA MRA, SANTOS KRN, WESSJOHANN LA, KUSTER RM. Antibacterial and antioxidant activities and acute toxicity of *Brumelia sartorum*, a Brazilian medicinal plant. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, p. 86–91, 2011.

SÁ, ROBERTO A. et al. Antibacterial and antifungal activities of Myracrodruon urundeuva heartwood. **Wood Science and Technology**, v. 43, n. 1-2, p. 85-95, 2009.

SANTANA, S. L., VERÇOSA, C. J., CASTRO, I.F.A., AMORIM, E.M., SILVA, A.S. et al. *Drosophila melanogaster* as model organism for monitoring and analyzing genotoxicity associated with city air pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 32, p. 32409-32417, 2018.

SANTOS, R.T.D., HIRAMOTO, L.L., LAGO, J.H.G., SARTORELLI, P., TEMPONE, A. G., PINTO, E. G. Anti-trypanosomal activity of 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- β -D-glucose isolated from *Plectranthus barbatus* Andrews (Lamiaceae). **Química Nova**, v. 35, n.11, p.2229-2332, 2012.

SANSEVERINO, M. T. V. et al. **Manual de Teratogênese**. Editora da Universidade 556p. 2005.

SELLAMI, M.; SLIMENI, O.; POKRYWKA, A.; KUVACIĆ, G.; HAYES, L.D.; MILIC, M.; PADULO, J. Herbal medicine for sports: a review. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 15, p. 1-14, 2018.

SHARMA, A. et al. Validation and application of *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model for the detection of double strand breaks by neutral Comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 721, n. 2, p. 142-146, 2011.

SIDDIQUE, H.R; CHOWDHURI, D.K; SAXENA, D.K; DHAWAN, A. Validation of *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model for genotoxicity assessment using modified alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 20, p. 285-290, 2005

SILVA, V.C., NAPOLITANO, A., ELETTO, D., RODRIGUES, C.M., PIZZA, C., VILEGAS, W. Characterization of gallotannins from *Astronium* species by flow injection analysis-electrospray

ionization-ion trap-tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 17, p. 365–375, 2011.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M, ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SINGH, N.P.; McCOY M.T.; TICE R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SIVIERO, F.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Mutagênese Carcinogênese, In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**, 3ª ed, São Paulo, Atheneu, p.83-86, 2008.

SKIBOLA, C.F; SMITH, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology and Medicina**, v. 29, p.375–383, 2000.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M.J. Mutação, Reparo do DNA e Recombinação. In: **Fundamentos de Genética**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 14, p. 312-314, 2001.

SOUSA, E.A. et al. A new flavonoid derivative from leaves of *Oxandra sessiliflora* RE Fries. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 4, p. 704-708, 2014.

SOUSA, M. P.; MATOS, F. J. A.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, M. E. O.; MACHADO, M. I. L. **Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. 2ª ed. Fortaleza: UFC, 2004.

SOUSA, N.C; CARVALHO, S; SPANÓ, M.A; GRAF, U. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 41, n. 4, p.293-299, 2003.

SOUZA, S. M. C.; AQUINO, L. C. M.; MILACH JUNIOR, A. C.; BANDEIRA, M.A. M.; NOBRE, M. E. P.; VIANA, G. S. B. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in rodents. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 220- 225, 2007.

SOUZA, S.M.C.; AQUINO, L.C.M.; MILACH, A.C.J.; BANDEIRA, M.A.M.; NOBRE, M.E.P.; VIANA, G.S.B. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in rodents. **Phytotherapy Research**, v. 21, 220 –225, 2011.

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.

STAPLES, R.E.; SCHNELL, V.L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. **Stain Technology**, v. 39, p. 61-63, 1964.

STEPHENSON, R., METCALFE, N. H. *Drosophila melanogaster*: a fly through its history and current use. **The journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 43, n.1, p. 70-75, 2013.

SUBEKI, S., MATSUURA, H., TAKAHASHI, K., YAMASAKI, M., YAMATO, O. et al. Antibabesial and anti-plasmodial compounds from *Phyllanthus niruri*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 4, p. 537-539, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 719p, 2004.

TAKAC, M.J.M., TOPIĆ, D.V. FT-IR and NMR spectroscopic studies of salicylic acid derivatives. II. Comparison of 2-hydroxy- and 2,4- and 2,5-dihydroxy derivatives. **Acta Pharmaceutica**, v.54, p.177–191, 2004.

TEIXEIRA, A.H.; BEZERRA, M.M.; CHAVES, H.V.; VAL, D.R.; PEREIRA FILHO, S.M.; SILVA, A.A.R. Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais no município de Sobral-Ceará, Brasil. **SANARE**, v.13, n.1, p. 23-28, 2014.

TIBURI, M. et al. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 519, n. 1-2, p. 141-149, 2002.

TICKOO, S., RUSSELL, S.S. *Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery and pathway screening. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, p. 555-560, 2002.

URIOL, E. et al. Long- term biomonitoring of breast cancer patient under adjuvant chemotherapy: the comet assay as a possible predictive factor. **Mutagenesis**, v. 28, p. 39-48, 2013.

VA, D.P., SA, A.A., PAUL, S.F. Wonder animal model for genetic studies - *Drosophila melanogaster* - its life cycle and breeding methods—a review. **Sri Ramachandra Journal of Medicine**, v. 2, n.2, p.33-38, 2009.

VEIGA-JÚNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 118, n. 2, p. 308-313, 2008.

VEIGA-JÚNIOR.; V.F.; MELLO, J. C. P. The medicinal plants monographs, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 464–471, 2008.

VERÇOSA, C.J. et al. Validation of Comet assay in Oregon-R and wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, p. 148-153, 2017.

VIANA, G.S.B.; BANDEIRA, M.A.M.; MATOS, F.J. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**, v.2, p.189-195, 2003.

VIEGAS, C. Jr.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VILAR, J.B; D'OLIVEIRA, M.I.P; SDC, S; CHEN-CHEN, L. Cytotoxic and genotoxic investigation on barbatimão [d (Mart) Coville,1910] extract. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 687–694. 2010.

VOGEL, E.W., GRAF, U., FREI, H.J., NIVERD, M.M.J. The results of assay in *Drosophila* of exposure to carcinogens. **International for Research on Cancer**, v. 146, p. 427-470, 1999.

WANG, K.J., YANG, C.R., ZHANG, Y.J. Phenolic antioxidants from Chinese toon (fresh young leaves and shoots of *Toona sinensis*). **Food Chemistry**, v.101,p.365-371, 2006.

WANG, Y. et al. Hydrolyzable tannins from *Balanophora polyandra*. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3, n. 1, p. 46-50, 2013.

WILSON, J. C. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animal. In: Wilson, J.C.; Warkany. **Teratology: Principles and Techniques**, Chicago: Univ. of Chicago Press. p. 262-277, 1965.

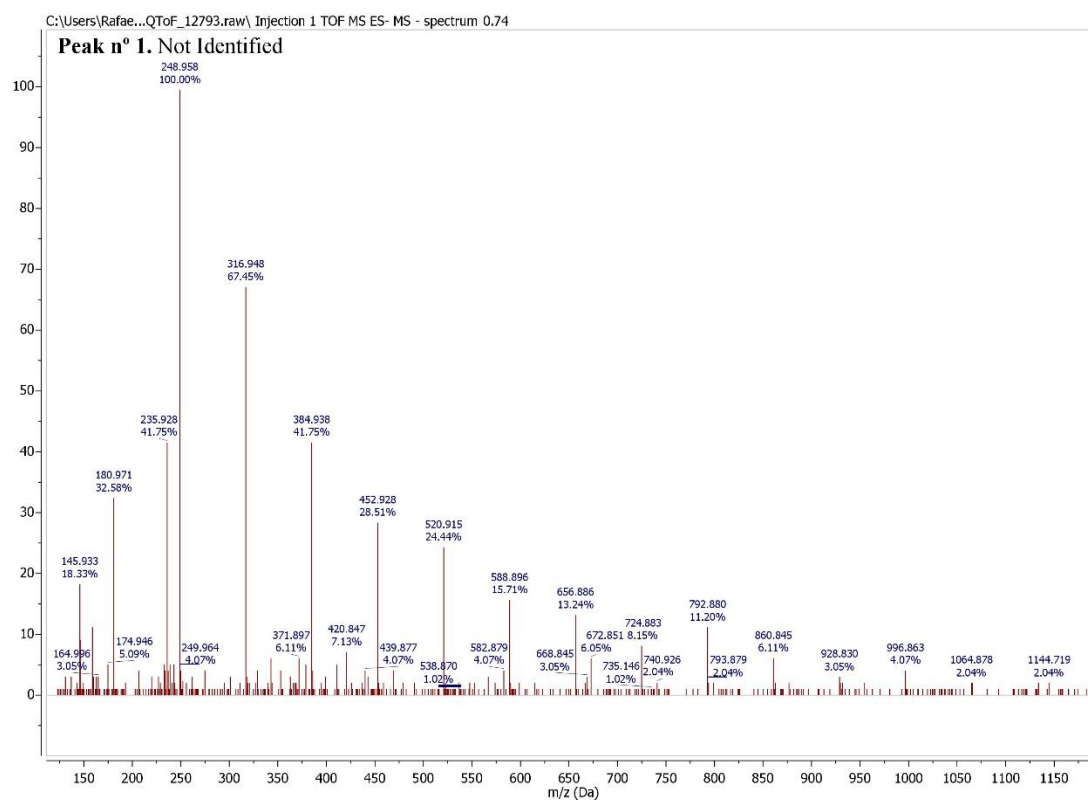
WINKLER, T. Spectral assignments and reference data: comments on “Piperidone derivative from *Dalbergia symphathetica*”. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.44,p. 571–572, 2006.

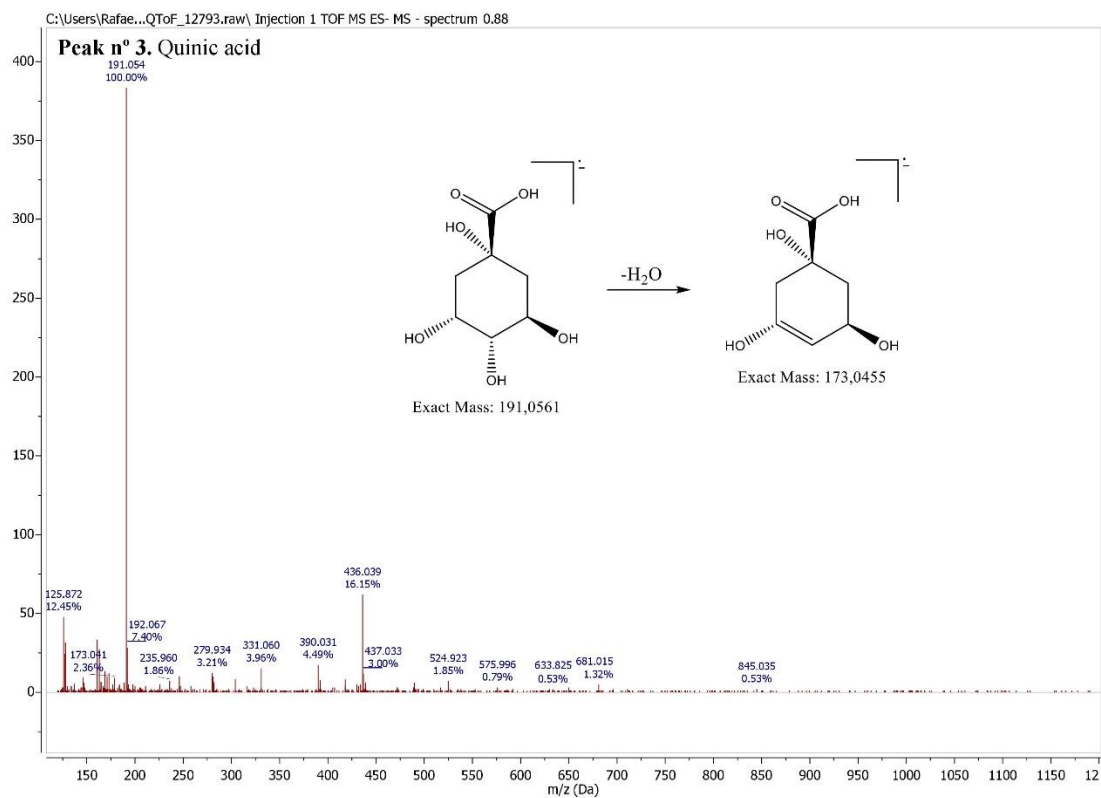
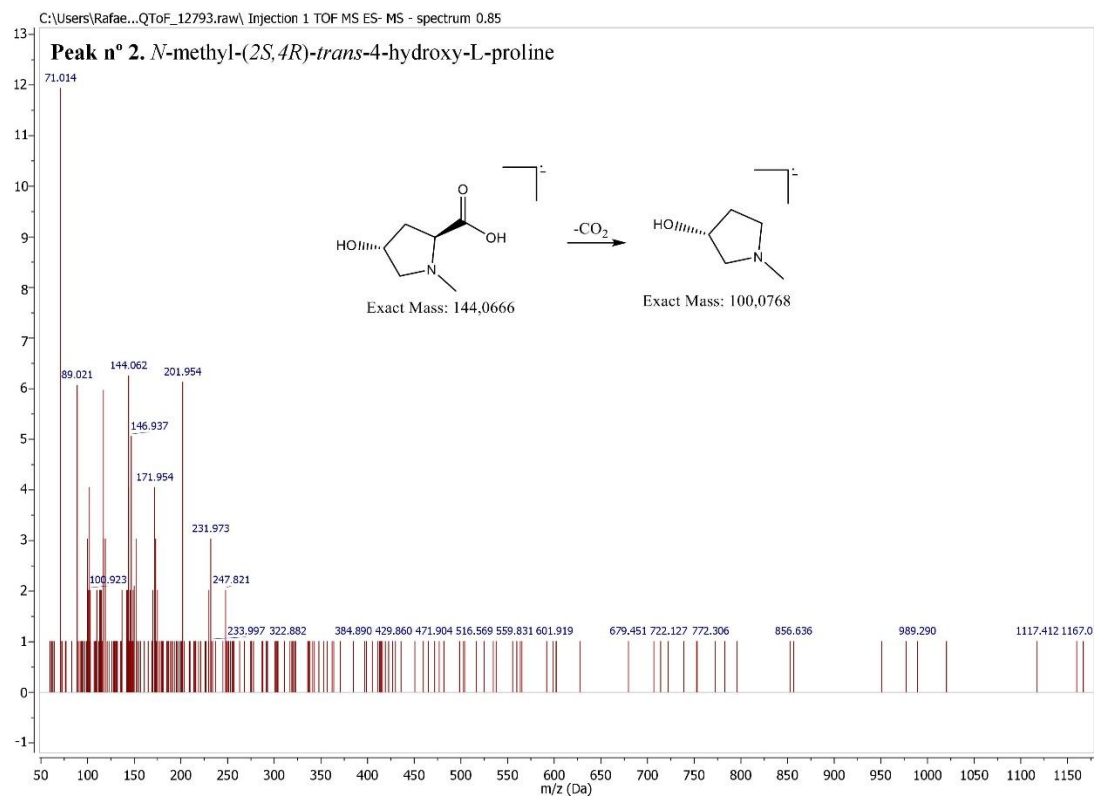
WOLDEMESKEL, M. Toxicologic pathology of the reproductive system. In: **Reproductive and Developmental Toxicology**. Academic Press, p. 1209-1241, 2017.

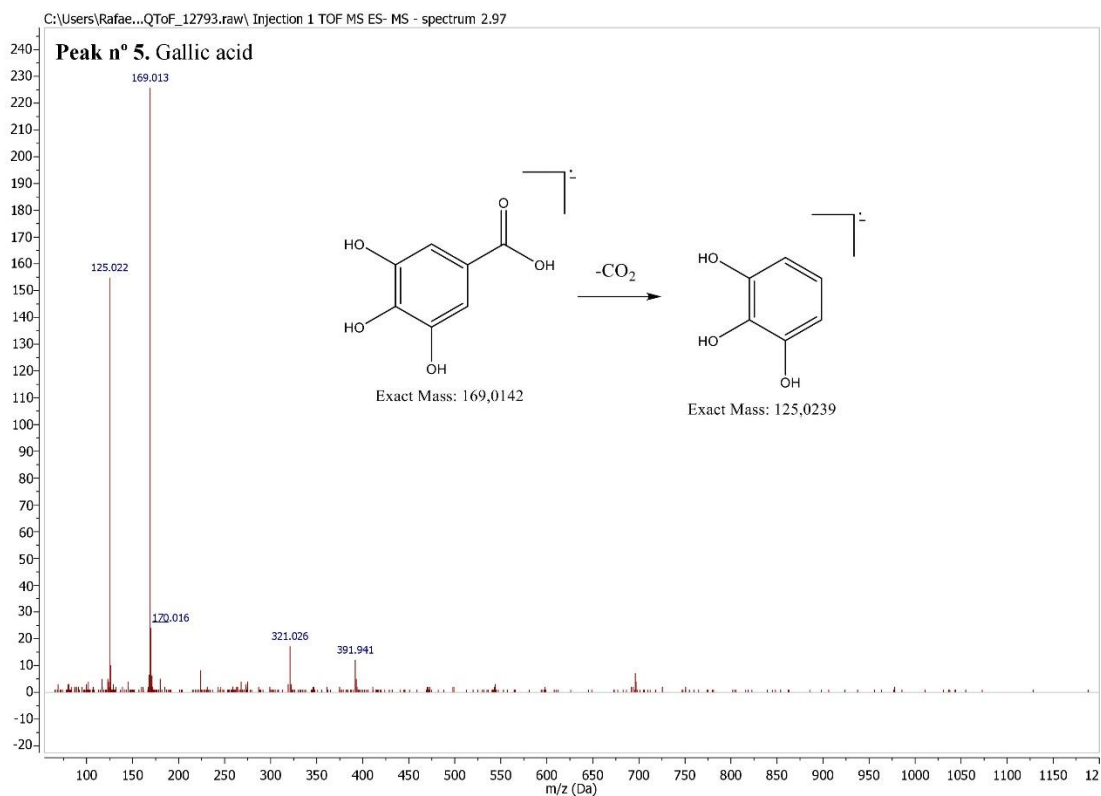
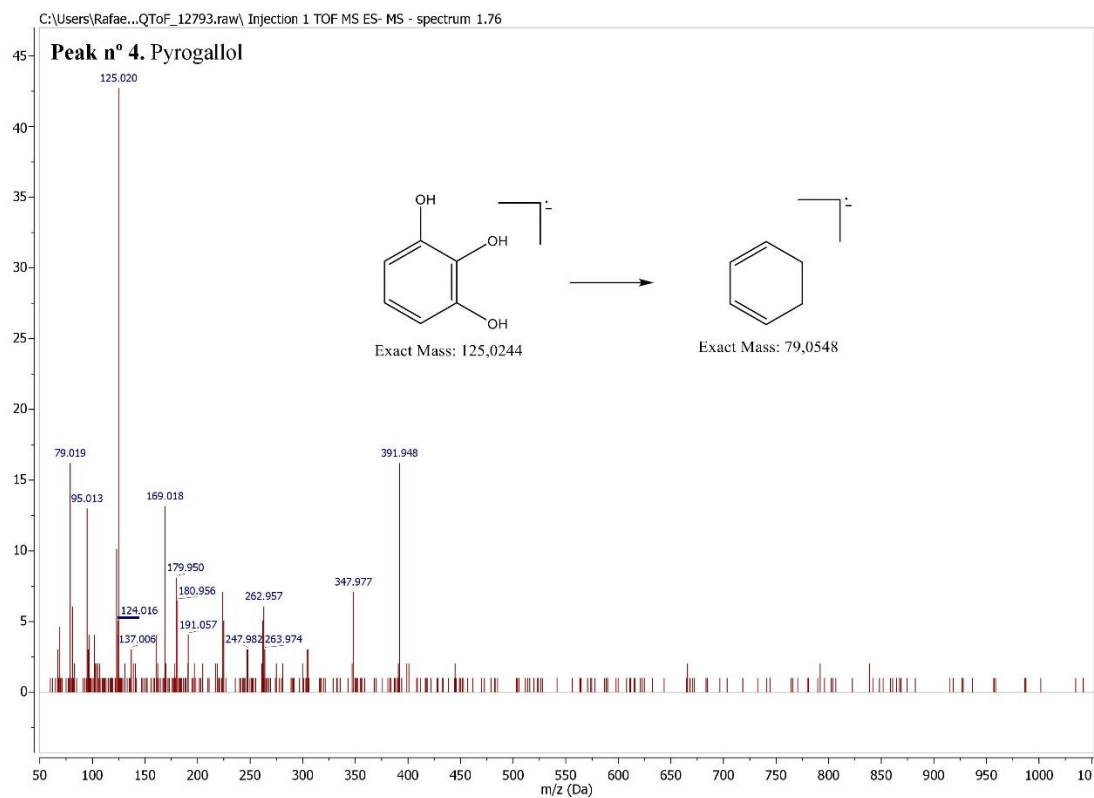
YAO, H.; CHEN, B.; ZHANG, Y.; OU, H.; LI, Y.; LI, S.; SHI, P.; LIN, X. Analysis of the total biflavonoids extract from *Selaginella doederleinii* by HPLC-QTOF-MS and it's *in vitro* and *in vivo* anticancer effects. **Molecules**, v. 22, p. 325. 2017.

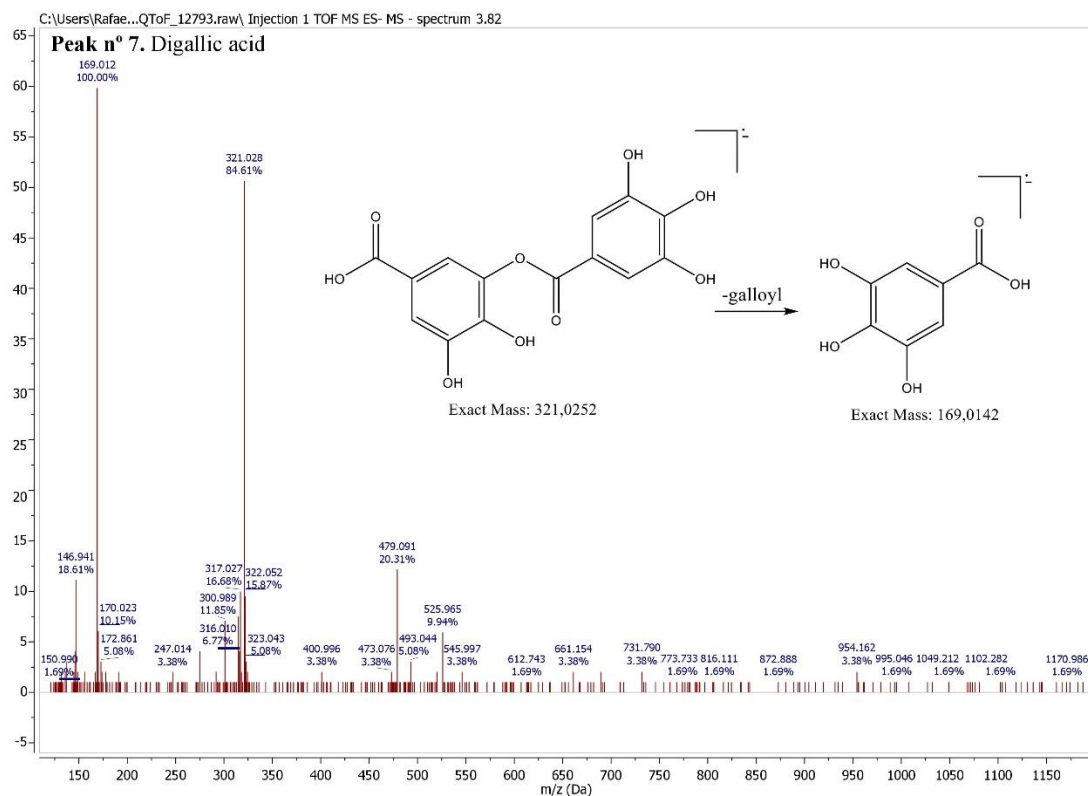
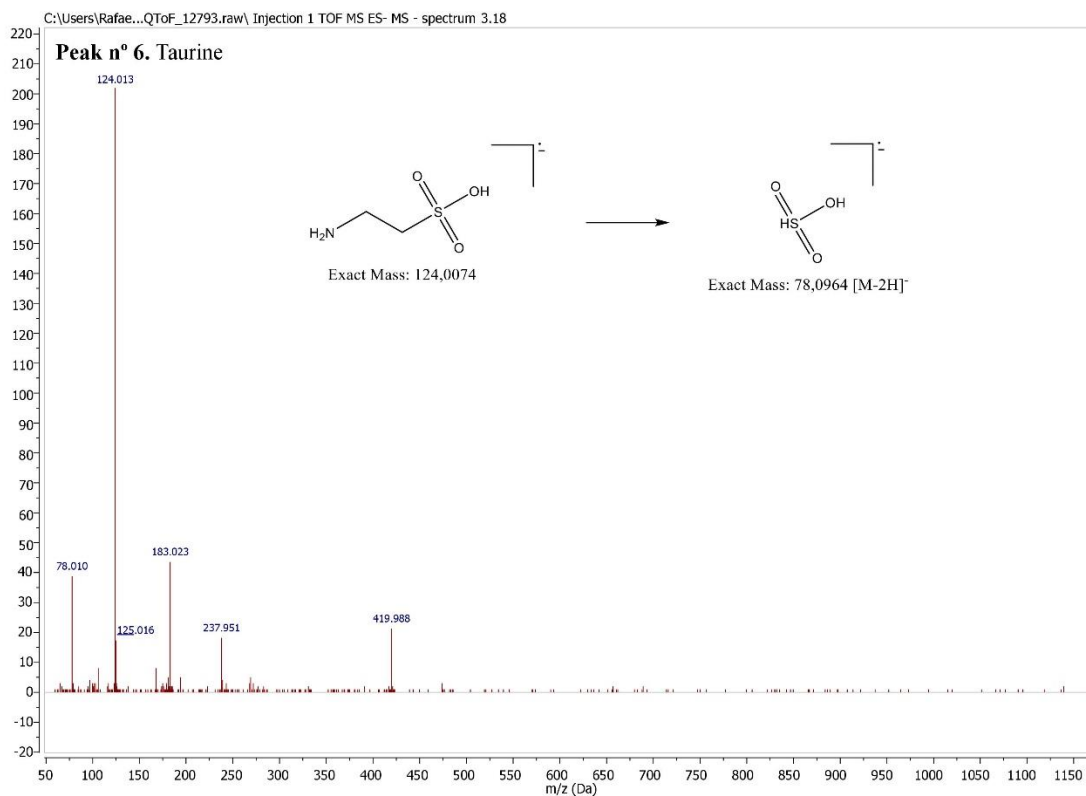
ZENI, A.L.B.; PARISOTTO, A.V.; MATTOS, G.; HELENA, E.T.S. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p.2703-2712, 2017.

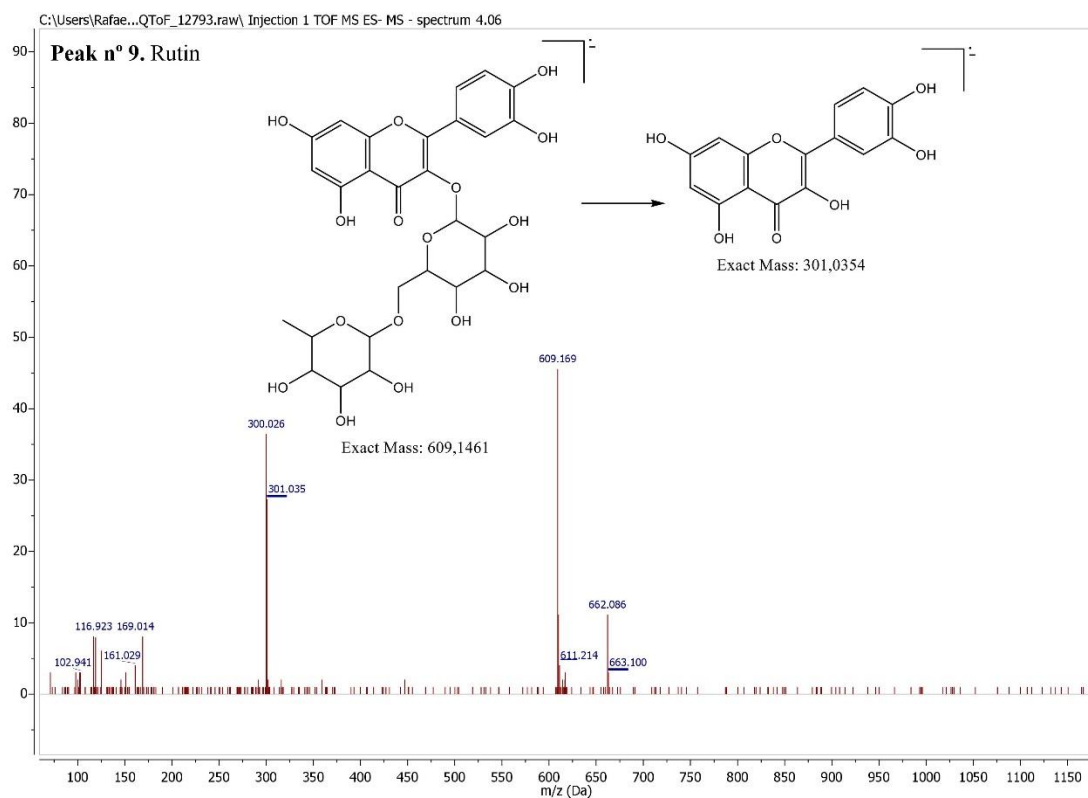
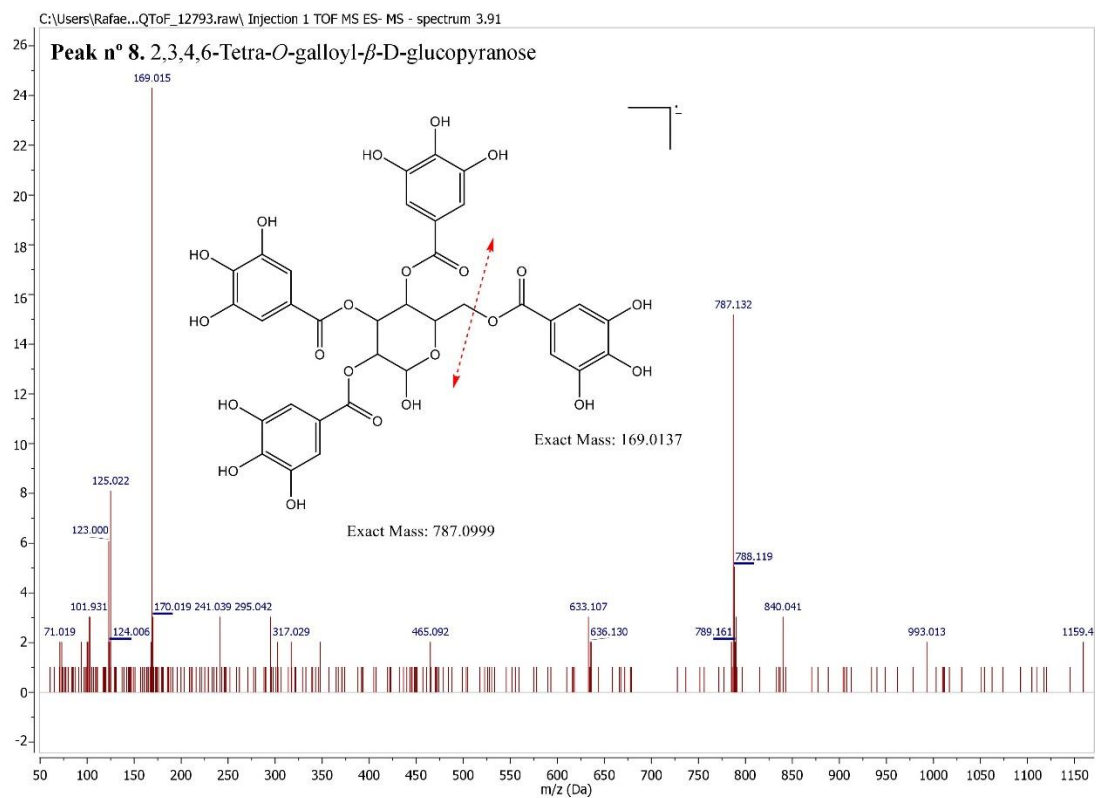
APÊNDICE A - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NO DECOCTO DAS FOLHAS DE *MYRACRODRUON URUNDEUVA*.

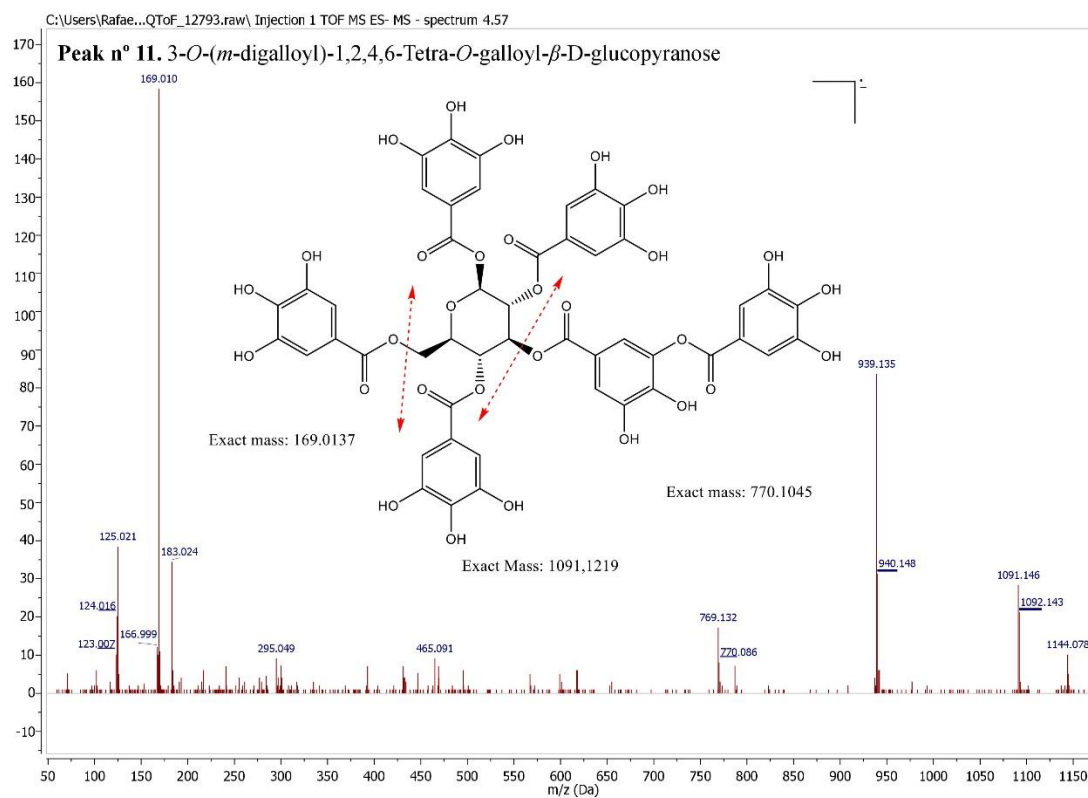
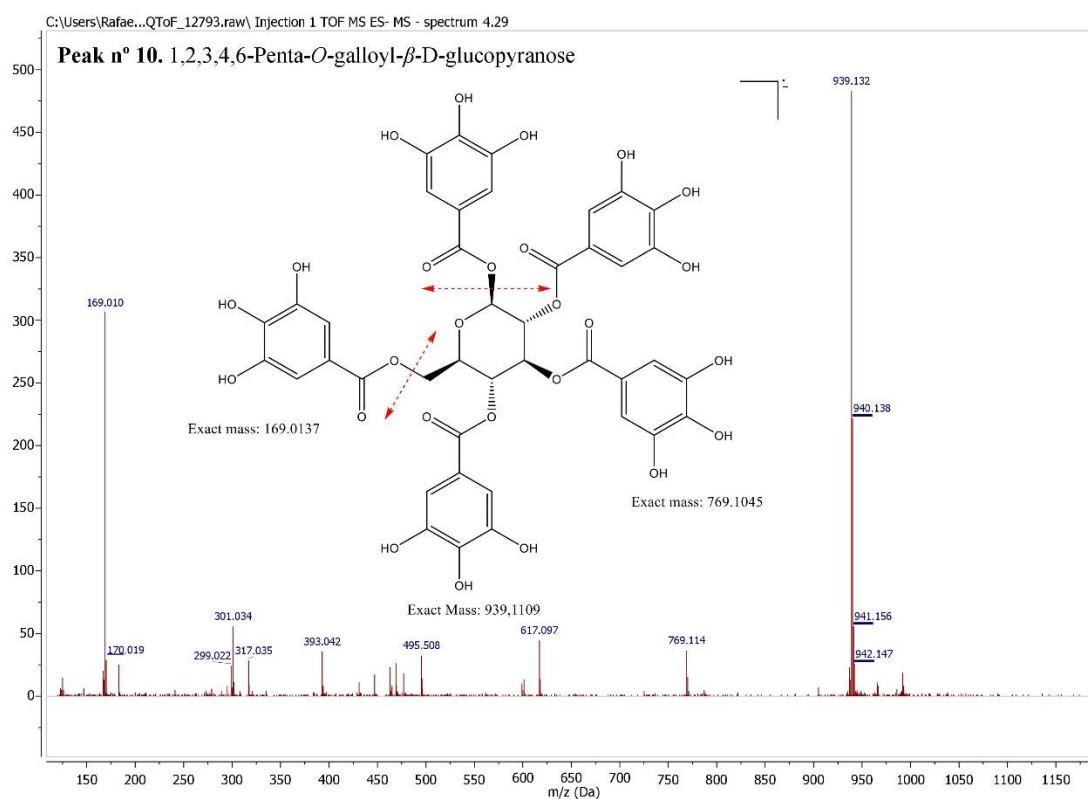


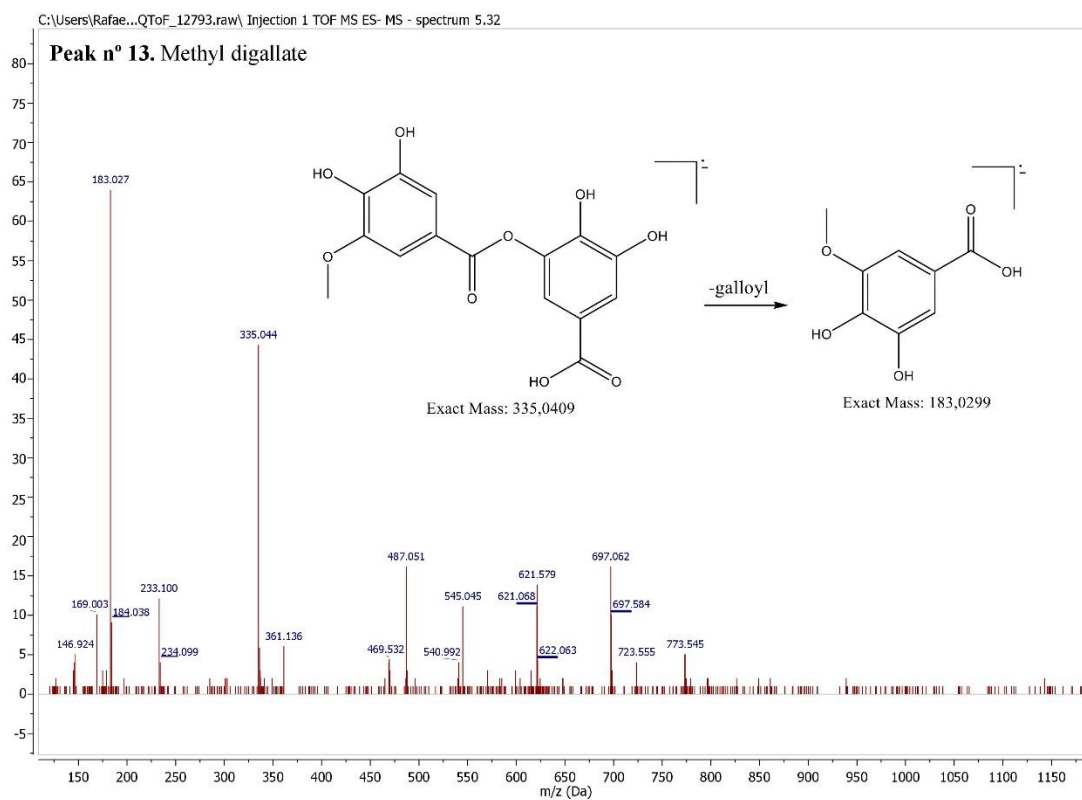
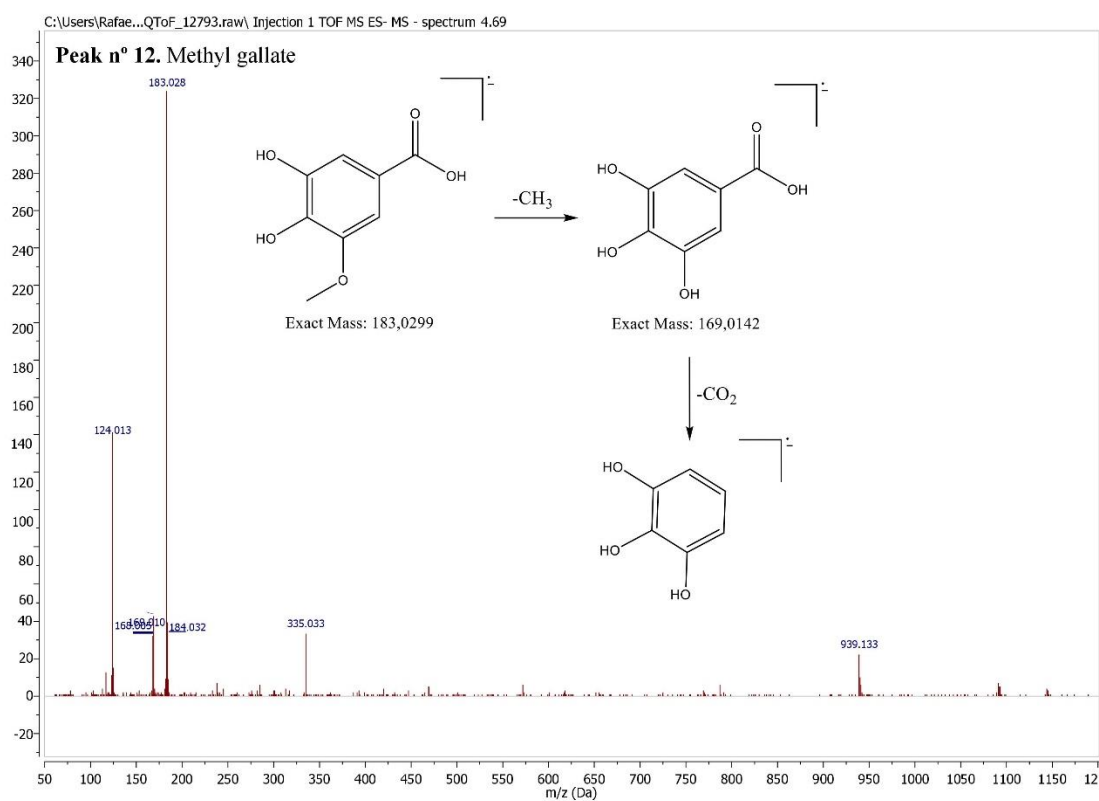


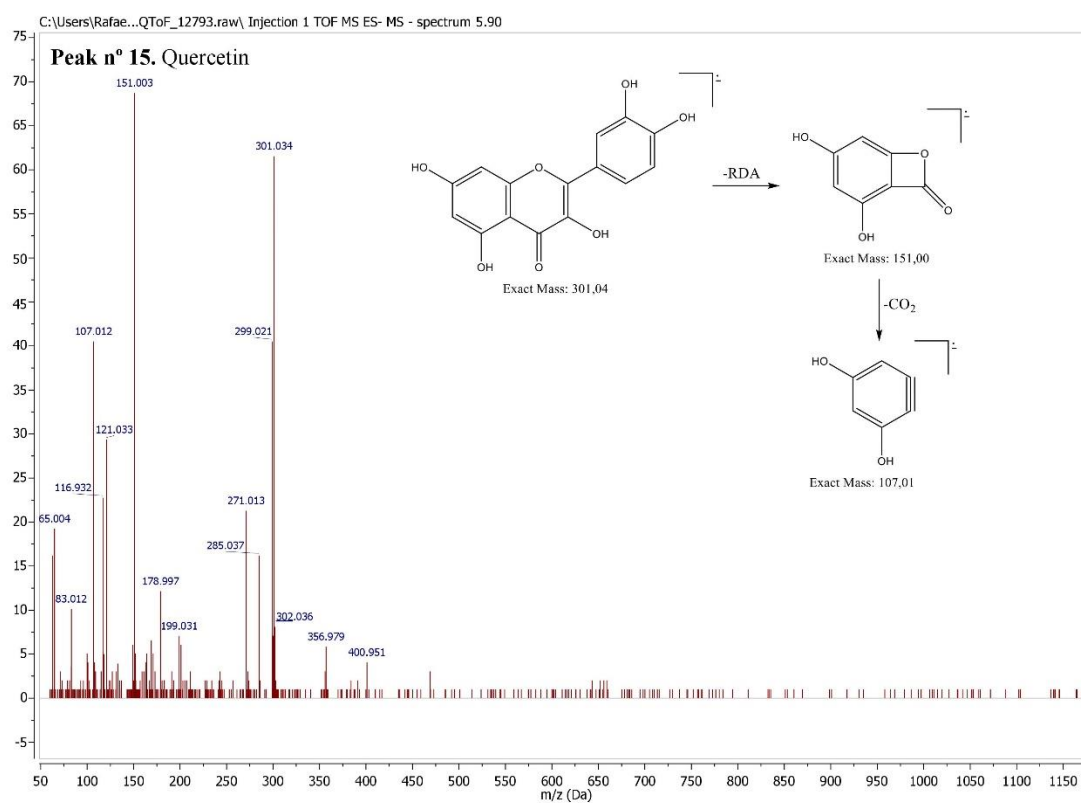
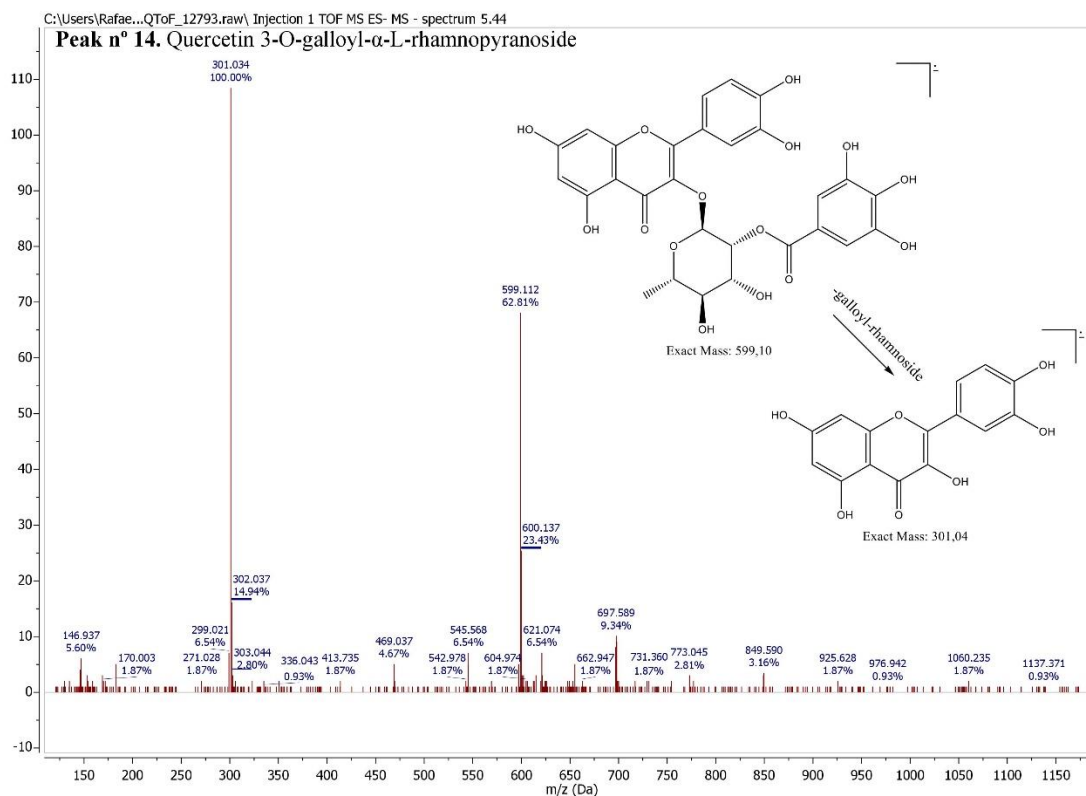


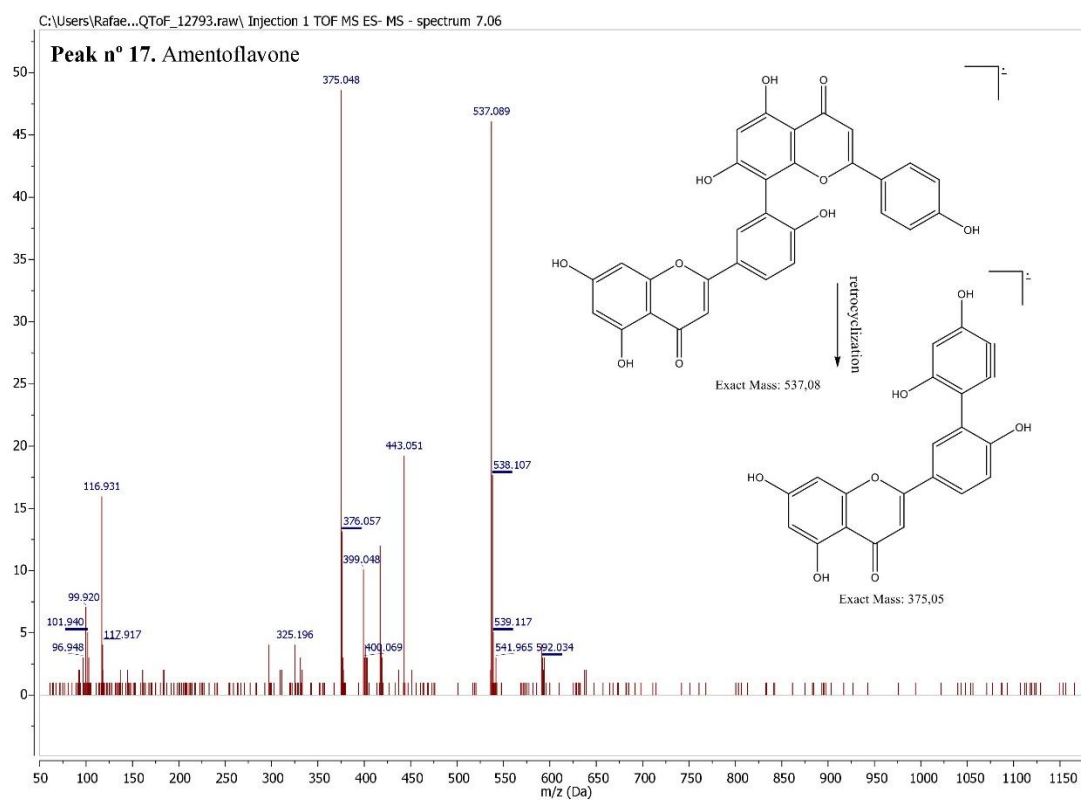
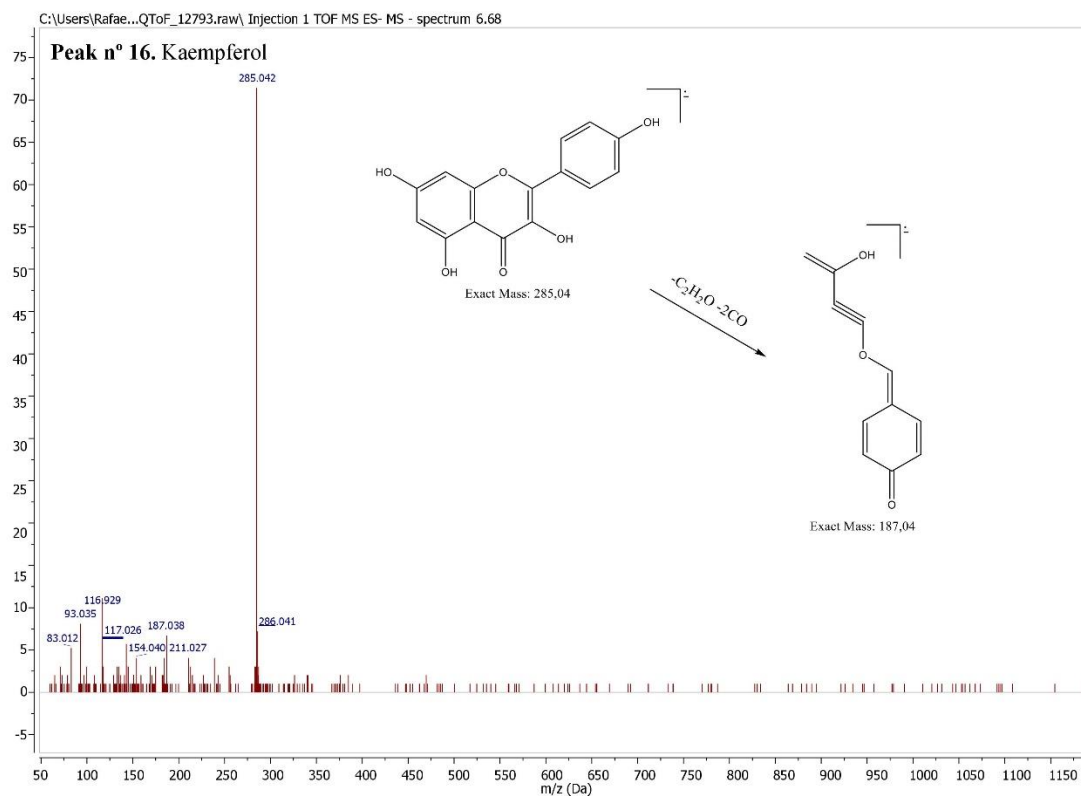




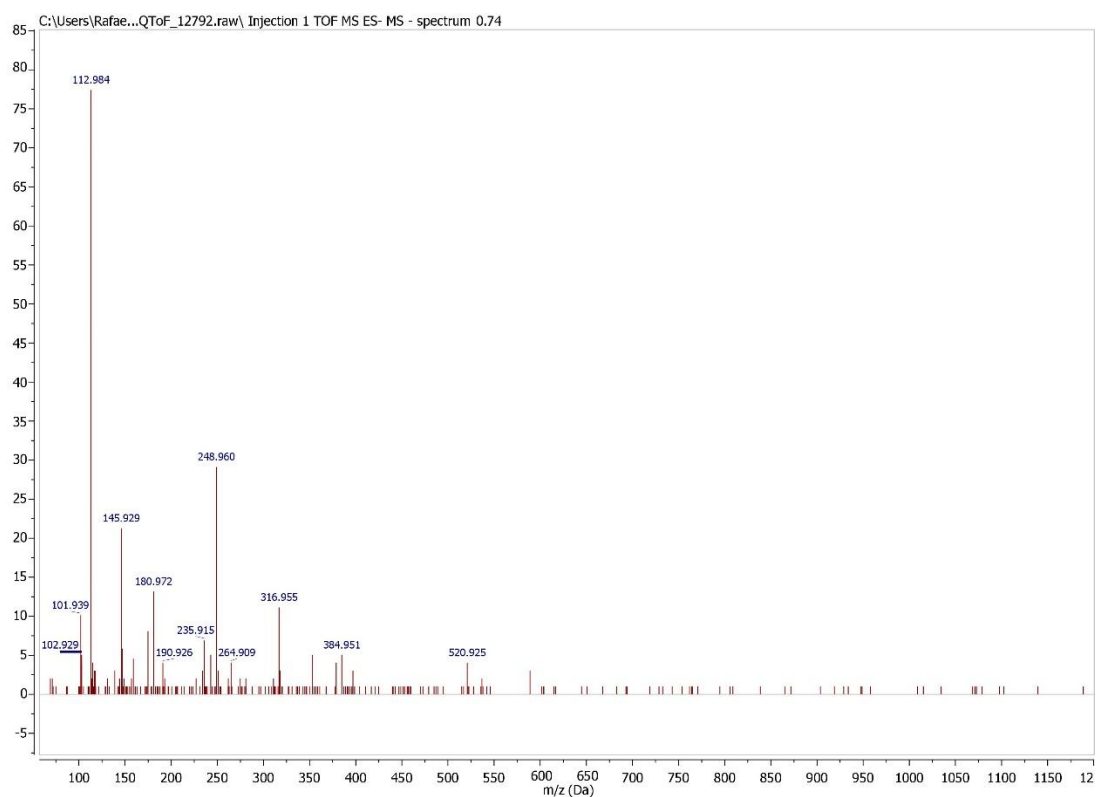


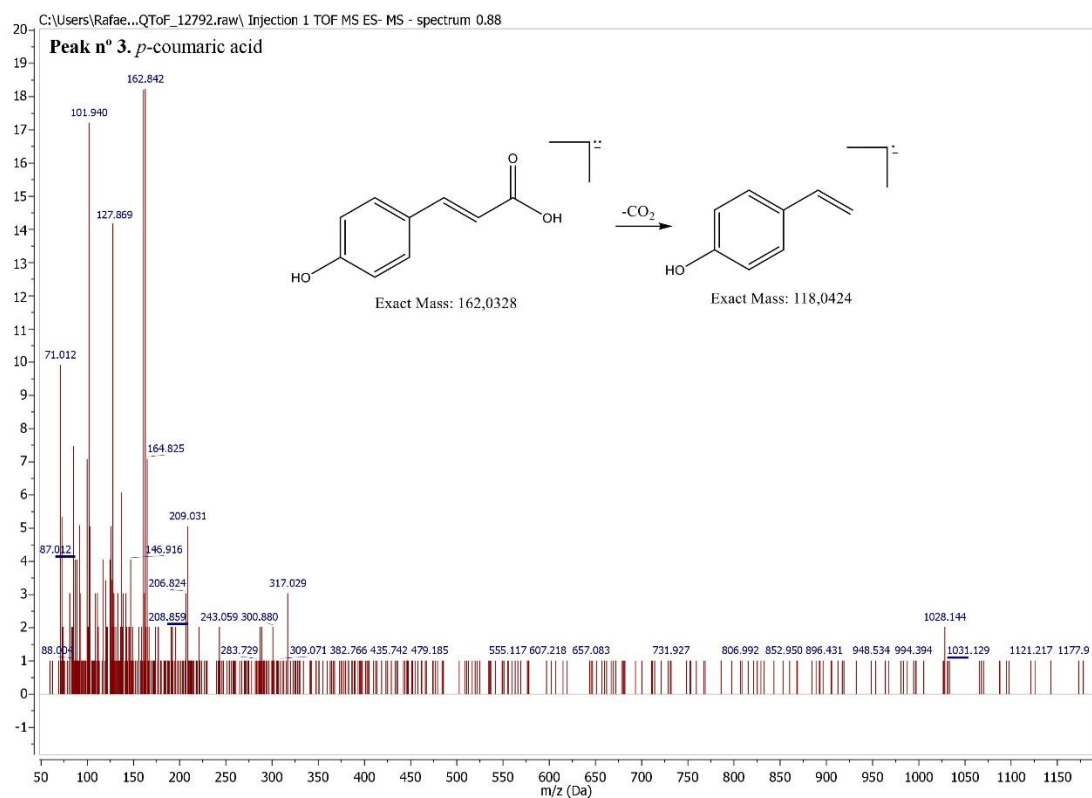
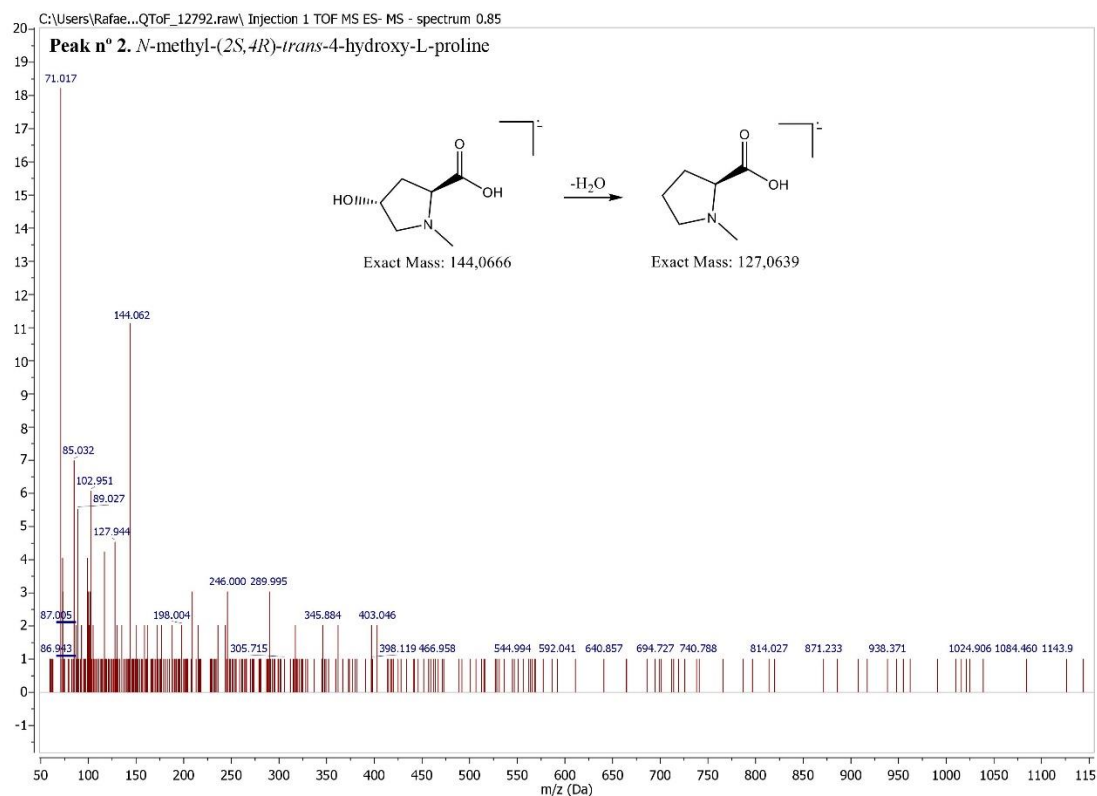


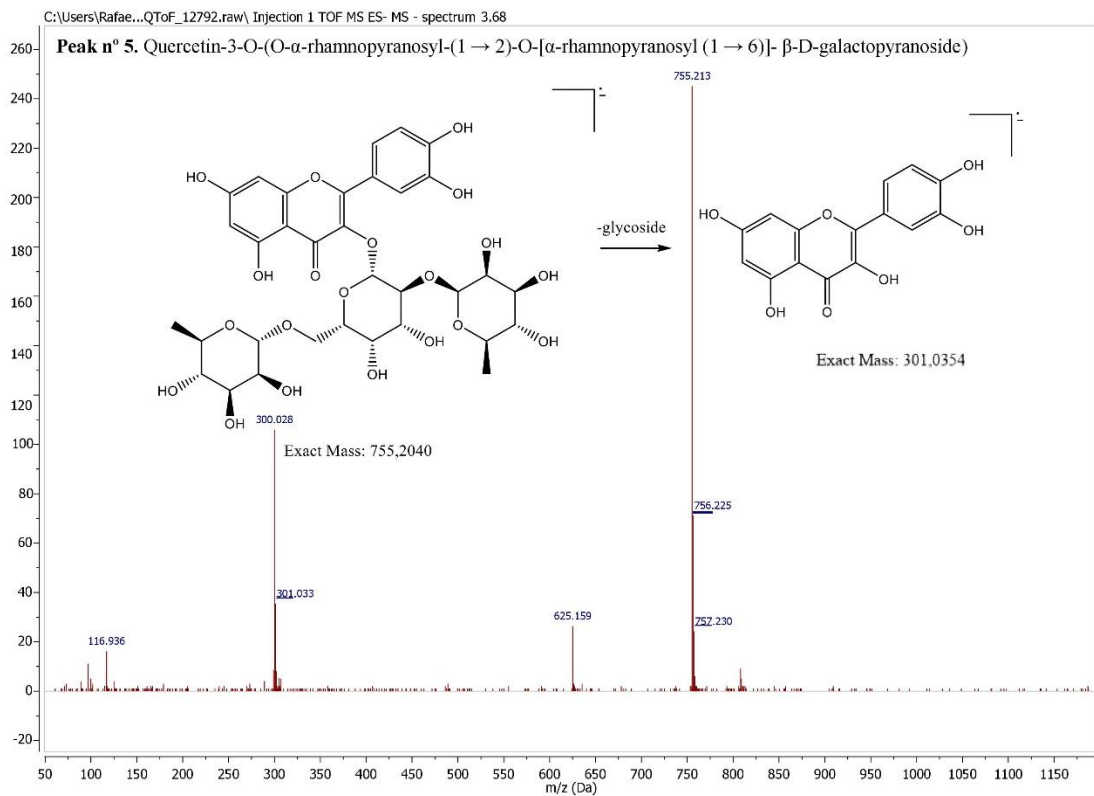
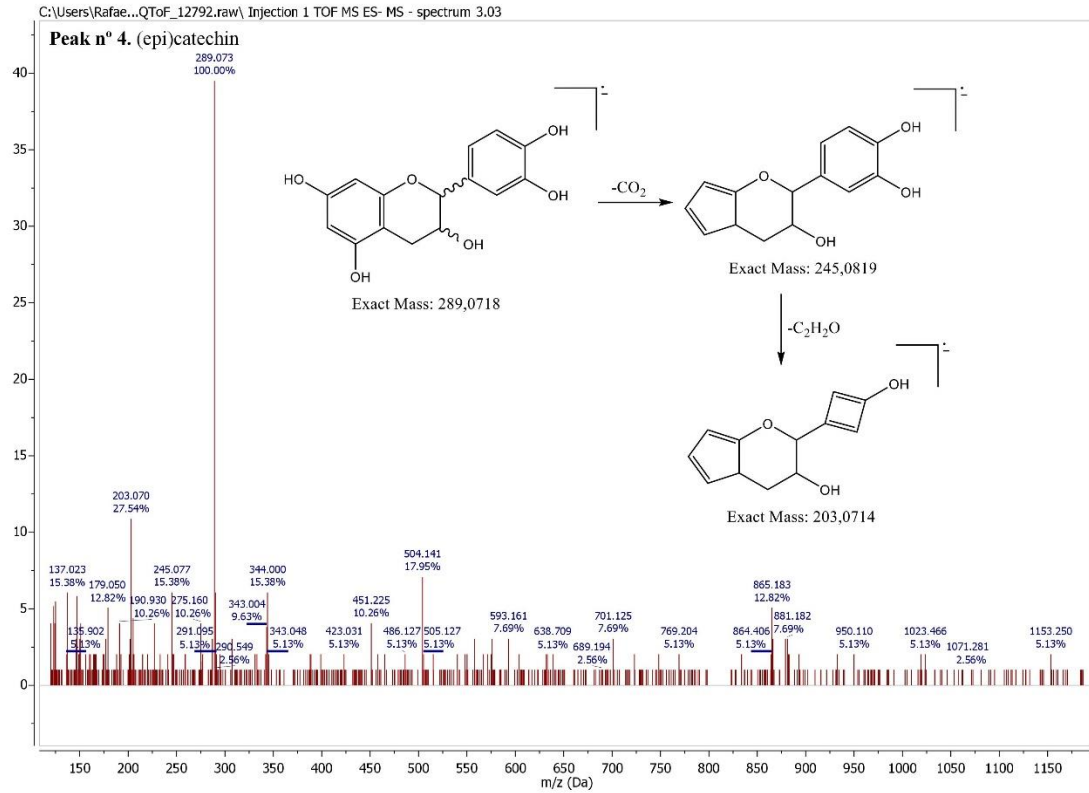


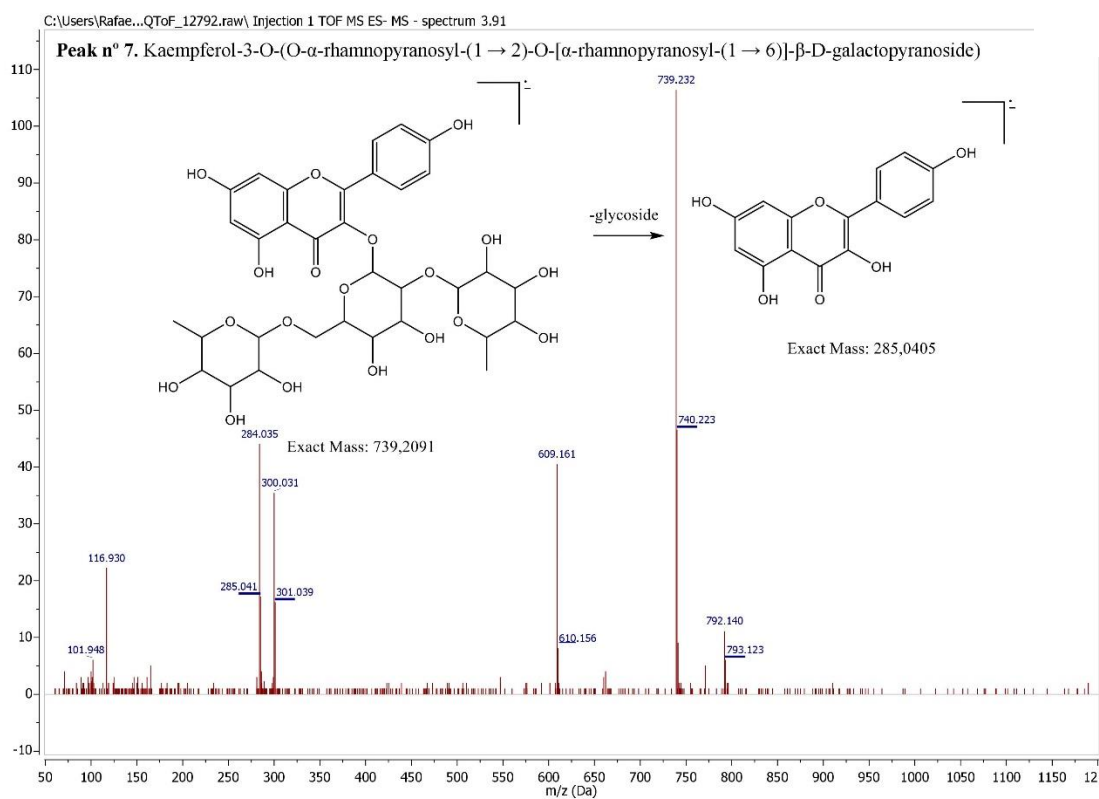
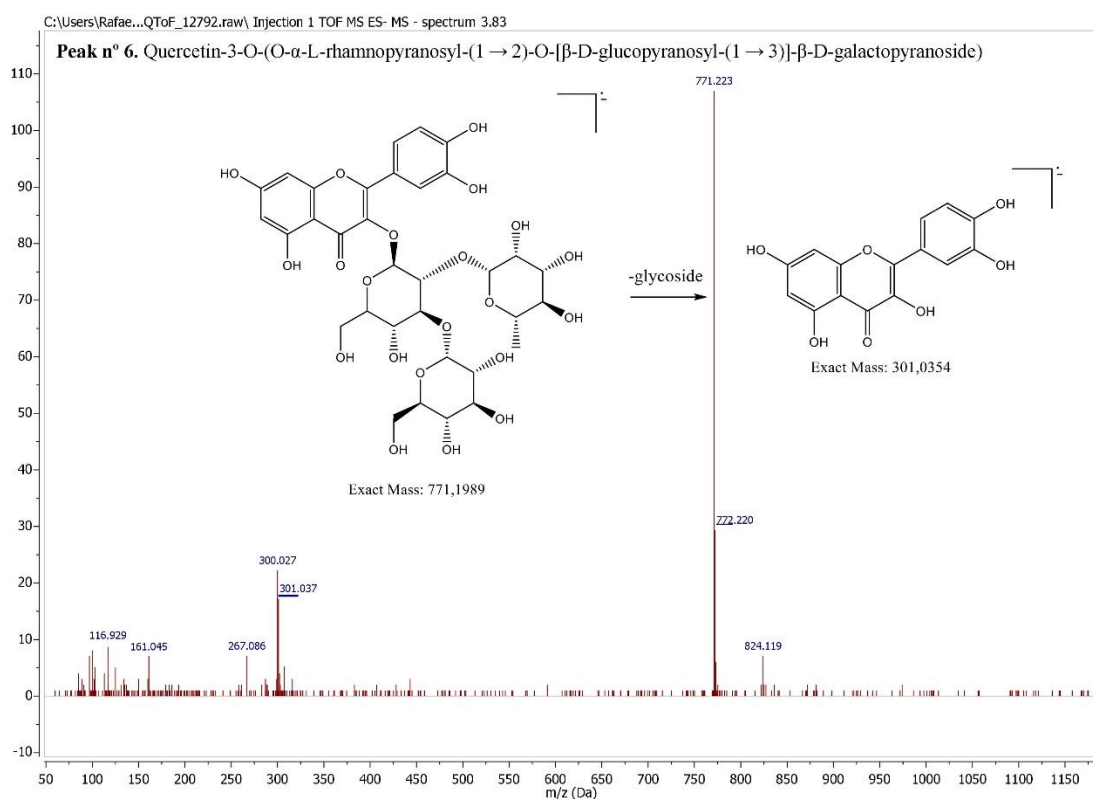


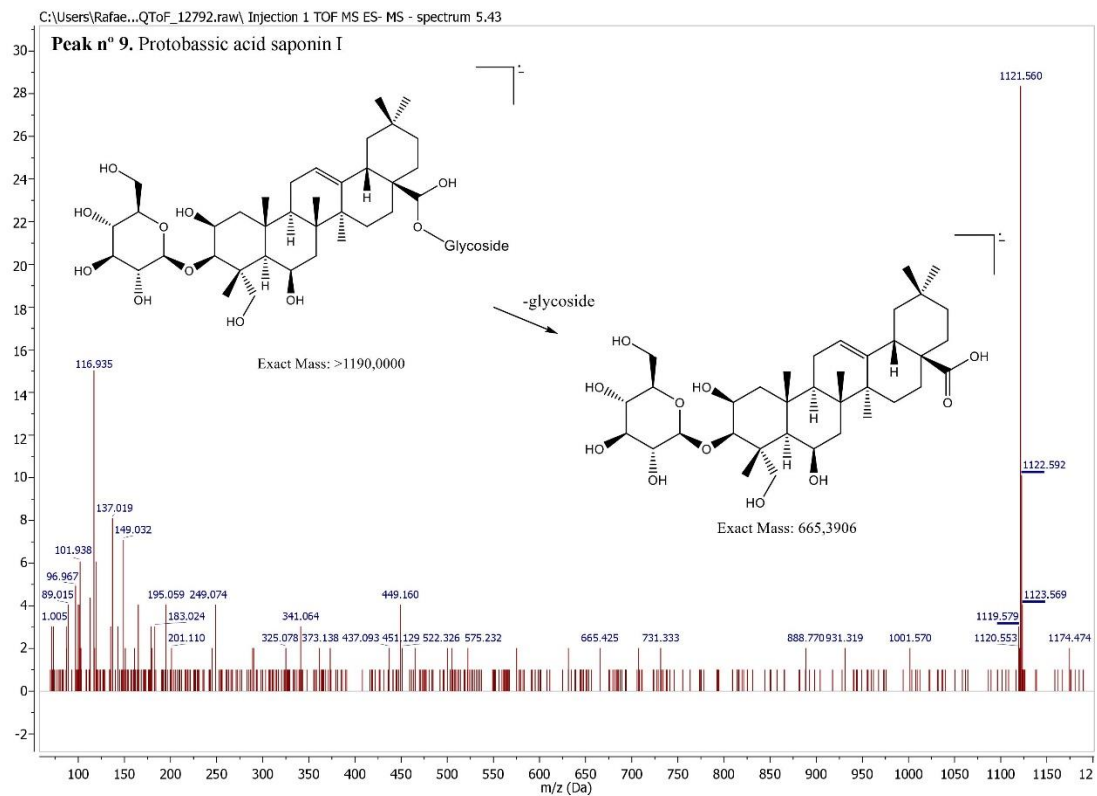
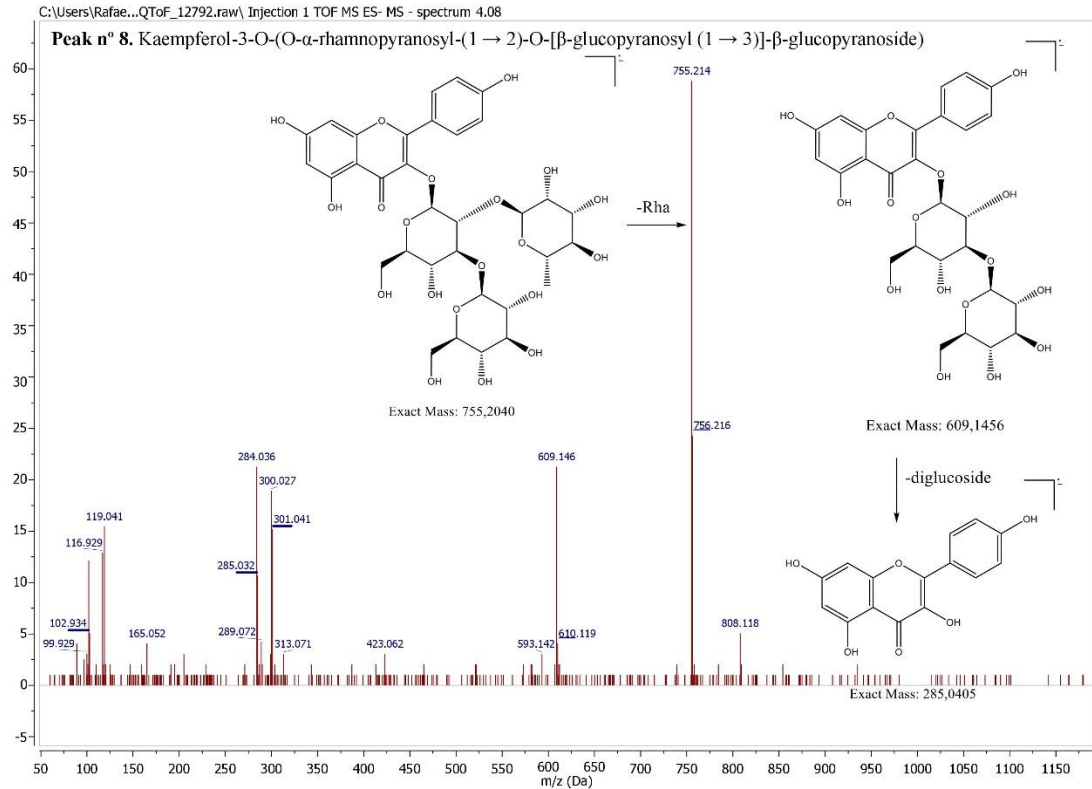
APÊNDICE B - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COMPOSTOS ENCONTRADOS NO DECOCTO DAS FOLHAS DE *SIDEROXYLON OBTUSIFOLIUM*.

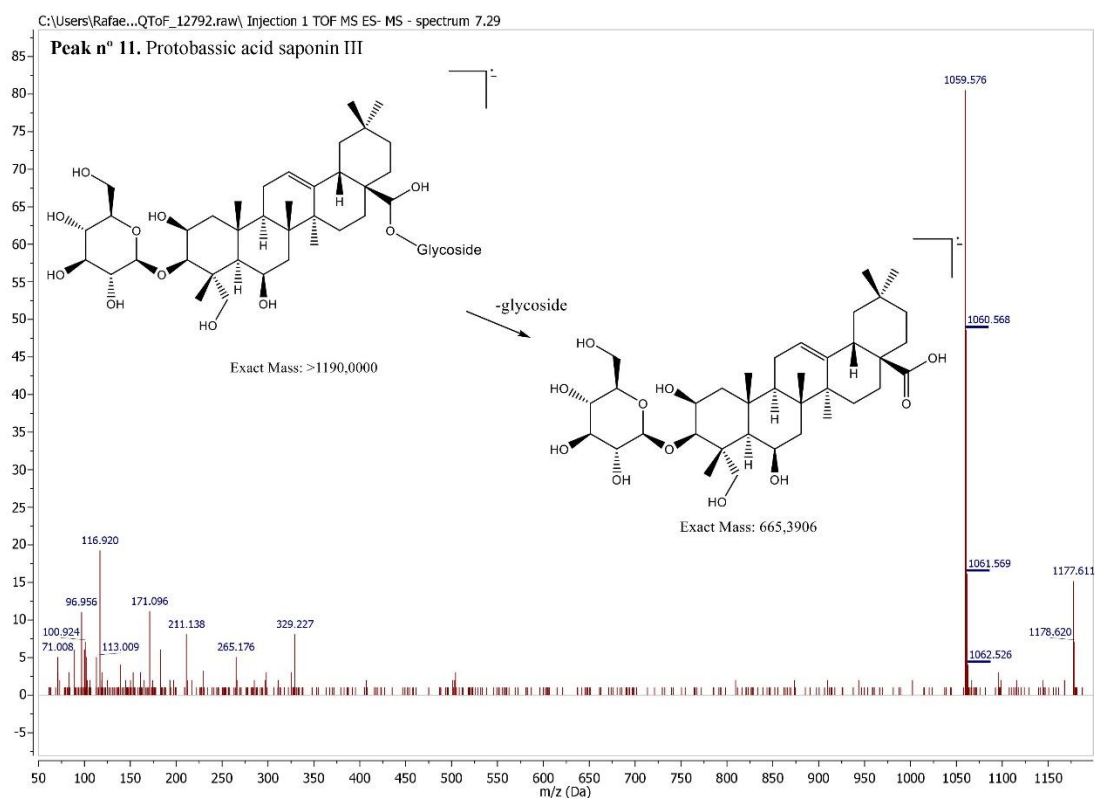
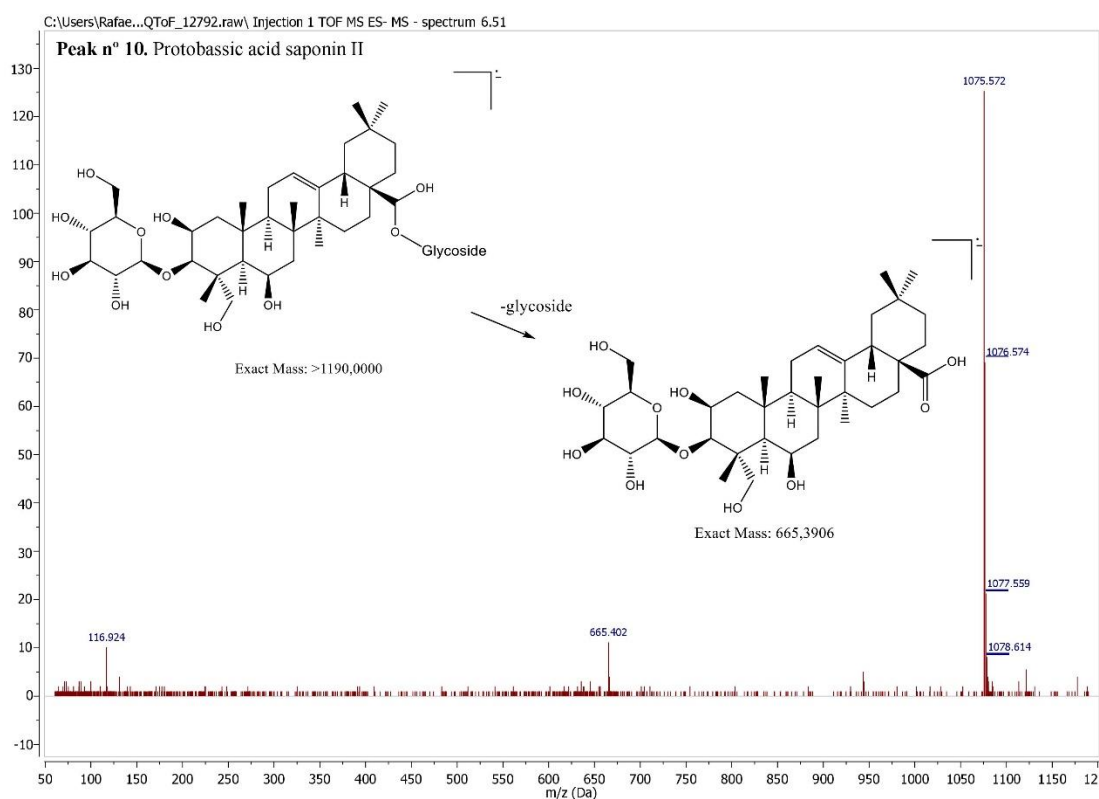


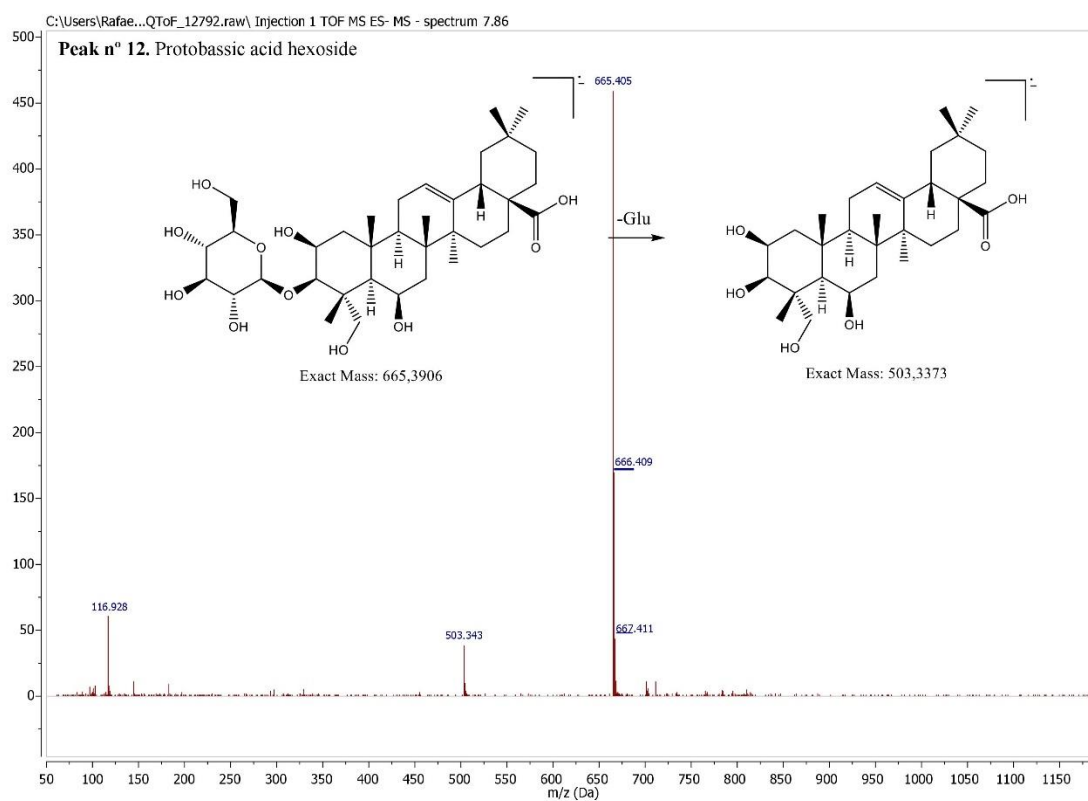




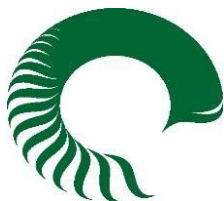








ANEXO A – OFÍCIO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL



Universidade Federal de Pernambuco Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 09 de agosto de 2017.

Ofício nº 73/17

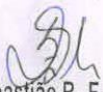
Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE Para:

Prof. Rafael Matos Ximenes
Departamento de Antibióticos
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **0015/2017**

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação do efeito genotóxico, mutagênico, antimutagênico e teratogênico das plantas medicinais Myracrodruon urundeuva Fr. All. (Anacardiaceae) e Sideroxylon obtusifolium (Roem. & Schult.) T.D.Penn. (Sapotaceae)**”, registrada com o nº **0015/2017** sob a responsabilidade de **Prof. Rafael Matos Ximenes** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 02/08/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/01/2018 a 31/12/2019
Espécie/ linhagem/raça	Ratos heterogênicos/Wistar
Nº de animais	112
Peso/Idade	180-240g / 60 dias
Sexo	28 machos e 84 fêmeas
Origem	Biotério do Departamento de Antibióticos - CB/UFPE

Atenciosamente,


Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691




Research Article

Genotoxic Assessment of the Dry Decoction of *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) Leaves in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster* by the Comet and SMART Assays

Érima Maria de Amorim,^{1,2} Samuel Lima de Santana,² André Severino da Silva,² Nayara Coriolano de Aquino,³ Edilberto Rocha Silveira,³ Rafael Matos Ximenes,¹ and Claudia Rohde^{2*}

¹Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

²Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

³Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

Medicinal plants are worldwide used as an efficient treatment of many diseases. *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) is widely used Brazilian folk medicine to treat inflammations and infections of the female genital tract, conditions of the stomach and throat, and to heal wounds on the skin and mucous membranes. Several pharmacological properties of extracts and compounds isolated from *M. urundeuva* are found in the literature, corroborating its uses as antiulcer and gastroprotective, anti-inflammatory and analgesic, as well as antimicrobial. Despite these many uses in traditional herbal medicine, there are few reports of its toxic-genetic effect. This work aimed to investigate the genotoxic and mutagenic potential in vivo of the dry decoction of *M. urundeuva* leaves on somatic cells of *Drosophila melanogaster*, through the Comet assay and somatic mutation and recombination

test (SMART). Six concentrations (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, and 16.0 mg/mL) were studied after feeding individuals for 24 hr in culture medium hydrated with extracts of *M. urundeuva*. In the Comet assay, all concentrations showed a genotoxic effect significantly higher than the negative control group, treated with distilled water. The two highest concentrations were also superior to the positive control group, treated with cyclophosphamide (1 mg/mL). In the SMART, there was a mutagenic effect at all concentrations tested, with a clear dose-dependent relationship. Both recombination and mutation account for these mutagenic effects. The set of results indicate that the dry decoction of *M. urundeuva* leaves is genotoxic and mutagenic for *D. melanogaster* under the experimental conditions of this study. Environ. Mol. Mutagen. 61:329–337, 2020. © 2019 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: phytotherapy; aroeira; somatic mutation and recombination test; mutation; recombination

INTRODUCTION

Medicinal plants and traditional herbal products (THPs) are used worldwide as efficient treatments for many diseases. Despite their complex chemical composition, they are usually considered safe due to their long history of use, at least with respect to the most apparent adverse reactions (EMA 2008; Moreira et al. 2014; Sponchiado et al. 2016). However, many medicinal plants and THPs have been identified as genotoxic and mutagenic. For that reason, it is imperative to investigate the potentially toxic-genetics effects of plants used in traditional medicine (EMA 2008; Rashed et al. 2015; Sponchiado et al. 2016). According to Klapacz and Gollapudi (2019), the genotoxicity refers to deleterious effects to genetic material that cover both transmissible outcomes and endpoints that themselves are not transmissible. On the other hand, the mutagenicity refers to transmissible changes to genetic material.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ-UFPE); Grant number: 23076.052010/2014-56.

Grant sponsor: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biodiversidade e Produtos Naturais (INCT BioNat); Grant number: INCTBioNat-CNPq 465637/2014-0.

Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Grant number: 309863/2018-0.

Grant sponsor: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco; Grant number: APQ-0416.2.02/15.

*Correspondence to: Claudia Rohde, Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório s/n, CEP 55608-680, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil. E-mail: claudia.rohde@yahoo.com.br

Received 14 May 2019; Revised 30 August 2019; Accepted 1 September 2019

DOI: 10.1002/em.22332

Published online 6 September 2019 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Myracrodruon urundeuva Allemão (Anacardiaceae), popularly known as “aroeira” or “aroeira-do-sertão” in order to distinguish it of the “aroeira-da-praia” (*Schinus terebinthifolius* Raddi., Anacardiaceae), is a pepper tree found in the dry forests of Brazil, Argentina, and Paraguay, especially in Brazilian Caatinga and Cerrado domains (Lorenzi and Matos 2002). Ethnobotanical studies have shown that this plant is used in medicine, but also in-house construction and as firewood. Due to its predatory extractivism, the species has already been on the list of endangered species (Brasil 2008). Among its medicinal uses, *M. urundeuva* is used to treat female genital tract inflammation/infections, stomach and throat problems, and to heal skin and mucosal wounds (Monteiro et al. 2006). People use mainly its stem bark, but ethnobotanical literature also reports the use of its leaves and roots (Albuquerque et al. 2007).

Many reports on the pharmacological properties of extracts and isolated compounds from *M. urundeuva* are found in the literature, corroborating its uses as antiulcer and gastroprotective (Carlini et al. 2010), anti-inflammatory and analgesic (Souza et al. 2007), and antimicrobial against bacteria, fungi, and viruses (Sá et al. 2009; Figueredo et al. 2014; Cecilio et al. 2016; Oliveira et al. 2017). However, despite its large use in traditional herbal medicine, only a few reports on its toxicological effect can be found in the literature. In a 28 days repeated dose study in rats, Oliveira et al. (2016) did not find any toxic systemic effect or changes in the estrous cycle of female rats treated with the ethanol extract from *M. urundeuva* leaves. On the other hand, the decoction of the stem bark of *M. urundeuva* presented a toxic potential when administered chronically at 13.8 and 138 mg/kg, p.o., for 61 days and was able to induce skeletal malformations in the offspring of female rats treated with these extracts at the same doses for 18 days during pregnancy (Carlini et al. 2010, 2013). The mutagenicity and antimutagenicity of hydroalcoholic extracts from *M. urundeuva* leaves and stem bark were assessed by the Ames test. None of the extracts any presented mutagenic effect and both exhibited a protective effect against different mutagens, either in the presence, or absence, of metabolic activation (Resende et al. 2015).

Several tests are used to evaluate the genotoxicity and mutagenicity of xenobiotics including plant extracts and isolated compounds. Among them are unicellular electrophoresis (Comet test) and somatic mutation and recombination test (SMART), two assays well applied to the fruit fly *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae), a good alternative eukaryotic insect to the use of mammals. *D. melanogaster* is considered a model organism due to the similarities between human and fruit fly genomes and conservation of gene functions (Lenz et al. 2013). Moreover, they have a short-time life cycle (about 10 days at 22°C), well-defined morphological characters, the presence of enzymes for the metabolism of xenobiotics, and a large

number of well-characterized mutant strains (Graf et al. 1984; Ostiling and Johanson 1984; Singh et al. 1988; Doke and Dhawale 2015; Fernandes et al. 2017). For these reasons, *D. melanogaster* has been used to evaluate natural products with neuroprotective (Chaudhary and Dhande 2018), anti-mutagenic (Rodrigues et al. 2016, 2017; Carmona et al. 2017), genotoxic and antigenotoxic activities (Fernandes et al. 2017).

Considering the widespread use of *M. urundeuva* in traditional herbal medicine and the conflicting results on its toxicological effects, this study aimed to investigate the potential in vivo genotoxicity and mutagenicity of the *M. urundeuva* leaf decoction in somatic cells of *D. melanogaster* by Comet and SMART assays.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material, Extraction, and Dilutions

Myracrodruon urundeuva Allemão (Anacardiaceae) specimens cultivated in the horticulture sector of the Universidade Federal do Ceará (Fortaleza-Brazil) were used. Those specimens were identified, and a voucher specimen was deposited in the Prisco Bezerra Herbarium under the number EAC 41033. The propagation of plants was made by sowing seeds harvested from wild specimens. The leaves of cultivated specimens were collected from 3 years old plants in February 2012. Fresh leaves (600 g) were boiled with 2.5 L of water for 2 hr in a round-bottom flask in order to extract the essential oil by hydrodistillation. The decoction liquids were filtered and then lyophilized yielding 83.1 g (~14%) of dry decoction. In the moment of use, the dry decoction was dissolved in distilled water at the defined concentrations. The chemical characterization of the dry decoction of *M. urundeuva* leaves can be found in Aquino et al. (2019). The tested doses of *M. urundeuva* were prepared starting with 288 mg of the dry decoction plus 18 mL of distilled water as solvent. From this concentrated solution (16 mg/mL), all others were prepared (8.0, 4.0, 2.0, 1.0, and 0.5 mg/mL) and tested in *D. melanogaster* assays. The choice of dilutions was based on cytotoxicity assessment results of *M. urundeuva* bark needed for 50% of response ($IC_{50} = 1.9$ mg/mL) against human erythrocyte cells (Jandú et al. 2013). The negative control was prepared with distilled water and positive control with cyclophosphamide monohydrate diluted in distilled water (1 mg/mL; Genuxal-Baxter Hospitalar, São Paulo, SP, Brazil, batch n° 4K963J).

Comet Assay

Treatment of *D. melanogaster* Larvae

Prior to the Comet assay, a survival test was carried out using 100 third instar larvae to evaluate the toxicity of each concentration of the dry decoction of *M. urundeuva* leaves (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, and 16.0 mg/mL) and distilled water (negative control). As shown in Figure 1, in all the treated groups was observed a high level of surviving adults (above 90%) evidencing that the compound did not interfere in the survival of the organisms.

The genotoxic effect of the different concentrations of the dry decoction of *M. urundeuva* leaves was assessed using the comet assay in somatic *D. melanogaster* cells according to Verçosa et al. (2017) with slight modifications. Adult Oregon-R *D. melanogaster* females were transferred to glass vials for oviposition. The vials contained an oviposition medium prepared 24 hr before, based on fresh baker's yeast (Itaquara Alimentos SA, Tapiratiba, São Paulo, Brazil) supplemented with sucrose and mounted on a solid agar base. Seventy-two hours after oviposition, 80 third instar larvae were collected and submitted to the treatments, which were formulated with 0.9 g instant mashed potato (Yoki SA, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brazil) hydrated with 3 mL of each test solution of the dry decoction of *M. urundeuva* leaves (0.5, 1.0, 2.0, 4.0,

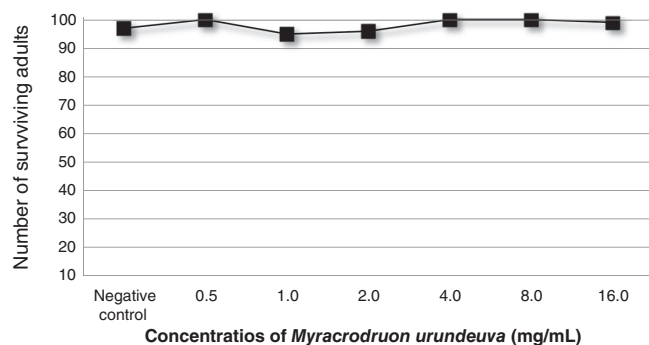


Fig. 1. General toxicity of *Myracrodruon urundeuva* leaf dry decoction. Frequency of surviving adults of *Drosophila melanogaster* flies submitted to different concentrations of the *M. urundeuva* (mg/mL) following 48 hr exposure of third-instar larvae and the negative control group submitted to distilled water.

8.0, and 16.0 mg/mL). An additional set of 80 larvae was collected and used as negative control, which was submitted with medium hydrated only with distilled water. The positive control larvae were exposed to the genotoxic agent cyclophosphamide. All treatments were carried out in triplicate.

Hemolymph Extraction, Mounting of Slides, and Electrophoresis

Twenty-four hours after treatment, 60 larvae were transferred to a Petri dish and refrigerated at 4°C for 1 min to reduce metabolic activity. Next, larvae were transferred to a Kline concavity slide containing ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) to prevent hemolymph coagulation. A section was cut on the side of the cuticle of each larva using a scalpel to remove hemolymph, according to Verçosa et al. (2017). A 60-μL cell-suspension containing the pooled hemocytes of the 60 larvae was mounted on glass slides previously sanded and soaked in standard agarose 1.5%. After homogenization in 100 μL low melting point agarose 0.5% prepared at 37°C, the material was topped with a 24 mm × 60 mm coverslip and the slides were transferred to a refrigerator and kept at 4°C for 10 min. Next, the coverslips were removed, and the slides transferred to a cuvette containing lysis solution (NaCl 2.5 M, EDTA 1 M, NaOH 100 mM, Tris 1% pH 10, Triton X-100 1%, dimethyl sulfoxide 10%). Cell lysis proceeded for 72 hr at 4°C. Then, the material was treated with a buffer solution (NaOH 1 M, EDTA 200 mM, pH > 13) for 20 min at 4°C and transferred to a 40-cm horizontal electrophoresis apparatus coupled to a 40-V, 300-mA source. The buffer box of the apparatus was filled with the same buffer solution, and electrophoresis was run for 20 min. Subsequently, slides were immersed in neutralization buffer (Tris-HCl 0.4 M, pH 7.5) for 15 min at room temperature and fixed in absolute ethanol for 5 min. The slides were allowed to dry naturally and stored at 4°C until microscopy inspection. All stages described were carried out in the absence of light.

Analysis by Fluorescence Microscopy

The material mounted on slides was stained with 50 μL intercalating nucleic acid stain (GelRed, Biotium, Uniscience, São Paulo, São Paulo, Brazil) diluted in deionized water at 1:500. Nucleoids were visualized in a fluorescence microscope (M2, Zeiss-Imager, Jurubatuba, São Paulo, Brazil) equipped with a 40× lens and using a fluorescence dye (Alexa Fluor 546, Zess, Jurubatuba, São Paulo, Brazil). In total, 100 cells (or comets) were inspected for each replicate, totaling 300 cells analyzed per each treatment. Nucleoids were ranked 0–4 based on the visual inspection parameters defined by

Collins et al. (2008). In this classification system, Class 0 includes intact nucleoids (no damage by the test compound), Classes 1, 2, and 3 represent minimal, intermediate, and intense damage, and Class 4 represents maximum damage to cells. According to Azqueta and Collins (2013), the assay reflects the relaxation of supercoiled DNA embedded in agarose. The more breaks are present, the more DNA loops are relaxed, and the more DNA appears in the comet tail.

Genotoxicity was assessed based on two parameters, the damage index (DI) and damage frequency (DF%). Briefly, DI values may vary from 0 (totally intact, 100 cells × 0) to 400 (maximum damage, 100 cells × 4) and can be calculated using the equation:

$$\text{DI} = 0(\text{Number of comets Class 0}) + 1(\text{number of comets Class 1}) + 2(\text{number of comets Class 2}) + 3(\text{number of comets Class 3}) + 4(\text{number of comets Class 4})$$

The second parameter, DF%, was calculated as the percent value of all damaged comets (Class 1 to Class 4) considering the total number of comets, which includes Class 0 to Class 4 (total number) using the equation:

$$\text{DF}\% = \frac{([\text{Total number of comets} - \text{number of comets Class 0}]100)}{\text{Total number of comets}}$$

In total, 2,400 cells were analyzed. Results were compared using an analysis of variance and the Bonferroni procedure as post hoc test in the STATA 12 software. *P* values were considered significant if they were <0.05 in all assays.

SMART

The wing spot test (SMART) of *D. melanogaster* was carried out according to Graf et al. (1984) and Andrade and Lehmann (2003). The SMART monitors loss of heterozygosity and detects several genetic end-points, including point mutation, deletion, unbalanced half-translocation, and mitotic recombination. *D. melanogaster* larvae were obtained from the crossing of virgin *flr*³ females (flare, marker 3-38.8), whose wing hairs are shaped like a sail or a candle flame, and *mwh* males (multiple wing hairs, marker 3-0.3). Due to the presence of alleles in chromosome 3 that are lethal in homozygosity, the *flr*³ strain is kept in cultivation through balancer chromosomes, which carry multiple inversions in chromosome 3 and dominant markers *TM3* and *Bd*^S. In turn, the *mwh* strain has the homozygous recessive marker gene for viable mutations, with the phenotypical expression of three or more mutant hairs on the same cell (multiple wings; Lindsley and Zimm 1992). The standard cross (ST) was established by mating *flr*³ females carrying the balancer genotype *flr*³/*ln(3LR)TM3, vi p' sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* with homozygous *mwh/mwh* males. The heterozygous offspring resulting from this ST cross may have two genotypes: (1) *mwh*+/*flr*³ (marker-heterozygous [MH]), a trans-heterozygous for recessive markers *mwh* and *flr*³, with normal round wings; (2) *mwh*+/*TM3, Bd^S* (balancer-heterozygous [BH]), a heterozygous for balancer chromosome *TM3*, with serrate wings (Graf et al. 1984).

To obtain the larva used in the treatments, the females involved in the ST cross remained in glass vials containing a layer of fresh baker's yeast (Itaquara Alimentos SA) for 8 hr to induce oviposition. The yeast, supplemented with sucrose and mounted on a solid agar base, was prepared 24 hr before oviposition. Adult flies were removed from vials and third instar heterozygous larvae (72 ± 4 hr of life) were collected and transferred to disposable plastic tubes containing growth medium prepared with 0.9 g instant mashed potatoes (Yoki SA) hydrated with 3 mL of each test solution (*M. urundeuva* leaf dry decoction at 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, and 16.0 mg/mL). The negative control group was formed with 100 larvae that were transferred to tubes containing the potato mix hydrated with distilled water. The positive control included 100 larvae treated to the potato mix hydrated with doxorubicin (1.0 mg/mL; Rubidox, Laboratório Químico Farmacêutico Bergamo, São

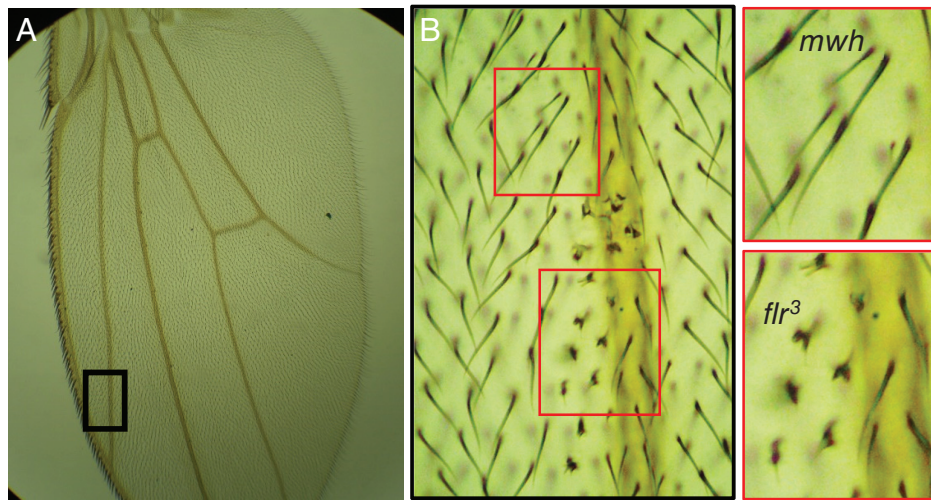


Fig. 2. Sketch of a wing of an adult *Drosophila melanogaster* (A), and the twin spot containing *mwh* and *flr³* hairs (B).

Paulo, SP, Brazil, batch n° 1078999). All larvae were maintained in the growth medium until the adult stage, when adults were collected, counted, and transferred to tubes containing ethanol 70%.

For the wing-spot analysis, the pairs of wings of male and female *D. melanogaster* flies were detached from the body and glued side by side on glass slides using Faure's solution (Graf and Singer 1992). Wings of the two phenotypes of the offspring (*mwh*+/*flr³*; MH) and *mwh*+TM3, *Bd^S* (BH) were mounted on slides, which were analyzed in an optical microscope (Medlux) at 400× magnification. Genetic changes were analyzed and quantified based on the frequency of spot types, namely *small single spots* (presence of one or two hairs of one of the phenotypes, *mwh* or *flr³*), *large single spots* (presence of *mwh* or only *flr³* spots with more than three mutant hairs), and *twin spots* (presence of two hairs, *mwh* and *flr³*; Fig. 2). The results obtained after the treatments with the *M. urundeuva* leaf decoction at 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, and 16.0 mg/mL were compared to the results obtained for the negative control using the conditional binomial statistical test of Kastenbaum and Bowman (1970). Significance level of results was assessed according to statistical analysis of Frei and Würzler (1988), with four possible results, namely positive (+), weakly positive (w+), negative (−), and inconclusive (i). Genotoxic potential was defined based on the rule that states that the identification of mutagenic effect requires that the total

number of mutant spots is twice as high in a treatment group as in the negative control, with no compulsory dose–response relationship (Cunha et al. 2001; Tiburi et al. 2002).

RESULTS

Genotoxicity of *M. urundeuva* Using the Comet Assay

The results of the damage scores (0–4), including the calculated DI and DF% values of experimental groups and positive and negative controls are shown in Table I. DI and DF% values of the treated groups and the positive and negative controls differed statistically (the detailed comparisons of post hoc Bonferroni test can be seen in Supporting Information Table S1). Table I also shows that the mean genetic damage values (DI and DF%) increased with the doses administered (starting at 0.5 mg/mL through to 16.0 mg/mL) which is a clear dose-dependent effect. The

TABLE I. Mean Genetic Damage in Hemocytes Harvested from *Drosophila melanogaster* Oregon-R Larvae of the Negative Control (Distilled Water), Positive Control (Cyclophosphamide, 1 mg/mL), and Concentrations of the Dry Decoction of *Myracrodruon urundeuva* Leaves (MU)

Treatments	Damage level (mean ± SD)					DI	DF %
	0	1	2	3	4		
Negative control	82.33 ± 3.05	14.33 ± 0.57	3.33 ± 2.51	0	0	21.00 ± 5.56	17.66 ± 3.05
Positive control	33.00 ± 10.53	17.66 ± 3.05	18.33 ± 13.05	22.00 ± 2.64	9.00 ± 3.00	156.33* ± 9.50	67.00* ± 10.53
MU 0.5 mg/mL	39.66 ± 2.51	25.00 ± 17.34	10.33 ± 3.21	20.00 ± 11.13	5.00 ± 3.60	125.66* ± 30.03	60.33* ± 2.51
MU 1.0 mg/mL	30.66 ± 12.22	35.66 ± 7.57	13.33 ± 2.08	16.00 ± 3.00	4.33 ± 1.15	127.66* ± 20.00	69.33* ± 12.22
MU 2.0 mg/mL	27.66 ± 2.88	21.00 ± 8.88	12.33 ± 4.16	29.66 ± 6.35	9.33 ± 3.21	172.00* ± 11.78	72.33* ± 2.88
MU 4.0 mg/mL	25.00 ± 1.73	22.33 ± 5.03	19.33 ± 2.08	24.33 ± 4.16	9.00 ± 1.73	170.00* ± 10.39	75.00* ± 1.73
MU 8.0 mg/mL	12.00 ± 7.93	18.66 ± 2.51	16.66 ± 4.50	38.00 ± 9.53	14.66 ± 2.51	224.66* ± 24.41	88.00* ± 7.93
MU 16.0 mg/mL	5.33 ± 1.15	19.00 ± 1.00	19.33 ± 2.30	42.66 ± 2.08	13.66 ± 3.05	240.33* ± 7.57	94.66* ± 1.15

Damage level: zero (0) represents absence of genetic damage and 1–4 are the increasing levels of genetic damage.

Abbreviations: DF%, damage frequency; DI, damage index; MU, *Myracrodruon urundeuva*; SD, standard deviation.

* $P < 0.05$.

reference images of five damage levels (0–4) observed in *D. melanogaster* hemocytes after treatment with *M. urundeuva* are illustrated in Supporting Information Figure S1.

Mutagenicity of *M. urundeuva* Using the SMART

The results of the SMART for ST flies treated with the dry decoction of *M. urundeuva* leaves are shown in Table II, where the spot data are given separately for the MH (*mwh/flr³*) and the BH (*mwh/TM3*) genotypes. Spot frequencies in the negative control individuals were as expected (namely 0.57 for MH and 0.53 for BH). The SMART showed that, as in the comet assay, mutagenic effects were caused by treatment with all tested concentrations of the *M. urundeuva* leaf dry decoction in both gene markers analyzed, compared with the negative control. MH individuals expressed a significant increase (+) in higher concentrations for small single spots frequencies, and in all concentrations for large single spots, and total spots frequencies, compared with the negative control. However, this was not observed for twin spots, whose results were inconclusive (i). Mutation and recombination contributed to the total mutagenicity due to the exposure to the *M. urundeuva* leaf decoction in the four lowest concentrations tested, and only mutation events were observed after treatment with the two higher concentrations (8.0 mg/mL and 16.0 mg/mL).

DISCUSSION

The use of medicinal plants or THPs as therapeutic alternative to the conventional allopathic medicine has increased in the past decades. Regulatory agencies have encouraged the use of medicinal plants in many countries (e.g., Brazilian Health Regulatory Agency—ANVISA) but only a few or no pharmacovigilance programs on herbal medicines have been performed by those agencies (Boullata and Nace 2000; Brasil 2006; Debbie et al. 2012; Ekor 2013). Practitioners and enthusiasts of herbal medicines may advocate that traditional products with a long history of use are safe when used at therapeutic doses. However, this statement implies that the absence of evidence of toxicity could be taken as evidence of the absence of toxicity of such THPs, which it is not true (Moreira et al. 2014). It is also important to highlight that pharmacovigilance is unable to detect genotoxicity and cannot be used as evidence for the absence of genotoxic effects (EMA 2008; Debbie et al. 2012).

Rats and mice are the main choice animal models for toxicological studies. However, in recent years, different alternative model organisms have been validated to minimize the number of higher organisms used in toxicological research and testing (Siddique et al. 2005). In this context, the fruit fly *D. melanogaster* is a well-established insect

model for human diseases and toxicological research due to its well-characterized genetics and developmental biology (Graf et al. 1984; Ostling and Johanson 1984; Singh et al. 1988; Siddique et al. 2005; Pandey and Nichols 2011; Allocca et al. 2018). As a good model system, the molecular pathways in *D. melanogaster* share many similarities with those found in humans, with approximately 75% of human disease-causing genes having at least one functional homolog in the fly (Allocca et al. 2018), and a high degree of conservation and face validity to facilitate the primary screening and interpretation of results (Pandey and Nichols 2011). For genetic toxicology, the universality of DNA and genetic code provides a rational basis for the use of non-human models to predict the genotoxicity and mutagenicity of xenobiotics, despite the differences in metabolism, DNA repair, and other physiological processes (Vilar et al. 2010). Therefore, conservation of fundamental cellular and developmental mechanisms between flies and human is extensive enough to warrant a central role for the *Drosophila* model in toxicological testing (Tickoo and Russell 2002; Rand 2010).

In this work, the genotoxicity and mutagenicity of the dry decoction of *M. urundeuva* leaves was evaluated in somatic cells of *D. melanogaster* using the Comet assay and SMART. Under the experimental *in vivo* conditions in the study performed both assays indicate that *M. urundeuva* leaf dry decoction is genotoxic and mutagenic. According to Gleit et al. (2016), comparing comet assay results with data from other test systems to interpret the biological relevance is highly recommended (Olive and Banath 2006) and is an inherent part of genotoxicological test strategies (EFSA 2011). Also, *in vivo* genotoxicity tests, as we performed with *D. melanogaster* somatic cells are, in general, considered more specific than *in vitro* tests (Bolognesi et al. 2017).

The Comet assay is useful to detect DNA single-strand breaks that have not been repaired until the step of cell membrane lysis. Also, can be used for studies of DNA repair, providing important information on the kinetics and type of lesion repaired, although is unable to infer the reliability of the repair process (Gleit et al. 2016). In the other hand, SMART quantify both mutagenesis and recombination damages in the next cell generations. In the Comet assay results, the DNA damage was concentration-dependent for both DI and DF parameters and in the SMART all tested concentrations presented marked increase in the frequencies of small and large single spots, and total spots.

The chemical composition analysis of *M. urundeuva* leaf dry decoction revealed the presence of 24 ubiquitous secondary metabolites, mainly simple phenolic acids and their esters, flavonoids, flavonoid glycosides, and gallotannins (Aquino et al. 2019). Similar results with the leaf ethanol and hydroalcoholic extracts of *M. urundeuva* were reported by Silva et al. (2011) and Resende et al. (2015), respectively. Usually, the presence of gallic acid derivatives,

TABLE II. Wing Spot Data (Frequency and Number) Obtained after Exposure of Marker-Heterozygous (MH; *mw h*+/*flr*³) and Balancer-Heterozygous (BH; *mw h*+/*TM3*, *Bd*⁵) in *Drosophila melanogaster* Larvae Treated with the Dry Decoction of *Myracrodruon urundeuva* Leaves and Negative Control (Distilled Water)

Spots frequency per fly, number of spots, statistical diagnosis ^a											
Negative control and <i>MMyacrodruon urundeuva</i> doses (mg/mL)	No. of flies (N)	Spots frequency per fly, number of spots, statistical diagnosis ^a					Total spots (<i>m</i> = 2)	Twin spots (<i>m</i> = 5)	Total <i>mw h</i> clones ^c (<i>n</i>)	Recombination % ^d	Mutation % ^e
		Small single spots ^b (1–2 cells; <i>m</i> = 2)	Large single spots ^b (>2 cells; <i>m</i> = 5)								
<i>MH (mw h/ flr⁻³)</i>											
Negative control	44	0.57 (25)	0.00 (00)	0.00 (00)	0.00 (00)	0.57 (25)			25		
0.5	44	0.75 (33)	i	0.16 (07)	0.05 (02)	0.95 (42)	+		40	9.47	90.53
1.0	44	0.84 (37)	i	0.20 (09)	0.00 (00)	1.05 (46)	+		46	26.67	73.33
2.0	44	0.82 (36)	i	0.32 (14)	0.00 (00)	1.14 (50)	+		50	38.60	61.40
4.0	44	1.07 (47)	+	0.16 (07)	0.05 (02)	1.27 (56)	+		54	47.24	52.76
8.0	44	1.14 (50)	+	0.16 (07)	0.02 (01)	1.32 (58)	+		57	0	100
16.0	44	1.20 (53)	+	0.23 (10)	0.02 (01)	1.45 (64)	+		63	0	100
<i>BH (mw h/ TM3)</i>											
Negative control	45	0.51 (23)		0.02 (01)	f	0.53 (24)			24		
0.5	45	0.93 (42)	+	0.11 (05)	i	1.04 (47)	+		47		
1.0	45	1.27 (57)	+	0.07 (03)	i	1.33 (60)	+		60		
2.0	45	1.44 (65)	+	0.13 (06)	i	1.58 (71)	+		71		
4.0	45	1.69 (76)	+	0.18 (08)	+	1.87 (84)	+		84		
8.0	45	1.76 (79)	+	0.16 (07)	+	1.32 (58)	+		90		
16.0	45	2.00 (90)	+	0.23 (10)	+	1.45 (64)	+		97		

^aStatistical diagnosis according to Frei and Würzler (1988). Levels of significance $\alpha = 0.05$.

^bIncluding rare single-spot *flr*³.

^cConsidering *mw h* clones for single-spot *mw h* and for twin spots.

^d% of recombination = $1 - ([\text{frequency of total spots in individuals } mw h/TM3] / [\text{frequency of total spots in individuals } mw h/flr^3]) * 100$.

^e% of mutation = $1 - (\% \text{ of recombination})$.

^fOnly *mw h* single spots can be observed in *mw h*/*TM3* heterozygotes as the balancer chromosome *TM3* does not carry a *flr*³ mutation.

Abbreviations: +, positive; –, negative; i, inconclusive; m, multiplication factor for evaluation of significantly negative results.

gallotannins, and polar flavonoids in the studied decoction should be an important information regarding the safety and possible biological activities related to the presence of these ubiquitous compounds. Other studies on plant extracts with high tannin content showed the absence of genotoxicity and antigenotoxic effect in Ames test using *S. typhimurium* as reported by Sousa et al. (2003), and the same plant showed moderate genotoxicity in the report of Vilar et al. (2010). Instant coffee has been shown to be genotoxic in Ames test due to its phenolic content (Duarte et al. 1999), while it is reported as antigenotoxic and antimutagenic in *D. melanogaster* wing-spot test (Abraham 1994; Nagpal and Abraham 2019) and in mice micronucleus (Abraham 1989; Geriyol et al. 2015). As a rule, tannins are very toxic to bacteria and for this reason the Ames test may not be the best option to evaluate the genotoxicity of plant extracts with high tannin content (Field and Lettinga 1992).

Although the presence of phenolic acid derivatives and flavonoids in medicinal plants and THPs are usually considered beneficial due to their antioxidant activity and other biological properties, many studies have reported the toxic effects of those compounds when they are ingested at levels higher than those found in a typical vegetarian diet (Duthie et al. 1997; Skibola and Smith 2000; Hobbs et al. 2015). Ubiquitous compounds as tannic, ellagic and gallic acids, and the flavonoid myricetin, have shown genotoxicity on *S. typhimurium*, *D. melanogaster*, Chinese hamster cell line B14, and also on human lymphocytes (Lehmann et al. 2000; Labieniec and Gabryelak 2003; Buyukleyla et al. 2012; Hobbs et al. 2015). These genotoxic effects could explain the association between the ingestion of high amounts of tannin-rich herbal teas and the development of esophageal cancer (Kapadia et al. 1983; Oterdoom 1985). Based on results of clinical trials showing an increasing in lung and skin cancer associated with antioxidant consumption, Lu et al. (2013) showed the genotoxic and mutagenic effects due to a reductive damage mechanism in cellular processes induced by epigallocatechin gallate, the most abundant flavonoid found in green tea, often used as an antioxidant supplement.

Sponchiado et al. (2016) reviewed 486 articles published between 2000 and 2015 dealing with the evaluation of genotoxicity of medicinal plants and more than a quarter of the articles revealed positive genotoxic results, showing the importance of the genotoxicity approach with medicinal plants and THPs. Considering the findings of positive genotoxic and mutagenic results here presented and the previous reports on the preclinical toxicity of *M. urundeuva* extracts (Carlini et al. 2010 2013; Oliveira et al. 2016), we recommend caution in the internal use of *M. urundeuva* leaves.

In conclusion, *M. urundeuva* exerted genetic toxicity on somatic cells of *D. melanogaster* using the Comet assay and SMART protocols. *D. melanogaster* was an excellent

model organism to analyze genotoxicity and the results show that the genetic toxicity potential of *M. urundeuva* was manifested mainly as mutation events. Future studies should address the potential risks of the internal use of *M. urundeuva* leaves in other organisms.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.M. Ximenes and C. Rohde conceived the study. E.M. Amorim, R.M. Ximenes, E.R. Silveira, and C. Rohde designed the analyses. E.M. Amorim and C. Rohde analyzed the data with contributions from S.L. Santana, A.S. Silva, and N.C. Aquino. E.M. Amorim, R.M. Ximenes, and C. Rohde wrote all versions of the article with contributions from all other authors. All authors carefully read the final version of manuscript and approve of it.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the financial support of the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biodiversidade e Produtos Naturais (INCT BioNat), and Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ-UFPE). We also thank two anonymous reviewers for provided helpful comments on earlier drafts of the manuscript.

REFERENCES

- Abraham SK. 1989. Inhibition of in vivo genotoxicity by coffee. *Food Chem Toxicol* 27(12):787–792.
- Abraham SK. 1994. Antigenotoxicity of coffee in the drosophila assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis* 9(4):383–386.
- Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida AL, Monteiro JM, Lins-Neto EMF, Melo JG, Santos JP. 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 114:325–354.
- Allocca M, Zola S, Bellosta P. 2018. The fruit fly, *Drosophila melanogaster*: Modeling of human diseases (part II). In: Perveen FK, editor. *Drosophila melanogaster—Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics*. London, U.K.: InTech. pp. 131–156 DOI: 10.5772/intechopen.73199.
- Andrade HHR, Lehmann M. 2003. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, editors. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Editora da ULBRA; pp. 281–307.
- Aquino NC, Queiroz EF, Marcourt L, Freitas LBN, Araújo EVO, Leal LKAM, Bezerra AME, Boccard J, Wolfender JL, Silveira ER. 2019. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the decoction from leaves of a cultivated specimen of *Myracrodruon urundeuva*. *J Braz Chem Soc* 30:1616–1623.
- Azqueta A, Collins AR. 2013. The essential comet assay: A comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol* 87:949–968.
- Bolognesi C, Castoldi AF, Crebelli R, Barthélémy E, Maurici D, Wölflé D, Volk K, Castle L. 2017. Genotoxicity testing approaches

- for the safety assessment of substances used in food contact materials prior to their authorization in the European Union. *Environ Mol Mutagen* 58:361–374.
- Boullata JJ, Pharm D, Nace AM, Pharm D. 2000. Safety issues with herbal medicine. *Pharmacotherapy* 20:257–269.
- Brasil. 2006. Presidência da República. Decreto no. 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. Brasília, 23 jun 2006. Seção 1:2–4.
- Brasil. 2008. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa No 6, de 23 de setembro de 2008. www.mma.gov.br/estruturas/179/arquivos/179_05122008033615.pdf. Accessed 17 April 2019.
- Buyukleyla M, Azirak S, Rencuzogullari E, Kocaman AY, Ila HB, Topaktas M, Darici C. 2012. The genotoxic and antigenotoxic effects of tannic acid in human lymphocytes. *Drug Chem Toxicol* 35(1):11–19.
- Carlini EA, Duarte-Almeida JM, Rodrigues E, Tabach R. 2010. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-Praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). *Rev Bras Farmacogn* 20(2):140–146.
- Carlini EA, Duarte-Almeida JM, Tabach R. 2013. Assessment of the toxicity of the Brazilian pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-Praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira-do-sertão). *Phytother Res* 27:692–698.
- Carmona ER, Díaz MR, Parodi J, Blancheteau CI. 2017. Antimutagenic evaluation of traditional medicinal plants from South America *Peumus boldus* and *Cryptocarya alba* using *Drosophila melanogaster*. *J Toxicol Environ Health A* 80(4):208–217.
- Cecilio AB, Oliveira PC, Caldas S, Campana PRV, Francisco FL, Duarte MGR, Mendonça LAM, Almeida VL. 2016. Antiviral activity of *Myracrodruon urundeuva* against rotavirus. *Rev Bras Farmacogn* 26(2):197–202.
- Chaudhary P, Dhande S. 2018. Evaluation of neuroprotective effect of medicinal plants in *Drosophila melanogaster* model. *Indian J Pharm Biol Res* 6(3):9–12.
- Collins AR, Osoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Štětina R. 2008. The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis* 23(3):143–151.
- Cunha KS, Reguly ML, Graf U, Andrade HHR. 2001. Taxanes: The genetic toxicity of paclitaxel and docetaxel in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 16:79–84.
- Debbiea S, Graeme L, Pierrec D, Elizabethd W, Kelvin C. 2012. Pharmacovigilance of herbal medicine. *J Ethnopharmacol* 140(3): 513–518.
- Doke SK, Dhawale SC. 2015. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm J* 23:223–229.
- Duarte MP, Laires A, Gaspar J, Leão D, Oliveira JS, Rueff J. 1999. Genotoxicity of instant coffee: Possible involvement of phenolic compounds. *Mutat Res* 442(1):43–51.
- Duthie SJ, Johnson W, Dobson VL. 1997. The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells. *Mutat Res* 390(1–2):141–151.
- EFSA—Scientific Committee. 2011. Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA J* 9:2379–2447.
- Ekor M. 2013. The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front Pharmacol* 4(177):1–10.
- EMA—European Medicines Agency. 2008. Guideline on the assessment of genotoxicity of herbal substances/preparations. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-assessment-genotoxicity-herbal-substances/preparations_en.pdf)
- [assessment-genotoxicity-herbal-substances/preparations_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-assessment-genotoxicity-herbal-substances/preparations_en.pdf). Accessed 17 April 2019.
- Fernandes LM, Guterres ZR, Almeida IV, Vicentini VEP. 2017. Genotoxicity and antigenotoxicity assessments of the flavonoid vitexin by the *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test. *J Med Food* 20(6):601–609.
- Field JA, Lettinga G. 1992. Toxicity of tannic compounds to microorganisms. *Plant polyphenols*. Plenum Press 59:673–692.
- Figueredo FG, Lucena BFF, Tintino SR, Matias EFF, Leite NF, Andrade JC, Nogueira LFB, Morais EC, Costa JGM, Coutinho HDM, et al. 2014. Chemical composition and evaluation of modulatory of the antibiotic activity from extract and essential oil of *Myracrodruon urundeuva*. *Pharm Bio* 52(5):560–565.
- Frei H, Würzler FE. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive results. *Mutat Res* 203:297–308.
- Geriyl P, Basavanneppa HB, Dhananjaya BL. 2015. Protecting effect of caffeine against vinblastine (an anticancer drug) induced genotoxicity in mice. *Drug Chem Toxicol* 38(2):188–195.
- Glei M, Schneider T, Schlörmann W. 2016. Comet assay: An essential tool in toxicological research. *Arch Toxicol* 90:2315–2336.
- Graf U, Singer D. 1992. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev Int Contam Ambient* 8(1):15–27.
- Graf U, Würzler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 6(2):153–188.
- Hobbs CA, Swartz C, Maronpot R, Davis J, Recio L, Koyanagi M, Hayashi S. 2015. Genotoxicity evaluation of the flavonoid, myricitrin, and its aglycone, myricetin. *Food Chem Toxicol* 83:283–292.
- Jandú JJB, Silva LCN, Pereira APC, Souza RM, Silva Júnior CA, Figueiredo RCBQ, Araújo JM, Correia MTS, Silva MV. 2013. *Myracrodruon urundeuva* bark: An antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxic agent. *J Med Plants Res* 7(8):413–418.
- Kapadia GJ, Rao GS, Morton JF. 1983. Herbal tea consumption and esophageal cancer. In: Stich HF, editor. *Carcinogens and Mutagens in the Environment*, Vol. 3. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 3–12.
- Kastenbaum MA, Bowman KO. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 9:527–549.
- Klapacz J, Gollapudi BB. 2019. Considerations for the use of mutation as a regulatory endpoint in risk assessment. *Environ Mol Mutagen*. <https://doi.org/10.1002/em.22318> (in press).
- Labieniec M, Gabryelak T. 2003. Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14. *Mutat Res* 539:127–135.
- Lehmann M, Graf U, Reguly ML, Andrade HHR. 2000. Interference of tannic acid on the genotoxicity of mitomycin C, methylmethanesulfonate, and nitrogen mustard in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 36:195–200.
- Lenz S, Karsten P, Schulz JB, Voigt A. 2013. *Drosophila* as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 127(4):453–460.
- Lindsley DL, Zimm GG. 1992. *The Genome of Drosophila melanogaster*, Vol. 1133. New York, NY: Academic Press.
- Lorenzi H, Matos FJA. 2002. *Plantas medicinais do Brasil: Nativas e exóticas*. Nova Odessa, Brazil: Plantarum.
- Lu LY, Ou N, Lu QB. 2013. Antioxidant induces DNA damage, cell death and mutagenicity in human lung and skin normal cells. *Sci Rep* 3:1–11.
- Monteiro JM, Albuquerque UP, Lins-Neto EMF, Araújo EL, Amorim ELC. 2006. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. *J Ethnopharmacol* 105:173–186.

- Moreira DDL, Teixeira SS, Monteiro MHD, De-Oliveira ACAX, Paumgarten FJR. 2014. Traditional use and safety of herbal medicines. *Rev Bras Farmacogn* 24:248–257.
- Nagpal I, Abraham SK. 2019. Coffee mitigates cyclophosphamide-induced genotoxic damage in *Drosophila melanogaster* germ cells. *Drug Chem Toxicol* 42(5):502–508.
- Olive PL, Banath JP. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 1:23–29.
- Oliveira FA, Rorato VC, Almeida-Apolonio AA, Rodrigues AB, Barros AL, Sangalli A, Arena AC, Mota JS, Grisolia AB, Oliveira KMP. 2017. *In vitro* antifungal activity of *Myracrodruon urundeuva* Allemão against human vaginal *Candida*. *An Acad Bras Cienc* 89(3):2423–2432.
- Oliveira JMG, Pereira LJC, Moura ER, Sousa MRSC, Sales PAB, Silva SMMS, Lira SRS, Costa APR. 2016. Subacute toxicity of *Myracrodruon urundeuva* leave ethanolic extract and its effects on the estrous cycle of female Wistar rats. *Rev Bras Pl Med* 18: 539–546.
- Ostling O, Johanson KJ. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123:291–298.
- Oterdoom HJ. 1985. Tannin, sorghum and oesophageal cancer. *Lancet* 2 (8450):330.
- Pandey UB, Nichols CD. 2011. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev* 63:411–436.
- Rand MD. 2010. Drosophotoxycology: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. *Neurotoxicol Teratol* 32:74–83.
- Rashed K, Anthonissen R, Cappoen D, Verschaeve L. 2015. Phytochemical composition and potential genotoxic effects of important Egyptian medicinal plants. *Phcog Commn* 5(3):207–216.
- Resende FA, Campos DL, Silva VC, Grandis RA, Souza LP, Junior CSL, Rocha CQ, Santos LC, Vilegas W, Varanda EA. 2015. Mutagenicity and chemopreventive activities of *Astronium* species assessed by Ames test. *Regul Toxicol Pharmacol* 72:506–513.
- Rodrigues CR, Plentz LC, Marcucci MC, Dihl RR, Lehmann M. 2016. *In vivo* evaluation of mutagenic and recombinogenic activities of Brazilian propolis. *Food Chem Toxicol* 96:117–121.
- Rodrigues CRF, Plentz LC, Flores MDA, Dihl RR, Lehmann M. 2017. Assessment of genotoxic and antigenotoxic activities of artemisinin C in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol* 101:48–54.
- Sá RA, Gomes FS, Napoleão TH, Santos NDL, Melo CML, Gusmão NB, Coelho LDL, Paiva PMG, Bieber LW. 2009. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *Wood Sci Technol* 43:85–95.
- Siddique HR, Chowdhuri DK, Saxena DK, Dhawan A. 2005. Validation of *Drosophila melanogaster* as an *in vivo* model for genotoxicity assessment using modified alkaline comet assay. *Mutagenesis* 20:285–290.
- Silva VC, Napolitano A, Eletto D, Rodrigues CM, Pizze C, Vilegas W. 2011. Characterization of gallotannins from *Astronium* species by flow injection analysis-electrospray ionization-ion trap-tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom* 17(4): 365–375.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191.
- Skibola CF, Smith MT. 2000. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med* 29:375–383.
- Sousa NC, Carvalho S, Spanó MA, Graf U. 2003. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 41(4):293–299.
- Souza SMC, Aquino LCM, Milach Junior AC, Bandeira MAM, Nobre MEP, Viana GSB. 2007. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (*Anacardiaceae*) in rodents. *Phytoth Res* 21:220–225.
- Sponchiado G, Adam ML, Silva CD, Soley BS, Mello-Sampayo C, Cabrini DA, Correr CJ, Otuki MF. 2016. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. *J Ethnopharmacol* 178:289–296.
- Tiburi M, Reguly ML, Schwartzmann G, Cunha KL, Lehmann M, Andrade HHR. 2002. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 519:141–149.
- Tickoo S, Russell SS. 2002. *Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery and pathway screening. *Curr Opin Pharmacol* 2 (5):555–560.
- Verçosa CJ, Moraes-Filho AV, Castro IFA, Santos RGD, Cunha KS, Silva DME, Garcia ACL, Navoni JA, Amaral VSD, Rohde C. 2017. Validation of comet assay in Oregon-R and wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. *Ecotoxicol Environ Safe* 141:148–153.
- Vilar JB, D'Oliveira MIP, SDC S, Chen-Chen L. 2010. Cytotoxic and genotoxic investigation on barbatimão [*d* (Mart) Coville, 1910] extract. *Braz J Pharm Sci* 46:687–694.

Accepted by—
G. Umbuzeiro