



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS

INSTITUTO BIOMÉDICO – IB
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR – DGBM

Isabella Leite Coscarella

Avaliação toxicológica de extrato aquoso de
Cyrtopodium glutiniferum

Rio de Janeiro

2017

Avaliação toxicológica de extrato aquoso de *Cyrtopodium glutiniferum*

Monografia submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina, pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

Rio de Janeiro
2017

Coscarella, Isabella Leite

Avaliação Toxicológica de extrato aquoso de *Cyrtopodium glutiniferum* / Isabella Leite Coscarella; Orientadora: Profa. Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub. Rio de Janeiro, 2017

fl. : il

Monografia de graduação em Bacharelado em Biomedicina –
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Palavras-chave: *Cyrtopodium*, Etnofarmacologia, Fitoterapia, Toxicologia, Antioxidante, Mutagênico.

Isabella Leite Coscarella

Avaliação toxicológica de extrato aquoso de *Cyrtopodium glutiniferum*

Orientador acadêmico: Prof. Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO

Orientador científico: Msc. Carlos Fernando Araújo Lima de Oliveira
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Cláudia Alessandra Fortes Aiub

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof. MSc. Carlos Fernando Araújo Lima de Oliveira

Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Prof. Dra. Andrea Furtado Macedo

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Prof. Dra. Ana Teresa Nogueira Dumans

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Rio de Janeiro
2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que me apoiam, me amam e compartilham todos meus mais sinceros sonhos, um por um.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, a Deus, por me possibilitar a sonhar, me dar forças e de me acompanhar nesta caminhada até aqui.

À professora e orientadora Dra. Claudia Alessandra Fortes Aiub pela oportunidade de crescimento em seu laboratório e por fazer parte deste grupo tão forte. Ao Prof. Dr. Israel Felzenszwalb pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Mutagênese Ambiental e a toda sua equipe. Ao co-orientador Msc. Carlos Fernando Araújo Lima, por me orientar e acompanhar sempre que possível e atender a qualquer pedido. À prof. Dra. Andrea Furtado Macedo por ceder a amostra da qual o projeto foi desenvolvido e aceitar o convite à compor a banca avaliadora. À prof. Dra. Ana Teresa Nogueira Dumans, pela oportunidade de participar da monitoria da sua disciplina e também o aceite para compor a banca avaliadora. Aos professores Dante Machado, Ângelo Telésforo Malaquias, Adenilson Fonseca, Agostinho Lima e Silva que me fizeram acreditar e me apaixonar mais ainda pela profissão que escolhi, e demais professores e servidores da UNIRIO por possibilitar meu aprendizado e formação.

À minha família, os pais Alexandre Coscarella e Simone Coscarella, à vocês, devo a vida, o amor e apoio incondicionais independente da distância, e pela força nos momentos difíceis.

Ao melhor grupo de laboratório em que eu podia pensar em fazer parte que se tornaram mais do que simples amigos, compartilhando conhecimento, experiências e dificuldades, Guilherme Chaves, Gabriela Rosa, Uyla Garcia e Ayke Adnet. Aos demais sinceros amigos que conheci durante o curso, Vicente Pires, Maíra Torres, Letícia Kobayashi, Gabriel Silveira, e outros do grupo de amigos chamado “Peraltas”. Aos amigos fora da UNIRIO, por sempre me apoiarem e me ouvirem, dentre os quais Jéssica Batista, Geraldo Medeiros, Guilherme Lucas, Jaciara Otogalli, Vagner Gratal, Germana Oliveira e Priscila Martins.

A todos que ajudaram e me apoiaram em todos momentos, bons e ruins na minha caminhada até hoje, esse trabalho e minha formação aconteceu graças a suas contribuições. Por fim, agradeço a UNIRIO pelos incentivos na forma de bolsas e contribuições como instituição.

“Enfeite-se com margaridas e ternuras
E escove a alma com flores
Com leves fricções de esperança
De alma escovada e coração acelerado
Saia do quintal de si mesmo
E descubra o próprio jardim...”.
Artur da Távola

RESUMO

COSCARELLA, Isabella Leite. *Avaliação toxicológica de extrato aquoso de *Cyrtopodium glutiniferum**. 2017. 56f. Monografia (Bacharel em Biomedicina) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Cyrtopodium é um gênero botânico pertencente à família *Orchidaceae*. Estas orquídeas possuem importância por apresentar vários componentes químicos como alcalóides, flavonóides, fenantrenos e terpenóides. Estes compostos são conhecidos por ações tais como diuréticos, antiinflamatórios, anticarcinogênicos, anticonvulsivos, antivirais, neuroprotetores, hipoglicêmicos, antireumáticos e antimicrobianos. Em vista do possível uso para criação de novos produtos terapêuticos deve-se realizar testes para assegurar sua segurança e seu efeito terapêutico, antes que seja disponibilizada à população. Então, foi preconizado pela OECD como primeiro nível o teste de Ames, e em segundo nível o teste do micronúcleo, que são testes de rastreio toxicológico para os potenciais genotóxicos de compostos. Após estes ensaios, foi pesquisado o perfil antioxidante do extrato com ensaios de natureza química como os métodos de quantificação de antioxidantes indiretos Folin-Ciocalteu e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Na primeira etapa de avaliação de toxicidade e genotoxicidade utilizando-se linhagens de cepas bacterianas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium pode-se concluir que não foram detectados efeitos de mutagenicidade. Na segunda etapa de avaliação de toxicidade foi realizado o teste Micronúcleo onde foi observado aumento do metabolismo celular indicado pelo aumento do índice mitótico e a amostra não foi considerada genotóxica. O conteúdo fenólico total foi determinado pela técnica Folin-Ciocalteu e foi observado um teor de polifenóis de 3,24 mg de catecol/g de amostra. Para avaliação do efeito antioxidante da amostra, foi realizado DPPH e a partir deste foi observado que a concentração eficiente de *Cyrtopodium* é de 144 µg/mL.

Palavras-chave: *Cyrtopodium*, Etnofarmacologia, Fitoterapia, Toxicologia, Antioxidante, Mutagênico.

ABSTRACT

COSCARELLA, Isabella Leite. *Toxicological evaluation of aqueous extract of *Cyrtopodium glutiniferum**. 2017. 56p. Monograph (Bachelor of Biomedicine) - Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Cyrtopodium is a botanical genus belonging to the family Orchidaceae. These orchids are important because they present various chemical components such as alkaloids, flavonoids, phenanthrene and terpenoids. These compounds are known for actions such as diuretics, anti-inflammatories, anticarcinogenics, anticonvulsants, antivirals, neuroprotectors, hypoglycemics, antirheumatics and antimicrobials. In view of the possible use for the creation of new therapeutic products, tests should be performed to ensure its safety and its therapeutic effect, before it is made available to the population. The Ames test was then recommended by the OECD as the first level, and the second level of the micronucleus test, which are toxicological screening tests for the genotoxic potentials of compounds. After these tests, the antioxidant profile of the extract was investigated with chemical tests such as the methods of quantification of indirect antioxidants Folin-Ciocalteu and DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl). In the first stage of evaluation of toxicity and genotoxicity using strains of bacterial strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium it can be concluded that no mutagenicity effects were detected. In the second stage of toxicity evaluation, the Micronucleus test was performed, where an increase in the cellular metabolism indicated by the increase in the mitotic index was observed and the sample was not considered genotoxic. The total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu technique and a polyphenol content of 3.24 mg of catechol / g of sample was observed. To evaluate the antioxidant effect of the sample, DPPH was performed and from this it was observed that the efficient concentration of *Cyrtopodium* is 144 µg / mL.

Keywords: *Cyrtopodium*, Ethnopharmacology, Phytotherapy, Toxicology, Antioxidant, Mutagenic.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHT	Hidroxitolueno de butila
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Meio mínimo Eagle modificado
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EAG	Ácido Gálico
<i>HIS</i>⁺	Histidina Revertentes
<i>HIS</i>⁻	Histidina Deficiente
IM	Índice de Mutagenicidade
MI	Mc Ilvane
MN	Micronúcleo
MNNG	1-Metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina
MMS	Metilmetano sulfonado
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
SFB	Soro Fetal Bovino
S9	Homogenato de fígado de Ratos Sprage-Dawley

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Mapa da distribuição do gênero <i>Cyrtopodium</i> no Brasil	Página 19
Figura 2	Espécie <i>Cyrtopodium glutiniferum</i> Raddi	Página 21

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Perfil de reversão das cepas utilizadas no teste de Ames	Página 29
Tabela 2	Resultados do ensaio de reversão bacteriana sem ativação metabólica	Página 36
Tabela 3	Resultados do ensaio de reversão bacteriana com ativação metabólica	Página 38

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Ensaio de Micronúcleo de exposição por 3 horas	Página 39
Gráfico 2	Ensaio de Micronúcleo de exposição por 24 horas	Página 40
Gráfico 3	Curva de capacidade captadora de radicais livres	Página 41
Gráfico 4	Equação da reta do ensaio FCR	Página 42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Fitoterapia	15
1.2	<i>Cyrtopodium</i> sp.	17
1.3	Segurança de produtos de uso humano e animal	22
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	METODOLOGIA	26
3.1	Extração e diluição de extrato	26
3.2	Teste de Ames (reversão bacteriana)	27
3.2.1	Proliferação de bactéria	27
3.2.2	Ensaio de Ames	30
3.3	Teste de Micronúcleo	32
3.4	Teste Folin-Ciocalteu (FCR)	34
3.5	Teste DPPH (Capacidade captadora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila)	35
4	RESULTADOS	36
4.1	Ensaio de reversão bacteriana ou Teste de Ames	36
4.2	Ensaio de Micronúcleo	39
4.3	Ensaio DPPH	41
4.4	Ensaio Folin-Ciocalteu (FCR)	42
5	DISCUSSÃO	443
5.1	Ensaio de reversão bacteriana ou Teste de Ames	443
5.2	Ensaio Micronúcleo (MN)	44
5.3	Quantificação de polifenóis totais	46
5.4	Avaliação da capacidade sequestradora do radical DPPH	48
6	CONCLUSÃO	50
7	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fitoterapia

A fitoterapia é a utilização de plantas para tratamentos medicinais. A palavra se origina do grego *therapeia* que significa tratamento e *phyton*, vegetal. É considerada fitoterápica toda preparação farmacêutica (extratos, tinturas, pomadas, cápsulas e outras formas farmacêuticas) que utiliza como matéria-prima componentes vegetais (folhas, caules, raízes, flores e sementes) de conhecido efeito farmacológico (CHINSAMY et al., 2014; AUBERON et al., 2016).

Desde a antiguidade, o uso de plantas medicinais foi a chave para agentes terapêuticos por todo o mundo, especialmente entre comunidades rurais e países em desenvolvimento cujo sistema de saúde não é totalmente disponível à população, ou não possui atendimento suficiente a toda população (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; DIAS et al., 2012).

A pesquisa por constituintes ativos presentes nas plantas medicinais só teve início do século XIX, com posterior encaminhamento para o desenvolvimento de fármacos com as características que conhecemos atualmente (HARVEY, 2008). Friederich Serturmer, em 1806, foi o pioneiro em isolar um alcalóide da papoula (*Papaver somniferum*), a morfina, um evento que propiciou a pesquisa contínua de outros derivados de plantas com propriedades terapêuticas. Outro evento histórico no desenvolvimento da indústria farmacêutica foi a descoberta da salicina (analgésico e antipirético) por Raffaele Piria, em 1832, derivado do salgueiro branco (*Salix alba*). Em

1839, a primeira modificação estrutural foi feita, resultando no ácido salicílico, usado em tratamento da artrite reumatóide. E do ácido salicílico, Felix Hoffman sintetizou a aspirina, ácido acetilsalicílico, em 1897. Após, a famosa indústria Bayer foi criada na Alemanha, juntamente com a primeira patente na área farmacêutica (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Na última década, o uso das plantas medicinais teve um aumento substancial, tanto como agentes empregados na medicina tradicional, quanto como fonte de material para produção de suplementos alimentares (HARVEY, 2008). Notavelmente, os componentes derivados de plantas são frequentemente empregados na terapia moderna, em adição na síntese de moléculas mais complexas (CRAGG; NEWMAN, 2014). É estimado que em torno de 25% dos medicamentos disponíveis atualmente são derivados naturais, tanto de plantas como de microrganismos, e em algumas áreas especificamente, como a oncologia, a estimativa para exclusivamente o uso de derivados de plantas aumenta e chega aos 60% (CALIXTO, 2000; DIAS et al., 2012; CRAGG; NEWMAN, 2014).

As plantas medicinais ainda representam importante fonte de novas identidades moleculares, particularmente, plantas podem sintetizar componentes que são difíceis de obter por síntese química (HARVEY, 2008). Os componentes obtidos por fonte natural ainda podem servir de protótipos para novos fármacos de atividade biológica e terapêutica ou para serem modificados para se criar novos ativos mais efetivos ou menos tóxicos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% das pessoas no mundo fazem uso de plantas medicinais. Um grande número de

propriedades farmacológicas e biológicas das plantas medicinais demonstram seu potencial terapêutico para o tratamento de diversas doenças (DIAS et al., 2012).

1.2 *Cyrtopodium* sp.

Apesar de uma química pouco conhecida, um fator importante sobre as orquídeas é o seu uso na fitoterapia. Ao longo dos séculos, muitos benefícios à saúde humana foram atribuídos ao uso de extratos de orquídeas. Entre estes benefícios encontramos propriedades diuréticas, relaxantes, antirreumáticas, anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, antimicrobianas, antivirais, hipoglicemiante, anticonvulsivante e neuroprotetora (YONZONE et al., 2012; SILVA, 2013; CHINSAMY et al., 2014). As propriedades etnofarmacológicas das orquídeas são utilizadas em muitas partes do mundo, no tratamento de inúmeras doenças como as de pele, respiratórias e infecciosas, problemas relacionados com o trato digestivo, órgãos reprodutores, circulação, propriedade antitumoral, anticonceptivo e antipirético (SILVA, 2013).

As principais atividades farmacológicas registradas estão relacionadas aos extratos e metabólitos dessas plantas e a maior parte dos trabalhos relacionados a orquídeas com propriedades medicinais estão restritos às espécies asiáticas e européias, com poucos estudos feitos com plantas brasileiras (YONZONE et al., 2012; CHINSAMY et al., 2014). Os registros indicam que espécies de orquídeas eram utilizadas como fonte de fármacos fitoterápicos desde 2800 a.C., na China. Um total de 365 vegetais, incluindo várias orquídeas, está listado na antiga “Matéria Médica Chinesa”, do

Imperador Shen Nung Pen-tsoo Ching, conhecido e venerado na China como o “Pai da Medicina Chinesa” (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; DUTRA et al., 2016).

O *Cyrtopodium* é um gênero Neotropical, uma orquídea nativa do sul do estado da Flórida e suas populações selvagens distribuem-se também no México, Índias Ocidentais, América Central e Sul (WEREMIJEWICZ et al., 2016). O Brasil é o país com o maior número de espécies neste gênero, com 39, seguido por Bolívia e Venezuela, com nove espécies cada, Paraguai, com seis e Suriname e Guiana com quatro espécies cada. Destas 39 espécies do Brasil, 25 são endêmicas, sendo o cerrado brasileiro, o maior foco de diversidade do gênero, comportando 29 espécies, das quais 13 são endêmicas deste bioma. O interesse no cultivo tem aumentado nos últimos anos, com o avanço da colonização nas áreas de cerrado do Brasil central, tornando muitas espécies disponíveis ao cultivo. Há muitos registros do uso de espécies de *Cyrtopodium* para fins medicinais (ROMERO-GONZÁLEZ; BIANCHETTI, 2008; RODRIGUES et al., 2015).

Figura 1 – Mapa da distribuição do gênero *Cyrtopodium* no Brasil

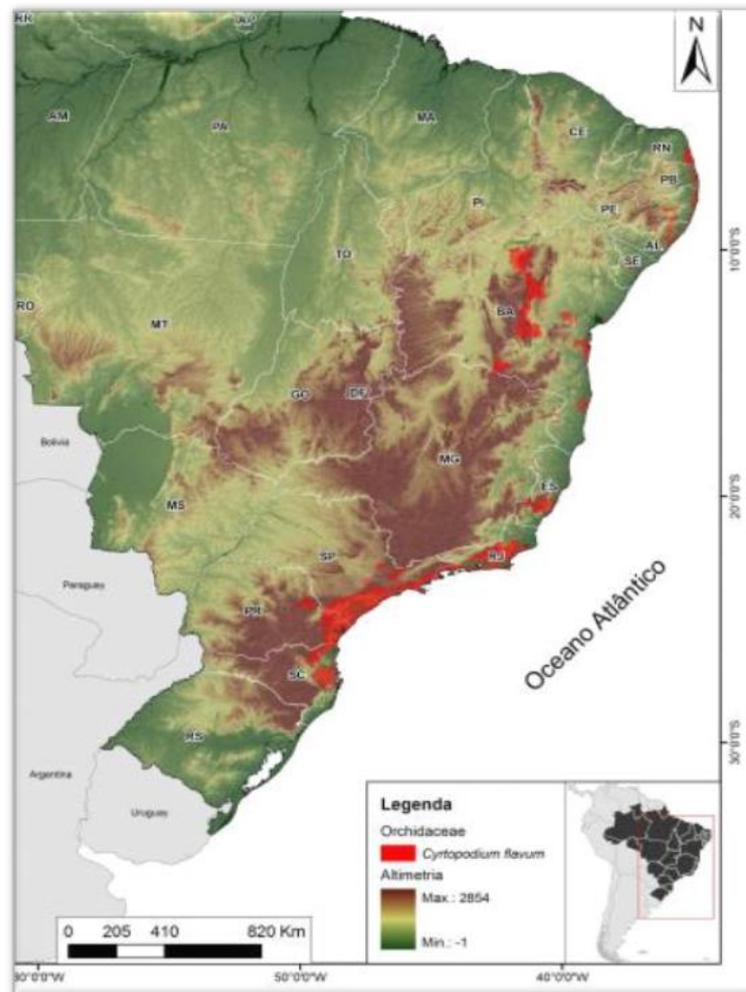


Figura 1: Mapa com distribuição do gênero *Cyrtopodium* no Brasil indicado pela região amarronzada as áreas com maior densidade de espécies. Na região em vermelho pode-se encontrar em maior abundância a espécie *Cyrtopodium flavum*. **Fonte:** Centro Nacional de Conservação da Flora – CNCFlora.

Este gênero possui base etnofarmacológica, como o *Cyrtopodium andersonii*, mais conhecida pelo nome popular ‘rabo-de-tatu’, usada como anti-inflamatório e analgésico, e *Cyrtopodium cardiochilum*, que no Brasil é utilizado para o tratamento de resfriados, tuberculose e hemoptise, uma expectoração de sangue proveniente dos pulmões, traqueia e brônquios, mais comumente

observável na tuberculose pulmonar (BARRETO; PARENTE, 2006). A espécie *Cyrtopodium glutiniferum* é uma orquídea encontrada em regiões montanhosas do estado de Minas Gerais e Rio de Janeiro no Brasil. Do ponto de vista medicinal, é conhecido que seus pseudobulbos contêm compostos anti-inflamatórios como glucomananas e outros compostos químicos potencialmente úteis para o uso terapêutico (BARRETO; PARENTE, 2006; PEREIRA et al., 2015). Outras espécies do gênero são utilizadas na forma de pomadas para o tratamento de lesões nas pálpebras; na forma de sumo para o tratamento de abscessos, foliculite, ou na forma de xaropes para tratar tosse e coqueluche (SILVA, 2013).

Apesar de poucas orquídeas brasileiras serem utilizadas para fins fitoterápicos, em contraste com tamanha diversidade de espécies, há no Brasil a produção de pomadas à base de *Cyrtopodium punctatum*, comercializadas como, por exemplo, a Pomada de *Cyrtopodium punctatum* D1, vendido pela Homeopatia Almeida Prado, e a Pomada de *Cyrtopodium punctatum*, vendido pela Homeopatia Sal da Terra, com indicações no auxílio do tratamento de fístulas, caxumba, flebite, furúnculos e inflamações fechadas. É provável que este produto seja produzido a partir de diversas espécies de *Cyrtopodium* brasileiras, popularmente chamadas de “Sumaré” (SILVA, 2013). Em 1926, Pio-Corrêa considerou o uso do sumo de *Cyrtopodium paranaensis* e *Cyrtopodium punctatum* para estancar sangue em cortes e lesões, além de cicatrizar ferimentos. Devido às suas propriedades medicinais, várias espécies do gênero são conhecidas popularmente com os nomes de ‘lanceta-milagrosa’, ‘bisturi-vegetal’ e ‘bisturi-do-mato’. O xarope fabricado dos bulbos de *Cyrtopodium punctatum* é utilizado como expectorante na recuperação de tosse seca, e

amenizações dos sintomas de bronquite e asma, já o seu suco é usado como um emoliente para fístolas, acnes, furúnculos, luxações, abscessos, epitelomas e queimaduras, por obter ação cicatrizante (ROMERO-GONZÁLEZ; BIANCHETTI, 2008; SILVA, 2013).

Na Argentina, nos distritos de Corrientes e Misiones, utilizam-se os pseudobulbos de *Cyrtopodium palmifrons*, de nome popular ‘Calaguala’ e ‘Calaguala macho’, para desordens pulmonares, infecções do trato urinário, e como emenagogo e antidarréico (DAVIÑA et al., 2009). Já no distrito de Tucumán, utiliza-se a planta inteira de *Cyrtopodium pflanzii* para o combate à tosse (SILVA, 2013). No Brasil há uma urgência para se coletar, documentar e salvar os recursos botânicos tropicais, pois com exceção da Amazônia, poucos estudos de plantas medicinais foram realizados em áreas como a Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado e Pantanal (STASI, DI et al., 2002).

Figura 2 – Espécie *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi



Figura 2: Espécie *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi utilizada como amostra. **Fonte:** Herbário das Orquídeas

Com tanta facilidade de acesso aos tratamentos terapêuticos propiciados pelo gênero *Cyrtopodium*, inclusive de registro no Ministério da Saúde, surpreende em função da quase total ausência de informações quanto ao perfil fitoquímico para este gênero.

1.3 Segurança de produtos de uso humano e animal

Na criação e inovação de química terapêutica devem ser realizados testes para assegurar sua segurança medicinal, em outras palavras, o cálculo do risco do aparecimento de eventos adversos indesejáveis ao usuário se faz necessário. Apesar de séculos do uso tradicional das plantas medicinais, aparentemente o suporte da crença sem fundamentos da segurança de uso destas plantas, a avaliação e qualificação da toxicidade não foi completamente verificada, juntamente com o potencial mutagênico, e inclusive em muitos casos, as plantas medicinais podem ser extremamente prejudiciais à saúde humana. Estudos revelam ainda que muitas plantas utilizadas terapêuticamente pelo uso popular medicinal podem ser potencialmente genotóxicas (ANANTHI et al., 2010; SPONCHIADO et al., 2016).

É extremamente importante avaliar anteriormente o perfil genotóxico durante os ensaios pré-clínicos de extratos e componentes de origem natural para verificar seu risco para segurança terapêutica, visto que, plantas medicinais podem ser amplamente usadas na medicina popular e no desenvolvimento de novas drogas (STASI, DI et al., 2002).

Cabe à competência científica estudar, testar e recomendar seu uso, antes que esta seja disponibilizada à população. Diretrizes em testes de

genotoxicidade em produtos farmacêuticos ou moléculas bioativas para uso humano foram estabelecidas na década de 1990 pela Organização para Cooperação de Desenvolvimento Econômico (OECD), e de acordo com essas diretrizes, todo produto deve ser avaliado e classificado de acordo com sua habilidade intrínseca de recuperação à saúde, ou seja, de seu efeito terapêutico benéfico. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe de resoluções que seguem as mesmas diretrizes de metodologias estabelecidas pela OECD para pré-avaliação de compostos de atividade biológica antes de serem disponibilizados à população.

Estudos sobre a genotoxicidade e anti-genotoxicidade podem avaliar a segurança e efeito dos produtos terapêuticos sintéticos e de origem natural (ROMERO-JIMÉNEZ et al., 2005). Estes testes ainda podem identificar plantas ou componentes naturais que são antagonistas ao efeito genotóxico, anti-mutagênico ou de efeito anti-cancerígeno (SPONCHIADO et al., 2016).

Diferentes metodologias, estratégias e ensaios foram desenvolvidos para identificar compostos químicos que podem ter o efeito carcinogênico. Estes protocolos foram baseados em estudos que demonstram a correlação entre genotoxicidade e mutagenicidade, e a correlação entre os dois parâmetros com a carcinogenicidade. A expressão de atividade mutagênica é a habilidade de um bioativo químico produzir alterações no DNA e é claramente conhecido como mecanismo crítico para o desenvolvimento de potencial carcinogênico (WATERS et al., 1999). As consequências de tal DNA modificado podem ser o estabelecimento de pré-disposição à doenças, aumento da mortalidade, mudanças nas características herdáveis passadas às gerações e o acometimento da capacidade reprodutiva (LÁZARO et al., 2010).

O primeiro nível de testes engloba ensaios moleculares em bactérias (mutação de gene bacteriano), o segundo se constitui de provas *in vitro* em células de cultivo (aberrações cromossômicas), o terceiro compreende análises *in vivo* (mutação gênica em células de mamíferos), e o último nível corresponde a estudos em populações expostas (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

Desde então, o estabelecimento destes procedimentos tem sido usados como avaliação do risco genotóxico associado com o uso de drogas, aditivos alimentares, praguicidas, químicos industriais e ambientais e também os produtos naturais, incluindo as plantas medicinais e seus óleos (WATERS et al., 1999; CHEN et al., 2008; SPONCHIADO et al., 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a segurança toxicológica do extrato aquoso de *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi como possível etnofármaco.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a mutagenicidade e toxicidade do *Cyrtopodium glutiniferum*;
- Avaliar riscos de mutação por danos cromossomiais;
- Quantificar componentes fenólicos na amostra;
- Avaliar a capacidade sequestrante de radicais livres.

3. METODOLOGIA

3.1. Extração e diluição de extrato

A espécie de orquídea *Cyrtopodium glutiniferum* foi coletada no parque Jardim Botânico pela professora Dra. Andrea Furtado Macedo e a partir do caule aéreo da planta conhecida por pseudobulbos, foi feita a extração segundo artigo de BARRETO; PARENTE, 2006, em água quente (2L) à 80°C, 1 kg dos pseudobulbos frescos de *Cyrtopodium glutiniferum* previamente cortados. O procedimento foi realizado por 1 hora sob agitação, o extrato aquoso foi filtrado em papel de filtro Whatmann (4mm) e liofilizado. Cedido gentilmente pela professora Dra. Andrea Furtado Macedo, foi então diluído em salina 0,9%, para que a partir da diluição concentrada fosse possível se fazer outras diluições a fim de se obter as concentrações desejadas para realização dos testes. Estas novas concentrações foram estocadas ao abrigo da luz, em freezer (-80°C) a fim de se manter os componentes presentes no extrato sem possível degradação.

3.2. Teste de Ames (reversão bacteriana)

3.2.1. Proliferação de bactéria

O primeiro teste utilizado para avaliar a toxicidade de compostos químicos é o ensaio de mutação reversa bacteriana ou Teste de Ames, que nos permite observar padrões de mutação pontual na estrutura do DNA (SPONCHIADO et al., 2016). Estas mutações podem ocorrer de forma pontual, onde apenas uma base é modificada ou por inserção ou exclusão de algumas bases, fazendo grandes rearranjos no DNA, como quebras ou rearranjos cromossômicos ou ganho e perda de cromossomos inteiros. No teste de Ames, as mutações genéticas são prontamente medidas em bactérias quando elas causam uma alteração no requisito de crescimento da célula, enquanto o dano cromossômico em célula de mamíferos normalmente é medido sob ampliação de quebras e rearranjos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Estes testes bacterianos têm desempenhado um importante papel nesta identificação, por serem testes simples, rápidos e de baixo custo, tanto quanto pela capacidade de reconhecer e detectar um amplo espectro de componentes mutagênicos. Além disto, há uma associação entre um agente ser mutagênico e genotóxico para bactéria e carcinogênico para mamíferos, com uma correlação estimada em 83% (AMES et al., 1973; OECD, 1997; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Este teste de reversão bacteriana utiliza-se cepas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium com mutações pré-existentes que desabilita a bactéria produzir o aminoácido requerido histidina, essencial para seu crescimento e formação de colônias. Estas cepas, portanto, quando em contato com componentes químicos mutagênicos, são capazes de sofrer novas mutações nestes sítios existentes ou próximo a eles de modo que acarretam à restauração da sua produção de histidina. Estas cepas com novo fenótipo irão crescer normalmente em meio deficiente de histidina e formar colônias que serão utilizadas na contagem como resultados positivos. Estas cepas utilizadas no teste de Ames têm mutações diferentes em vários *óperons*, e cada uma será responsável para detecção de um tipo de mutação (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Estas cepas então por possuírem diferentes sítios de mutações, possuem diferentes mecanismos de reversão. Suas características estão listadas na Tabela 1.

As concentrações utilizadas foram definidas de modo a detectar possíveis efeitos mutagênicos e valores intermediários. A recomendação da OECD é que se utilize como limite de dose o valor de 5000 µM ou 5000 µg/mL o que for alcançado primeiro, ou o limite da solubilidade para amostras pouco solúveis.

Tabela 1 – Perfil de reversão das cepas utilizadas no teste de Ames

Cepas	Loci de mutação	Evento de reservão
TA97	<i>hisD6610</i>	Deslocamento/Adição G:C
TA98	<i>hisD3052</i>	Deslocamento/Deleção G:C
TA100	<i>hisG46</i>	Substituição/ G:C ->A:T
TA102	<i>hisG428</i>	Substituição/ A:T->G:C
TA104	<i>hisG428</i>	Substituição/ A:T->G:C

Tabela 1: Cada cepa apresenta mutação em loci gênicos diferentes, capazes de detectar diferentes tipos de mutágenos, indutores de alterações por substituições de pares de bases. **Fonte:** Adaptado de MORTELMANS; ZEIGER, 2000.

A cepa TA97 apresenta uma mutação no *locus hisD6610*, identificando substâncias capazes de adicionar uma citosina (par C:G), esta cepa é capaz de identificar mutágenos que também podem ser identificados pela cepa TA98 e por isso o uso das duas se completam. A mutação induzida na cepa TA98 (deleção de par C:G) está localizada no *locus hisD3052*, importante para a síntese da enzima histidinol desidrogenase e essa mutação detecta mutágenos capazes de realizar adição ou deleção do pares C:G, tais como derivados de amina e nitro aromáticos. A mutação (substituição do par de base A:T por G:C) no *locus hisG46* da cepa TA100, substitui o aminoácido leucina por prolina, levando à deficiência na síntese de uma enzima importante na via da histidina, esta mutação é revertida por mudanças que causam substituição de pares de base, majoritariamente em pares G:C. Duas outras cepas foram utilizadas, estas não com mutações G:C mas do tipo A:T no *locus* mutante *his G428*, A cepa TA102 é a única que possui um par de bases extra no *locus* mutante o

qual foi inserido com o plasmídeo pAQ1, conferindo também resistência ao antibiótico Tetraciclina, sendo capaz de detectar mutações por substituição de pares A:T por C:G, todas as outras cepas possuem somente o plasmídeo pKM101, que confere resistência ao antibiótico Ampicilina. A cepa TA104 apresenta uma mutação no *locus hisG428* e pode reverter por substituição, transversão e transição os pares de bases A:T por C:G.

Antes de realizar a proliferação para o teste em si, foram verificados seus fenótipos com testes confirmatórios de sensibilidade ao ultra-violeta e antibióticos Ampicilina (8 mg/L) e Tetraciclina (8 mg/L). Estas colônias foram cultivadas em meio de cultivo *Louria-Bertani* (10 g/L bacto triptona, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L NaCl) líquido por 18 horas em orbitação (150 rpm) em temperatura de 37°C.

3.2.2. Ensaio de Ames

Para primeira etapa de avaliação da mutagenicidade foi utilizado o teste padrão ouro conhecido como teste de Ames (AMES et al., 1973; MORTELMANS; ZEIGER, 2000), sem e com ativação metabólica (S9), para qual foram incubados em tubos de ensaio, 100 µL de cada cepa de linhagens bacterianas de *Salmonella enterica* sarovar *Typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104 (2×10^8 células/ml) com 100 µL do extrato em seis concentrações (0,1 µg/placa; 0,5 µg/placa; 5,0 µg/placa; 50,0 µg/placa; 500,0 µg/placa e 5000,0 µg/placa) e salina 0,9% para controle negativo juntamente com 500 µL de tampão Fosfato de Sódio (0,2 M pH 7,4). Após pré-incubação de vinte minutos sob agitação, foram adicionados a cada tubo, 2 ml de Ágar de

superfície enriquecido com solução de Histidina e Biotina 0,5 mM, numa proporção de 10:1 (pH 7,4 à 45°C), e as misturas finais foram vertidas em placas de petri de Ágar *Vogel-Bonner* (10 g/L MgSO₄.7H₂O; 100 g/L C₆H₈O₇.H₂O; 500 g/L K₂HPO₄; 175 g/L Na(NH₄)HPO₄.4H₂O) e estas foram incubadas a 37° C durante 72 horas, o ensaio foi inteiramente realizado em triplicata. As colônias revertentes (*His*⁺) foram contadas, o Índice de Mutagenicidade (IM) representa a razão entre o valor médio de revertentes induzidos obtido a partir de cada concentração, dividido pelo valor médio de revertentes espontâneos no controle negativo. A amostra é considerada mutagênica quando o número de colônias revertentes é de, pelo menos, duas vezes o número de revertentes espontâneos (IM ≥ 2), e considerada citotóxica quando o Índice de Mutagenicidade é ≤ 0,6 juntamente com valores de sobrevivência menor que 70% quando comparados ao controle negativo.

Para determinar o potencial citotóxico, 10 µL da mistura pós-incubação sob agitação por 20 minutos foram diluídos em série em salina 0,9% (9 g/L NaCl), esta suspensão final, após diluição seriada, continha, para cada amostra, 2 x 10³ células/ml. Uma alíquota de 100 µL desta suspensão foi plaqueada em Ágar nutriente, resultando num número final estimado de 2 x 10² bactérias/placa. As placas foram então incubadas à 37°C durante 24 horas e porcentagens de sobrevivência foram calculadas em comparação com o grupo controle negativo, todos os testes foram realizados em triplicata.

A ativação metabólica (S9) ocorre pela substituição do tampão fosfato 0,2M pH 7,4 por metabolização exógena chamada fração S9 mix 4% (Molecular Toxicology Inc., Moltox™, EUA), esta constitui uma fração

microssomal que é preparada a partir de fígados de ratos machos SpragueDawley pré-tratados com Aroclor 1254 (bifenil-policlorinato), um indutor da síntese de conjunto de enzimas do sistema hepático, enzimas do complexo P450, em especial CYP1A e CYP2B.

A amostra é considerada citotóxica quando o Índice de Mutagenicidade (IM) é de valor $\leq 0,6$ juntamente com valores de sobrevivência menores que 70% quando comparados ao controle negativo, e é considerado resultado positivo para mutagenicidade quando o valor do IM ≥ 2 , (AMES et al., 1973; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

3.3. Teste de Micronúcleo

Como segundo ensaio foi utilizado o teste micronúcleo, este teste é amplamente utilizado em testes primários de toxicologia pela sua capacidade de avaliar genotoxicidade e ter a vantagem de ser simples e rápido na detecção de danos cromossômicos no DNA de nível cromossômico (HEDDLE et al., 1991; ZALACAIN et al., 2005). O teste de aberração cromossômica (CA) em células de mamíferos é exigido pelas diretrizes de genotoxicidade para avaliação de segurança química, embora o teste MN não possa fornecer informações sobre tipos de CAs estruturais, houve muitas tentativas para distinguir MNs causadas por aneugênese daqueles induzidos por clastogênese (MATSUSHIMA et al., 1999).

A formação de micronúcleos a partir de fragmentos cromossômicos ou cromatídicos acêntricos que não são incorporados ao núcleo da célula filha durante a divisão celular é indicativo da existência de alterações cromossômicas por agentes mutagênicos ou carcinogênicos. E sua frequência de encontro por agentes que originam quebras ou problemas no fuso mitótico se relaciona tanto com clastogênese como aneugênese. A partir deste teste então se detecta além da presença dos micronúcleos, a sobrevivência e o índice mitótico (AGOSTINI, 1993; ARAUJO-LIMA et al., 2017).

O teste Micronúcleo foi realizado *in vitro* utilizando linhagens de macrófagos da linha RAW 264.7 (HEDDLE et al., 1991; ARAUJO-LIMA et al., 2017). Foram adicionados 950 µL de meio de cultura DMEM suplementado com SFB a 37°C, e 50 µL de células em suspensão (2×10^5 células/mL) na placa de microtitulação, contendo lamínula circulares previamente tratadas com ácido nítrico 0,1 M, durante vinte minutos. As placas foram incubadas em atmosfera de CO₂ 5%, a 37°C *overnight* para garantir a adesão das células ao substrato. Após essa etapa, o meio foi retirado e foram adicionados 900 µL de meio de cultura fresco, não suplementado com SFB. Para o tratamento das células, 100 µL das cinco concentrações do extrato (0,5 µg /ml, 5 µg /ml, 50 µg /ml, 500 µg /ml e 5000 µg /ml) e salina 0.9% (9 g/L NaCl) para controle negativo foram adicionados e as placas foram incubadas durante 3 h e 24h. Após o período de incubação, o meio foi removido e as células foram lavadas com 1 mL de meio de cultura não suplementado, depois foram ressuspensos com 1 mL de meio suplementado com SFB (10%) e as células foram novamente incubadas durante 24 h na incubadora com 5% de CO₂ à 37°C. O controle positivo utilizado foi a Metilmetano sulfonado (MMS) (0,01mM) e a N-metil-N-

nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) (0,5 mM). Ao fim, o meio de cultura foi removido e substituído por uma solução fixadora de Carnoy (20 mL de metanol absoluto, com 5ml de Ácido Acético), à 4°C, durante 15 min. As células fixadas foram lavadas com solução tampão MI (21,01 g/L de ácido cítrico e 35,60 g/L Na₂HPO₄, pH 7,5) e secadas à temperatura ambiente. Os núcleos das células foram corados com uma solução DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol 0,2 µg/mL) por 40 min. Após este período, DAPI foi retirado e a placa lavada com tampão MI por 2 minutos e água destilada, deixando-se secar à temperatura ambiente. As lamínulas foram analisadas em um microscópio de fluorescência com um comprimento de onda de 350 nm, com sistema de captura de imagens digitais (FELZENSZWALB et al., 2013). Com os resultados foi realizado análise estatística por método de comparação múltipla chamado de teste ou procedimento de *Bonferroni*, que consiste na realização de um teste *t* para cada par de médias a uma taxa de erro por comparação.

3.4. Teste Folin-Ciocalteu (FCR)

Para determinar indiretamente o índice total de compostos fenólicos na amostra foi utilizado o teste Folin-Ciocalteu, em que a mistura de seus ácidos fosfowolfrâmico e forsfomolibdico se reduzem ao oxidar compostos fenólicos presentes na amostra originando óxidos wolfrâmio e molibdeno, de coloração azul (SINGLETON; ROSSI, 1985; MEZADRI et al., 2008). Foi realizada homogeneização de 2 mg do extrato em 1 mL de água destilada, e a mistura reacional foi de 50 µL das concentrações testadas do extrato e 25 µL de solução Folin (Merck), foi utilizado catecol como calibração na curva de

quantificação fenólica. Decorridos 5 minutos foram adicionados 125 µL de solução aquosa de Carbonato de Sódio (Na₂CO₃, Vetec, 99,5%) a 75 g/L. Após período de incubação de 2 horas a 30°C , foi feita leitura (µ-Quant, Bio-tek Instruments INC) da microplaca em comprimento de onda de 780 nm.

3.5. Teste DPPH (Capacidade captadora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

Este método é utilizado para analisar substâncias potencialmente possuidoras de polifenóis, portanto, altamente antioxidantes (RUFINO et al., 2007; HERALD et al., 2012; CARPES et al., 2013). Foram transferidas, em ambiente escuro, alíquotas de 100 µL de cada diluição do extrato ou padrão hidróxitolueno de butila (BHT) para microplaca com 100 µL de DPPH (0,25 µM). Foi utilizada como solução controle de álcool metílico e água como branco. Após 40 minutos, leituras foram feitas em comprimento de 517 nm. A capacidade percentual captadora do radical livre foi calculada segundo equação ((Absorbância Negativo – Absorbância Amostra) / (Absorbância Negativo – Absorbância Branco)) x 100 (%). A partir dos resultados obtidos, traçaram-se os gráficos dos extratos e do padrão BHT, o valor encontrado para a concentração efetiva 50 (CE50) representa a concentração necessária para se obter 50% da capacidade eficiente, no caso, quanto maior o consumo de DPPH, menor será sua CE50 e maior sua atividade oxidante.

4. RESULTADOS

4.1. Ensaio de reversão bacteriana ou Teste de Ames

Os resultados de acordo com cada cepa estão distribuídos de acordo com a concentração utilizada do extrato (concentrações). A Tabela 2 mostra os resultados para mutagenicidade e sobrevivência sem ativação metabólica (S9).

Tabela 2 - Resultados do ensaio de reversão bacteriana sem ativação metabólica.

Cepa (µg/placa)	-S9			
	IM	Rev ± DP	%Sobrev	
TA97	0	1,0	92,6 ± 3,5	100,0
	0,1	0,9	88,0 ± 1,4	100,0
	0,5	0,9	81,0 ± 19,2	97,3
	5	0,8	77,0 ± 29,1	97,2
	50	0,7	68,0 ± 16,9	96,4
	500	0,7	66,5 ± 13,4	95,8
	5000	0,7	61 ± 17,4	89,0
TA98	0	1,0	55,6 ± 10,0	100,0
	0,1	1,1	58,5 ± 3,5	100,0
	0,5	1,0	58,3 ± 15,9	91,7
	5	0,8	42,3 ± 4,6	81,9
	50	0,8	45,0 ± 7,0	66,2
	500	0,7	41,0 ± 14,7	43,3
	5000	0,7	38,6 ± 9,89	42,3
TA100	0	1,0	186,3 ± 3,7	100,0
	0,1	1,0	184,5 ± 2,1	89,6
	0,5	1,0	178,0 ± 1,4	70,7
	5	0,9	176,0 ± 1,4	66,4
	50	0,9	162,3 ± 8,1	63,0
	500	0,7	134,0 ± 12,5	54,5
	5000	0,7	136,5 ± 2,5	50,2
TA102	0	1,0	155,7 ± 11,7	100,0
	0,1	1,0	149,0 ± 14,4	100,0
	0,5	0,9	136,6 ± 8,3	100,0
	5	0,8	129,3 ± 1,5	92,3
	50	0,8	126,3 ± 6,0	59,5
	500	0,7	114,3 ± 18,9	46,6
	5000	0,7	110,0 ± 9,7	35,3
TA104	0	1,0	283,5 ± 8,4	100,0
	0,1	0,8	227,6 ± 43,1	95,9
	0,5	0,9	243,1 ± 12,5	95,6
	5	0,9	243,0 ± 14,1	88,7
	50	0,9	249,4 ± 16,9	80,4
	500	0,9	253,2 ± 11,0	77,5
	5000	0,8	197,0 ± 12,6	75,9

Tabela 2: Através do Teste de Ames foram observadas respostas dose-dependentes onde não foram observadas concentrações mutagênicas pelo Índice de Mutagenicidade (IM). Destaque em vermelho indica amostras citotóxicas. Controles positivos sem S9: 4-nitroquinolino-N-óxido (4-NQO) (1,0 µg/placa) para TA97, 186±17 revertentes, e TA98 100±10 revertentes; Azida

Sódia (AS) (1.0 µg/placa) para TA100, 607±56 revertentes; Mitomicina C (MMC) (0.5 µg/placa) para TA102, 2968±34 revertentes; Metilmetano Sulfonato (MMS) (50 µg/placa) para TA104, 746±58 revertentes. **Fonte:** A autora, 2017.

Não foi detectado aumento do índice de mutagenicidade na exposição sem metabolização exógena (-S9) mostrados na Tabela 2, pois o índice decaiu com o aumento da dose testada. As cepas TA98, TA100 e TA102 foram as que demonstraram maior queda de sobrevivência em relação à dose, porém o índice de mutagenicidade não alcançou o valor $IM \leq 0,6$, que juntamente à queda de sobrevivência se classifica a toxicidade do extrato.

Na Tabela 3 apresentam-se os resultados com ativação metabólica (S9), onde observamos também resposta dose-dependente, desta vez, com aumento da mutagenicidade.

Para a cepa TA102 foi observado um padrão constante de declínio de sobrevivência em ambos testes, a partir de 5 µg/placa nos resultados com e sem ativação metabólica. O maior IM encontrado foi na cepa TA100 (IM = 1,9), dando-nos a hipótese de mutagenicidade, porém este não alcançou valor requerido para ser assim classificado, onde se caracterizaria de fato mutagênico.

Tabela 3 - Resultados do ensaio de reversão bacteriana com ativação metabólica.

Cepa ($\mu\text{g/placa}$)	+S9			
	IM	Rev \pm DP	%Sobrev	
TA97	0	1,0	60,0 \pm 4,2	100,0
	0,1	1,0	57,0 \pm 2,8	100,0
	0,5	1,0	59,0 \pm 2,6	100,0
	5	1,2	70,0 \pm 1,0	100,0
	50	1,2	70,6 \pm 3,7	77,3
	500	1,2	71,6 \pm 5,1	70,6
	5000	1,2	72,3 \pm 4,1	54,8
TA98	0	1,0	26,5 \pm 2,1	100,0
	0,1	1,0	26,0 \pm 1,4	100,0
	0,5	1,0	26,0 \pm 0,0	99,4
	5	1,1	28,6 \pm 1,5	97,5
	50	1,1	28,0 \pm 3,0	96,9
	500	1,2	31,3 \pm 1,5	92,3
	5000	1,2	31,3 \pm 2,0	78,5
TA100	0	1,0	165,7 \pm 5,8	100,0
	0,1	1,0	169,3 \pm 29,0	96,8
	0,5	1,2	204,0 \pm 7,0	91,1
	5	1,2	198,0 \pm 10,0	89,2
	50	1,2	198,0 \pm 7,0	85,4
	500	1,6	263,0 \pm 12,7	81,3
	5000	1,9	321,0 \pm 12,7	66,2
TA102	0	1,0	265,0 \pm 19,9	100,0
	0,1	0,9	242,0 \pm 45,0	91,5
	0,5	0,9	225,6 \pm 7,2	70,5
	5	0,9	249,6 \pm 21,5	68,9
	50	0,9	234,0 \pm 10,5	58,5
	500	1,0	264,0 \pm 31,7	33,9
	5000	1,2	308,3 \pm 6,0	27,7
TA104	0	1,0	330,0 \pm 36,7	100,0
	0,1	0,9	290,0 \pm 14,1	100,0
	0,5	0,9	308,0 \pm 22,6	98,1
	5	0,9	285,0 \pm 23,6	94,5
	50	1,0	332,3 \pm 48,0	90,8
	500	1,0	335,0 \pm 39,0	85,9
	5000	1,1	355,6 \pm 11,5	73,2

Tabela 3: Através do Teste de Ames, foram observadas respostas dose-dependentes com maior aumento da mutagenicidade nas placas tratadas do que sem ativação metabólica, mas não caracterizando o extrato mutagênico pelo Índice de Mutagenicidade (IM). Destaque em vermelho indica citotoxicidade. Os controles positivos usados foram: 2-aminoantraceno (2AA) (1.0 $\mu\text{g/placa}$) para TA97, 587 \pm 11 revertentes, para TA98, 305 \pm 1 revertentes e para TA100, 1436 \pm 40 revertentes; Benzo[a]pireno (B[a]P) (50 $\mu\text{g/placa}$) para TA102, 1448 \pm 79 revertentes e para TA104 763 \pm 11 revertentes.. **Fonte:** A autora, 2017.

4.2. Ensaio de Micronúcleo

De acordo com o Gráfico 1, pode-se observar o resultado de exposição das células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 ao extrato por 3 horas. Nele constatamos o aumento do metabolismo celular demonstrado pelo aumento do índice mitogênico ($P < 0.001$) e também ocorre a presença de micronúcleos. O declínio deste índice se deve à diminuição da sobrevivência celular na maior dose testada, mas ele não se difere do controle negativo. O aparecimento de micronúcleos não foi considerado significativo.

Gráfico 1 – Ensaio de Micronúcleo por 3 horas

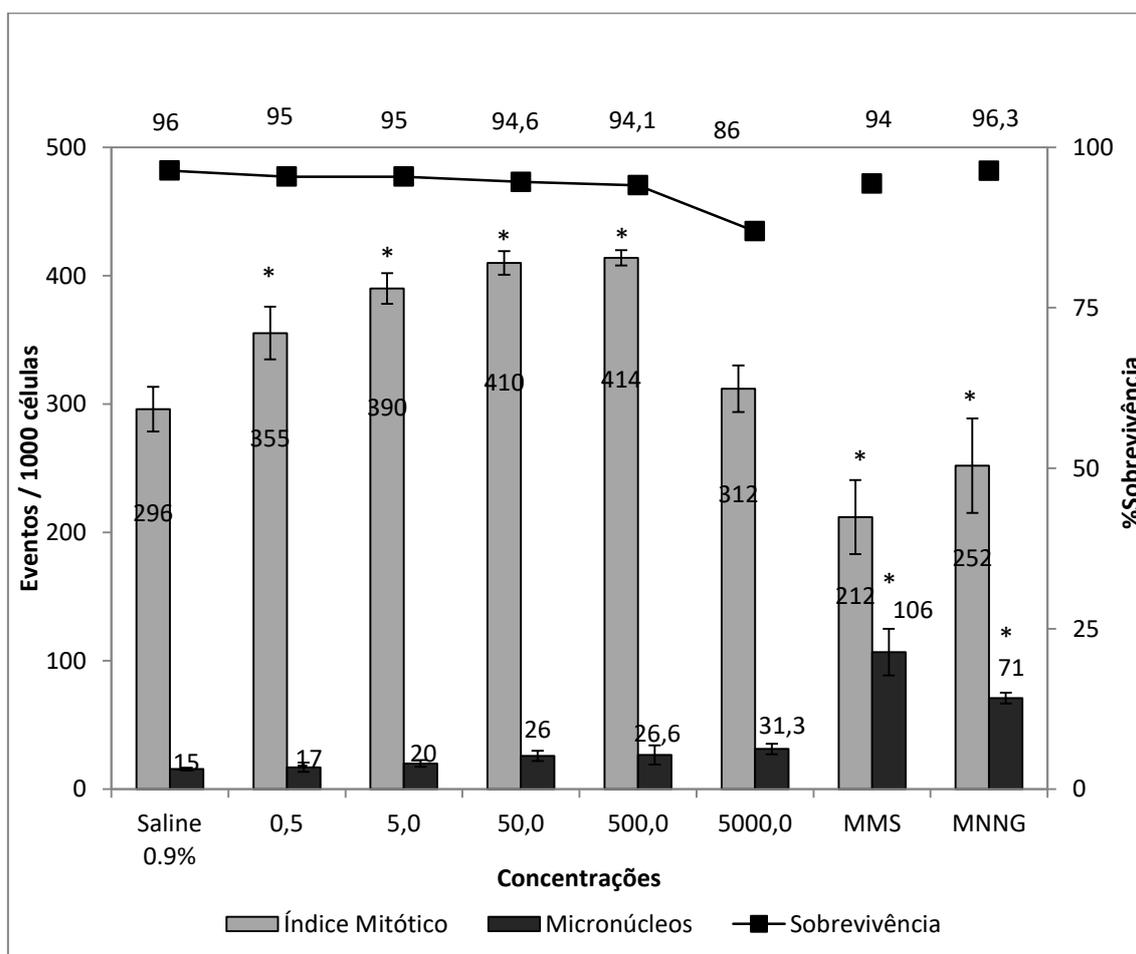


Gráfico 1: Através do Ensaio de Micronúcleo, foram observadas respostas dose-dependentes com aumento do índice mitótico ($P < 0.001$ versus controle negativo de acordo com teste ANOVA de dois fatores seguido do pós-teste correlativo de *Bonferroni*, $n=3$ em triplicata) e o

aparecimento de micronúcleos, porém não significativos. MMS e MNNG são os controles positivos. **Fonte:** A autora, 2017.

Na exposição de 24 horas, é observado o mesmo padrão de resposta com o aumento do metabolismo evidenciado pelo índice mitogênico. Porém o decaimento da sobrevivência na exposição de 24 horas é observado a partir da concentração de 500 µg/mL. Nas duas maiores concentrações a diminuição do índice mitogênico se deve também à queda da sobrevivência observada, e a aparição de micronúcleos em 24 horas (Gráfico 2) também não foi significativa.

Gráfico 2 – Ensaio de Micronúcleo por 24 horas

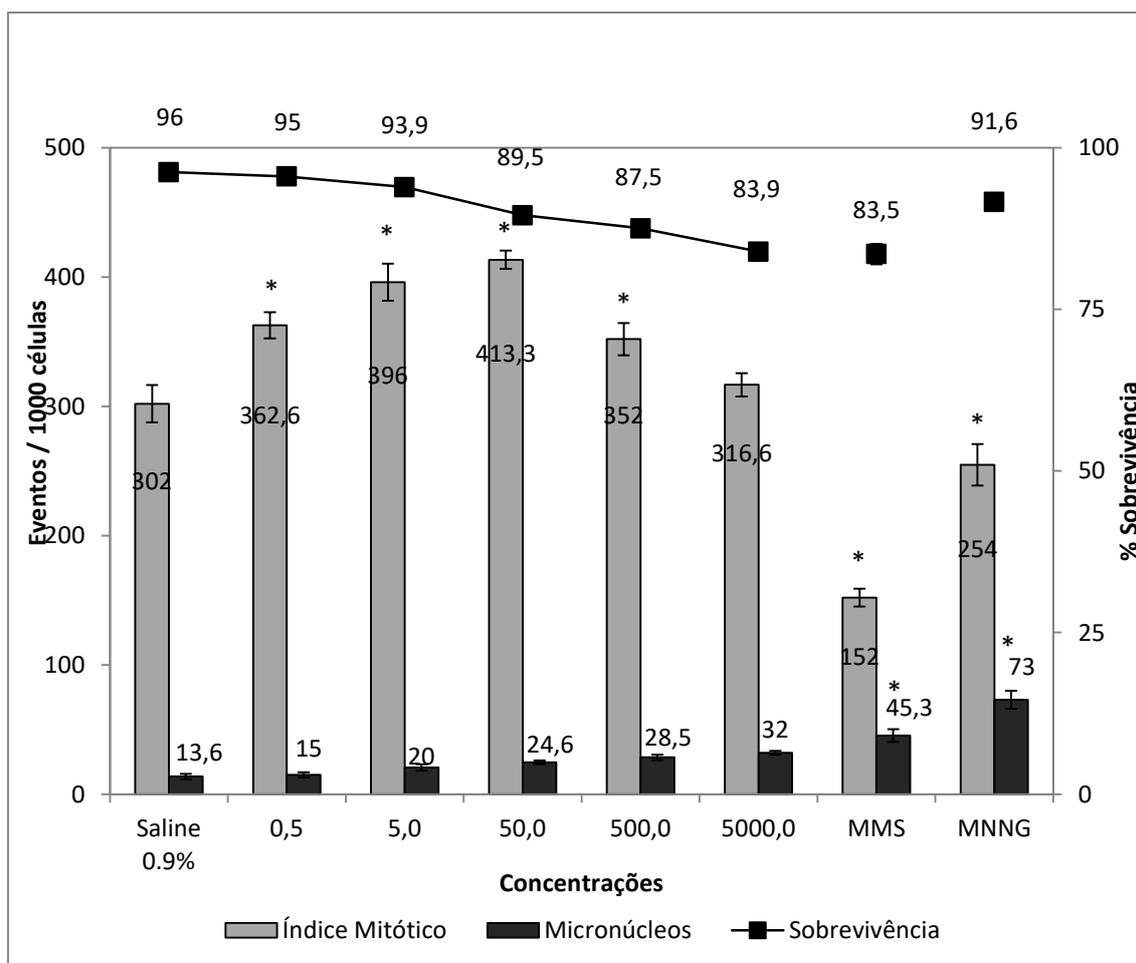


Gráfico 2: Através do Ensaio de Micronúcleo, foram observadas respostas dose-dependentes com aumento do índice mitótico ($P < 0.001$ versus controle negativo de acordo com teste ANOVA de dois fatores seguido do pós-teste correlativo de *Bonferroni*, $n=3$ em triplicata) e o

aparecimento de micronúcleos, porém não significativos. MMS e MNNG são os controles positivos. **Fonte:** A autora, 2017.

4.3. Ensaio DPPH

Com os resultados obtidos da leitura de absorvância, a capacidade percentual captadora do radical livre foi calculada segundo equação $((\text{Absorbância Negativo} - \text{Absorbância Amostra}) / (\text{Absorbância Negativo} - \text{Absorbância Branco})) \times 100 (\%)$. demonstrado no Gráfico 3. A partir deles foi possível calcular a EC50 de *Cyrtopodium glutiniferum*, como igual à 144 $\mu\text{g/mL}$.

Gráfico 3 – Curva de capacidade captadora de radicais livres

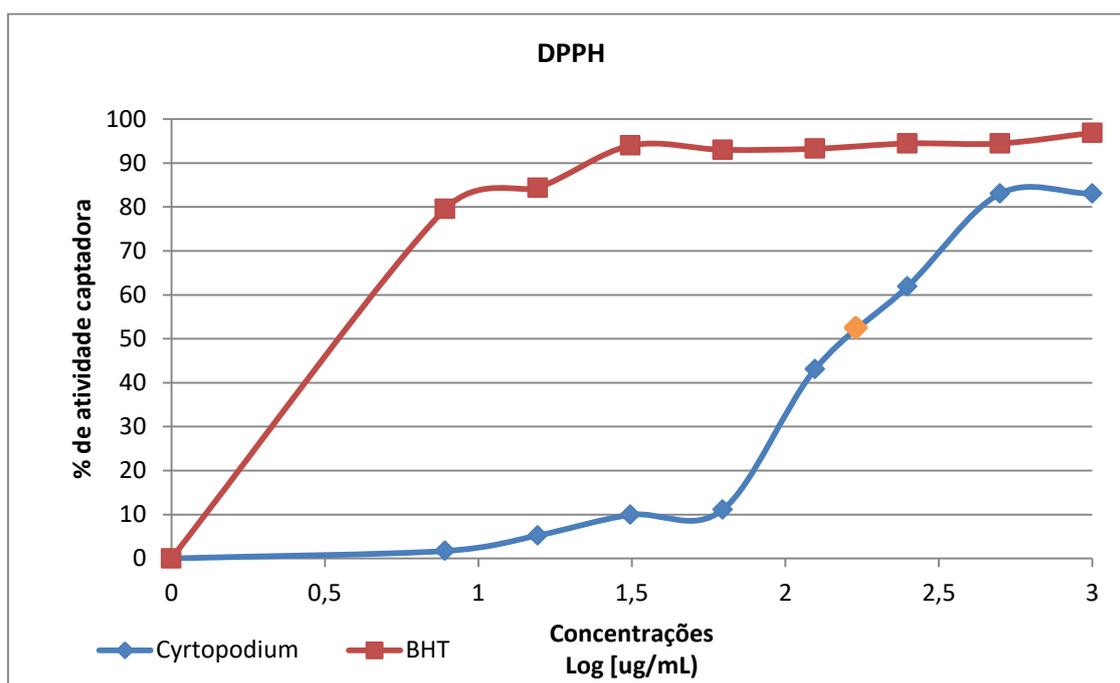


Gráfico 3: Ensaio DPPH onde BHT (hidroxitolueno de butila) representada pela curva em vermelho, indicando uma curva padrão e em azul a amostra de *Cyrtopodium glutiniferum*. As concentrações utilizadas encontram-se em fonte logarítmica para melhor observação dos dados coletados. A EC50 é apontada pelo marcador em cor laranja. **Fonte:** A autora, 2017.

4.4. Ensaio Folin-Ciocalteu (FCR)

Através do método de Folin-Ciocalteu foram quantificados os compostos fenólicos presentes na amostra de extrato, no Gráfico 4 observa-se a curva e equação da reta obtida na curva de calibração do catecol, onde determinou-se a quantidade de fenólicos totais, expresso em mg de catecol /g de amostra. O teor de polifenóis encontrado foi de 3,24 mg de catecol /g de amostra.

Gráfico 4 – Equação da reta do ensaio FCR

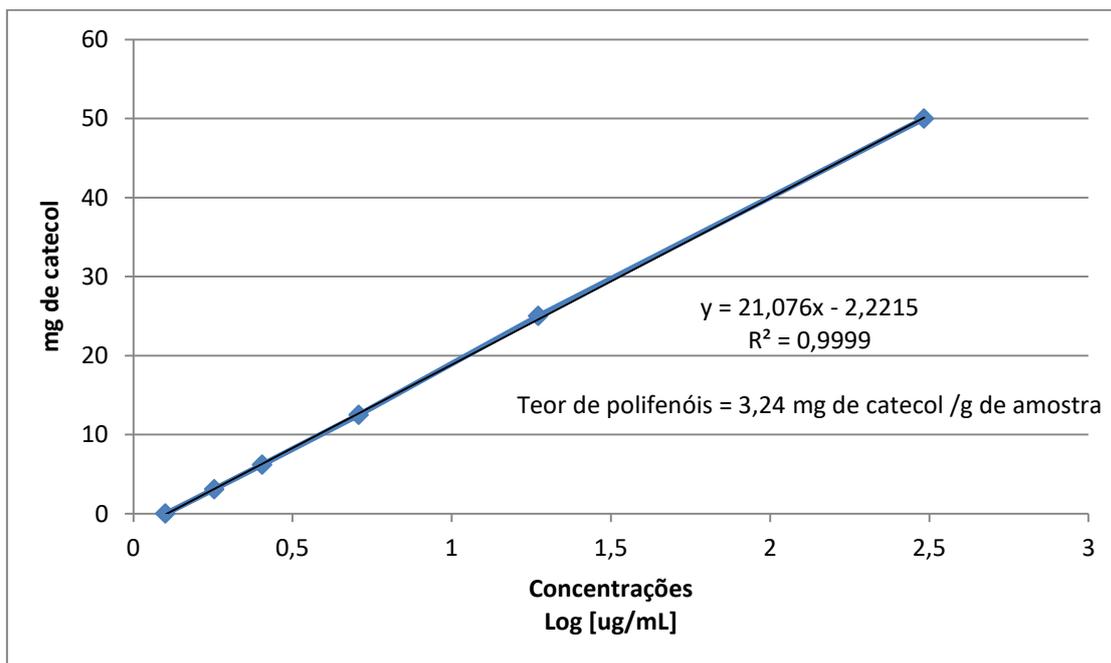


Gráfico 4: Curva padrão de compostos fenólicos presentes no extrato calculadas em mg de catecol. As concentrações utilizadas encontram-se em fonte logarítmica para melhor observação dos dados coletados. **Fonte:** A autora, 2017.

5 DISCUSSÃO

5.1. Ensaio de reversão bacteriana ou Teste de Ames

Os resultados foram expressos através do IM ou índice de mutagenicidade (nas Tabelas 2 e 3), que é a razão entre o número de revertentes na placa-teste (revertentes induzidos) e o número de revertentes na placa-controle negativo (revertentes espontâneos).

De acordo com os resultados observados, todas cepas testadas sem ativação metabólica, tiveram queda no índice mutagênico em decaimento dose-dependente, ou seja, com o aumento das concentrações utilizadas de *Cyrtopodium glutiniferum* houve uma diminuição do IM. Foram também encontrados baixos valores de sobrevivência, entre 66% e 35,3% nas cepas TA98, TA100 e TA102. Esta baixa sobrevivência pode mascarar o resultado de reversão bacteriana visto que a cepa morre antes de apresentar o fenótipo da reversão.

Ao realizar o teste com ativação metabólica, substituindo o Tampão Fostato de Sódio pela fração microssomal S9, foi observado o oposto dos resultados anteriores da reversão, havendo então o aumento dose-dependente da taxa de reversão bacteriana (IM). Porém em nenhuma das cepas testadas obteve-se valor igual ou maior que 2, indicando, portanto, que o extrato não foi mutagênico. E igualmente aos resultados sem ativação, houve decaimento da sobrevivência na cepa TA102 a partir da concentração de 5 µg/placa, porém devido aos valores de IM, a amostra não foi considerada citotóxica.

É importante ressaltar que apesar das diferenças genéticas entre as linhagens de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium que possibilitam variações nos índices de mutagenicidade e sobrevivência, não foi observado efeito mutagênico para todas as cepas testadas para *Cyrtopodium glutiniferum* e, portanto consideram-se seguras as concentrações utilizadas de 0,1 µg/mL à 5000 µg/mL .

5.2. Ensaio Micronúcleo (MN)

Com os resultados de exposição de células da linhagem RAW 264.7 foi observado que não houve toxicidade, pois em nenhum dos tratamentos alcançou-se sobrevivência inferior à 70%. Porém houve aumento de ocorrências na formação de micronúcleo à medida que a dose exposta se tornou maior, um aumento observado quando comparado ao controle negativo de 200,6‰ na exposição de 3 horas e 235,3‰ na exposição de 24 horas na maior concentração utilizada. Este evento de aparecimento dos micronúcleos se relaciona ao aumento do índice mitogênico, ou seja, ocorre um aumento do evento de mitose celular.

Nas maiores doses de amostra exposta, há diminuição do índice mitogênico, porém os valores não se diferenciam do controle negativo. O extrato então não demonstrou ser causador de danos cromossomiais, não se classificando como genotóxico.

Esses resultados demonstram que o extrato aquoso de *Cyrtopodium glutiniferum* é possivelmente capaz de estimular o metabolismo e

proliferação celular, e comparando-se aos resultados anteriores de Ames, ele poderia possivelmente ser usado futuramente como um etnofármaco seguro. Porém mais testes devem ser realizados para se assegurar total segurança.

Em estudos, uma glucomanana isolada dos pseudobulbos frescos de *Cyrtopodium cardiochilum* apresentou atividades anti-inflamatória e imunológica. A atividade anti-inflamatória foi mensurada pelo teste de permeabilidade vascular induzida por ácido acético em ratos e a glucomanana inibiu o aumento da permeabilidade vascular causada pelo ácido acético, que é um modelo típico de reação inflamatória imediata, sugerindo excelente atividade anti-inflamatória. A atividade imunológica foi medida pelo teste do índice de fagocitose, que aumentou significativamente com a glucomanana, indicando propriedades imunomoduladoras (SILVA, 2013).

As atividades observadas pelas metodologias aplicadas comprovam a capacidade terapêutica desta espécie na medicina popular. O sumo dos pseudobulbos de *Cyrtopodium paranaense* é utilizado na cicatrização de feridas, porém nenhuma atividade biológica foi estabelecida cientificamente. Já os pseudobulbos de *Cyrtopodium andersonii*, que são utilizados popularmente para curar feridas e cicatrizar lesões em Quissamã, possuem estudo de análise da atividade analgésica e anti-inflamatória. Neste detectou-se atividade anti-inflamatória do extrato aquoso do pseudobulbo a 20% e de um polissacarídeo extraído do mesmo, a cirtopodina, não havendo atividade analgésica neste (SILVA, 2013). É importante ressaltar, que a verdadeira *Cyrtopodium andersonii* é endêmica das Índias Ocidentais, não ocorrendo no Brasil, a espécie brasileira comumente tratada por esse nome deveria receber o nome de *Cyrtopodium flavum* (BARROS, 1994).

5.3. Quantificação de polifenóis totais

Os compostos fenólicos são metabólitos vegetais caracterizados pela presença de diversos grupos fenol. Alguns deles são muito reativos na neutralização de radicais livres ao doar um átomo de hidrogênio ou um elétron, quelando íons metálicos em soluções aquosas. Os polifenóis formam grupos heterogêneos, que se dividem em dois subgrupos: os flavonoides e os não flavonoides, sendo ambos compostos de baixo peso molecular, denominados metabólitos secundários, presentes em frutas e vegetais (JOSÉ et al., 2015).

Além disso, os compostos fenólicos possuem propriedades biológicas múltiplas tais como propriedades antitumorais, antimutagênicas e antibacterianas, e essas atividades podem estar relacionadas à sua atividade antioxidante (SONG et al., 2010). Os polifenóis são compostos que contribuem para propriedades antioxidantes e incluem flavonóides, flavonóis, flavonolóis, flavononas, isoflavonas, flavonas, antocianidinas, flavonais, chalcones, antocianinas, isômeros de ácido clorogênico, famílias de ácido cinâmico e benzóico, stilbenos, ligninas, lignanas, taninos, tocoferóis e tocotrienóis (SHAHIDI; NACZK, 2006).

Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, inibindo os radicais livres e prevenindo a formação de doenças, contribuindo, dessa maneira, para uma maior longevidade. Desta forma, torna-se essencial o equilíbrio entre os radicais livres e o sistema de defesa antioxidante (NUNES VARGAS et al., 2008).

O método atual mais utilizado para determinar o índice total dos compostos fenólicos em plantas é o Folin-Ciocalteu, neste método a mistura

dos ácidos fosfowolfrâmico e fosfomolibdico, em meio básico, se reduzem ao oxidar compostos fenólicos, originando óxidos wolfrâmico e molibdeno (MEZADRI et al., 2008).

Os melhores resultados de saúde e nutrição podem ser alcançados não só pelo consumo de frutas e vegetais com altas capacidades antioxidantes, mas também de ervas medicinais e plantas.

Alguns alimentos de origem natural já são bem conhecidos por possuírem alta atividade antioxidante, como sucos de uva e vinhos, que podem apresentar valores que variam entre 270 e 1320 mg em EAG/L para suco de uvas simples e 530 e 2050 mg/L para vinhos de uvas uvas Merlot, Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc (NUNES VARGAS et al., 2008).

Já as plantas medicinais estão em processo de descobrimento de seus componentes antioxidantes e aos poucos estão sendo valorizadas à medida que estes resultados se acumulam. Estudos indicam que algumas plantas medicinais chinesas possuem uma atividade antioxidante mais potente do que frutas e vegetais comuns. Os compostos fenólicos contribuem principalmente para a atividade antioxidante dessas plantas, algumas delas são a *Dioscorea bulbifera* com 59,43 mg em EAG/g, cultivada pelos seus tubérculos ou “batatas” e também conhecida como inhame, podendo ser encontrada no Brasil, *Eriobotrya japônica* com 31,47 mg em EAG/g, chamada de ameixa-americana no Brasil, e *Brassica alba* com 3,34 mg em EAG/g cultivada pelas suas sementes que são utilizadas na preparação de condimentos (SONG et al., 2010). Esta concentração de polifenóis possui valor próximo ao encontrado na amostra do extrato de *Cyrtopodium glutiniferum*.

O total de polifenóis encontrado, portanto, está de acordo com o padrão de compostos fenólicos encontrados em plantas medicinais e alimentícias (SONG et al., 2010), e conclui-se que a concentração encontrada é potencialmente antioxidante e é importante ressaltar que o extrato foi feito a partir de pseudobulbos, e de acordo com estudos recentes as raízes possuem maior concentração de antioxidantes do que os pseudobulbos (SILVA, 2013).

5.4. Avaliação da capacidade sequestradora do radical DPPH

A capacidade de sequestro do radical livre DPPH pela amostra é determinada pela habilidade de transferência de hidrogênio para o radical livre estável DPPH. A propriedade de sequestrar radicais livres dos compostos presentes em vários extratos de plantas tem sido recentemente apontada sugerindo um possível papel redutor destes compostos, diminuindo os riscos de doenças cardiovasculares em humanos. O sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes (SUIKINAI NOBRE et al., 2011). O método de inibição de radicais DPPH baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (MAMBRO, DI; FONSECA, 2005).

Pelo método de sequestro de radical DPPH, observou-se que o extrato de *Cyrtopodium glutiniferum* demonstrou alta atividade antioxidante *in vitro*, sendo a maior atividade sequestradora mensurada de 83% na maior dose testada. O valor é alto quando comparado, por exemplo, ao suco de *Malpighia emarginata*, popularmente conhecida como acerola, já que o suco teve sua maior capacidade antioxidante mensurada em 49% (MEZADRI et al., 2008).

Diante deste resultado, e de sua EC50 que foi detectada próxima à concentração de 200 µg/mL, que é um valor que está dentro da faixa segura pelos métodos anteriormente testados, a espécie *Cyrtopodium glutiniferum* se demonstra favorável para uma futura utilização como um etnofármaco.

Por tais resultados, se demonstra tão importante a sua avaliação de mutagenicidade e toxicidade, já que a espécie demonstrou possuir potente efeito benéfico no sequestro de radicais livres, uma futura utilização desta espécie para fins terapêuticos precisaria primeiramente destas avaliações para que não houvesse risco de utilização indevida causando prejuízos à saúde humana.

6 CONCLUSÃO

A espécie *Cyrtopodium glutiniferum* não apresentou efeito mutagênico por teste de reversão bacteriana. Na exposição *in vitro* ao extrato em células RAW 264.7 houve estímulo celular, levando ao aumento do índice mitogênico e metabolismo celular, mas não foi detectada efeito genotóxico. Na quantificação de polifenóis pelo método FCR, foi encontrada quantidade significativa de polifenóis para testar sua capacidade antioxidante, e então apresentou através do teste de sequestro de radicais livres, alto potencial antioxidante.

7 REFERÊNCIAS

AGOSTINI, J. O teste do micronúcleo: seu uso no Homem. **Biotemas**, 1993.

AMES, B. N.; LEE, F. D.; DURSTON, W. E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 3, p. 782–6, 1973.

ANANTHI, R.; CHANDRA, N.; SANTHIYA, S.; Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* R.Br. root extract in cultured lymphocytes. **Journal of Ethnopharmacology**. v127, n.2, p.558-560. 2010.

ARAÚJO-LIMA, C. F.; NUNES, R. J. M.; CARPES, R. M.; AIUB, C. A. F.; FELZENSZWALB, I. Pharmacokinetic and toxicological evaluation of a zinc gluconate-based chemical sterilant using in vitro and in silico approaches. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

AUBERON, F.; OTLATUNJI, O.; HERBELTE, G.; Chemicals constituents from aerial parts of *Cyrtopodium paniculatum*. **Molecules**. v21, p 1-18. 2016.

BARRETO, D. W.; PARENTE, J. P. Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 2, p. 287–291, 2006.

BARROS, F. Novas combinações, novas ocorrências e notas sobre espécies pouco conhecidas para orquídeas no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v9. p.11-17, n 1. 1994.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179–189, 2000.

CARPES,R.; FLEURY, B.; LAGES.B.; Mutagenicity, genotoxicity and scavenging activities of extracts from the soft coral *Chromonephtea braziliensis*: A possibility of new bioactive compounds. **Genetics and Molecular Research**. v12, p3575-3587, n3. 2013.

CHEN, S. T.; DOU, J.; TEMPLE, R.; et al. c o m m e n t a r y New therapies from old medicines. , v. 26, n. 10, p. 1077–1083, 2008.

CHINSAMY, M.; FINNIE, J. F.; STADEN, J. VAN. Anti-inflammatory, antioxidant, anti-cholinesterase activity and mutagenicity of South African medicinal orchids. **South African Journal of Botany**, v. 91, p. 88–98, 2014. South African Association of Botanists.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. NIH Public Access. , v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2014.

DAVIÑA. J.; GABRIELE. M.; CERUTTI, J.; Chromosome studies in Orchidaceae from Argentina. **Genetics and Molecular Biology**. v821, p. 811-821. 2009

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 4, p. 303–336, 2012.

DI STASI, L.; OLIVEIRA, G.; CARVALHAES. M.; Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**. v73, n1, p. 69-91. 2002.

DUTRA, R.; CAMPOS, M.; SANTOS, A.; Pharmacological studies, dug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**. v.112,p.4-29. 2016.

FELZENSZWALB, I.; MARQUES, M.; MAZZEI, J.; AIUB, C.; Toxicological evaluation of *Euterpe edulis*: A potential superfruit to be considered. **Food and**

Chemical Toxicology. v.58, p. 536-544. 2013.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.; Teste do Micronúcleo: Uma Triagem Para Avaliação Genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**. v1, n. 3, p. 337-340. 2008.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19–20, p. 894–901, 2008.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 18, n. 4, p. 277–291, 1991.

HERALD, T. J.; GADGIL, P.; TILLEY, M.; High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.92, n.11, p. 2326-2331. 2012.

LÁZARO, D C; LÓPEZ, Y I; VÁZQUEZ, A I F.; ODIO, A D.; GONZÁLEZ, J E.; SÁNCHEZ, L M. ;DELGADO, N G.; Genotoxic assessment of aqueous extract of rhizophora mangle L. (mangle rojo) by spermatozoa head assay. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v.15, n.1, p.18-26. 2010.

JOSÉ, A. E.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Avaliação do efeito antibacteriano de extratos de folhas de batata-doce (*Ipomoea batatas L.*) frente a bact?érias de interesse em alimentos e correlação com os compostos fenólicos. **Revista Ceres**, v. 62, n. 5, p. 421–429, 2015.

MAMBRO, V. M. DI; FONSECA, M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 2, p. 287–295, 2005.

MATSUSHIMA, T.; HAYASHI, M.; MATSUOKA, A; et al. Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU).

Mutagenesis, v. 14, n. 6, p. 569–580, 1999.

MEZADRI, T.; VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, n. 4, p. 282–290, 2008.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1–2, p. 29–60, 2000.

NUNES VARGAS, P.; HOELZEL, S. C.; SEVERO, C.; ROSA, D. Determinação Do Teor De Polifenóis Totais E Atividade Antioxidante Em Sucos De Uva Comerciais. **Alim. Nutr**, v. 19, n. 1, p. 11–15, 2008.

OECD. OECD Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. **Organisation for Economic Co-operation and Development publishing**, , n. July, p. 11, 1997.

PEREIRA, M.C.; ROCHA, D.I.; VELOSO, T.R.; PEREIRA, O.L.; FRANCINO, D.M.; TEODORO. M.; ALVES, R.M.; KASUYA, M.C.M.; Characterization of seed germination and protocorm development of *Cyrtopodium glutiniferum* (Orchidaceae) promoted by mycorrhizal fungi *Epulorhiza spp.*. **Acta Botanica Brasilica**. v.29, n.4, p.567-574. 2015.

RODRIGUES, L.A.; BORGES, V.; NETO, D.P.; BOARETTO, A.G.; OLIVEIRA, J.F.; In vitro propagation of *Cyrtopodium saintlegerianum* rchb . f . (orchidaceae), a native orchid of the Brazilian savannah. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. v.15, p. 10-17. 2015.

ROMERO-GONZÁLEZ, G.; BIANCHETTI, J. B. A. L. A SYNOPSIS OF THE GENUS CYRTOPODIUM (CATASETINAE: ORCHIDACEAE). **Harvard Papers in Botany**, v. 13, n. 1, p. 103–116, 2008.

ROMERO-JIMÉNEZ, M.; CAMPOS-SÁNCHEZ, J.; ANALLA, M.; MUÑOZ-SERRANO, A.; ALONSO-MORAGA, Á. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 585, n. 1–2, p. 147–155, 2005.

RUFINO, M.M.; ALVES, R.E.;BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.;SAMPAIO, C.G.;PÉREZ-JIMÉNEZ, J.;CALIXTO, F.D.S.; Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH.. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. v.23, n.2, p.1-4. 2007.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. 2006.

SILVA, A. G. Os sumarés cicatrizantes da medicina tradicional brasileira , ou , as surpresas químicas ativas do desconhecido gênero *Cyrtopodium* (Orchidaceae). **Natureza online** , v. 11, p. 152–154, 2013.

SINGLETON, VL; ROSSI, J.; Colorunetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Amer. J. Enol. Viticult.** v.16, p.144-58, 1965.

SONG, F. L.; GAN, R. Y.; ZHANG, Y.; et al. Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected chinese medicinal plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 6, p. 2362–2372, 2010.

SPONCHIADO, G.; ADAM, M. L.; SILVA, C. D.; et al. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 289–296, 2016. Elsevier.

SUIKINAI NOBRE, I. S. S.; R. F., C.; L. L., H.; et al. Determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos brutos de microorganismos pelo método de captura de radical livre DPPH. **Embrapa Meio Ambiente**, 2011.

TUROLLA, M. S. DOS R.; NASCIMENTO, E. DE S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências**

Farmacêuticas, v. 42, n. 2, p. 289–306, 2006.

WATERS, M. D.; STACK, H. F.; JACKSON, M. A. Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens¹This document has been reviewed in accordance with US Environmental Protection Agency policy and has been approved for publication. Mention of trade names or commercial. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 437, n. 1, p. 21–49, 1999.

YONZONE, R.; KAMRAN, A.; BHUJEL, R. B. Orchids in ethnobotany. **International Seminar on “Multidisciplinary Approaches in Angiospenn Systematics,”** p. 661–669, 2012.

ZALACAIN, M.; SIERRASESÚMAGA, L.; PATIÑO, A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 28, n. 2, p. 227–236, 2005.