

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

***Persea americana* Mill.: avaliação do potencial citotóxico e
genotóxico do extrato hidroalcoólico através do teste do
micronúcleo**

Elaborado por

DANILO GIOVANNI NARCISO PASTURA

Orientadora

VIVIANE MOREIRA DE LIMA

DANILO GIOVANNI NARCISO PASTURA

VIVIANE MOREIRA DE LIMA

***Persea americana* Mill.: avaliação do potencial citotóxico e genotóxico do extrato hidroalcoólico através do teste do micronúcleo**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

DEZEMBRO-2017

Persea americana Mill.: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO ATRAVÉS DO TESTE DO
MICRONÚCLEO

DANILO GIOVANNI NARCISO PASTURA

MONOGRAFIA APROVADA EM: 13/12/2017

BANCA EXAMINADORA:

PRESIDENTE/ ORIENTADOR: Viviane Moreira de Lima
(Doutora, Viviane Moreira de Lima, UFRRJ)

MEMBRO TITULAR: Maria Amélia Menck Soares
(Doutora, Maria Amélia Menck Soares, UFRRJ)

MEMBRO TITULAR: Maria Verônica Leite Pereira Moura
(Doutora, Maria Verônica Leite Pereira Moura, UFRRJ)

MEMBRO SUPLENTE: Bruno Pereira Berto
(Doutor, Bruno Pereira Berto, UFRRJ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de iniciação científica pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC)

Agradeço a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade proporcionada, onde, apesar de todas as dificuldades enfrentadas, continua fornecendo um ensino superior público de qualidade.

À minha orientadora e amiga Professora Doutora Viviane Lima, que por dois anos e meio, tive a grande honra de trabalhar ao seu lado. Sempre ensinado e ajudando com muita paciência e carinho, não só a mim, mas a todos os alunos que a recorrem, demonstrando muito amor e dedicação no que faz.

Ao Professor Doutor Hécio Borba, uma pessoa muito dedicada à universidade e de propagar o conhecimento, que me ajudou muito e na qual eu tive o prazer de dividir bons momentos. Sem dúvidas, um exemplo de profissional pra mim.

Ao Professor Doutor Bruno Berto, um orientador que é como um pai, sempre ajudando seus alunos e a todos que recorrem a ele, assim também, sendo um exemplo de que profissional e pessoa eu quero me tornar.

Ao Thiago de Azevedo Amorim, do Departamento de Botânica da UFRRJ, por sempre estar nos ajudando com a identificação das espécies vegetais e registrando suas exsicatas no herbário do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde.

A Professora Doutora Maria Verônica, que durante quase a totalidade da minha graduação, esteve como coordenadora do curso, fazendo um excelente trabalho e sendo muito amiga de todos os alunos.

A Professora Doutora Maria Amélia, por sempre estar contribuindo com seu conhecimento e experiência ao “laboratório do 22”. Uma amizade e companheirismo muito positivo para todos nos.

Agradeço aos demais professores da universidade, não apenas os quais tive o prazer de ter aula, mas sim a todas que, anos após ano dão o melhor de si para ensinar cada pessoa que passa por esta instituição de ensino.

Aos meus pais, Marcia e Marcelo que sempre deram tudo de si para que não me faltasse nada, não só na parte de bens material mas principalmente no quesito de amor e afeto.

Agradeço a minha avó materna, Marlene e a minha avó paterna, Dahila, por sempre terem sido como mães para mim.

Agradeço ao meu tio Elison por sempre ter sido um amigo querido e parente próximo.

Agradeço a minha namorada Karen, que sempre me apoiou e esteve comigo nos momentos mais difíceis. Uma pessoa que me mudou muito e para melhor.

Ao meu melhor amigo Nelson, uma pessoa que é como um irmão, onde, seja com que for, sei que poderei sempre contar e confiar.

A minha melhor amiga Thamires, que apesar de não nos falarmos tanto hoje em dia, foi quem esteve me ajudando nos piores momentos que passei.

Aos também melhores amigos, Sergio, Yago, Fernandes, Vanessa e Juliet, pessoas que são como família e sem dúvidas as que dividiram maior parte dos melhores momentos que já tive.

Aos meus amigos de laboratório, Hataânderson, Jennifer, Aline, Gabriela Lopes, Mayara Cristine, Leonardo, Priscyanne, Jaqueline, Ellen, Raphael, Ana Tereza e a técnica de laboratório Águida, que são as melhores pessoas com quem tive prazer de trabalhar, e mais do que isso, de formar a família do 22.

Aos amigos de turma, Anderson, Eliene, Gabriela Guarnier, Isabel, Mateus, Raissa e Rafaela Abdo, onde em 4 anos, dividimos bons e maus momentos da vida acadêmica.

Agradeço a todas as pessoas que, por descuido, não citei aqui. Peço perdão e digo de coração que as pessoas boas que passam por nossas vidas não são esquecidas.

Dedico este trabalho aos meus amigos e professores.

Minha mãe Marcia e meu pai Marcelo.

Minha namorada Karen.

“Você, eu, ninguém vai bater tão duro quando a vida. Mas não se trata de bater duro, se trata de quanto você consegue apanhar e seguir em frente, o quanto você é capaz de aguentar e continuar tentando. É assim que se consegue vencer.”

(Rocky Balboa - 2006)

Resumo:

Persea americana Mill. é uma espécie da família Lauraceae, popularmente conhecida como abacateiro. Seu cultivo se dá principalmente pela produção do fruto e por ser uma espécie explorada para diversos fins medicinais. O chá de suas folhas é empregado como carminativo, antirreumático, antidiarreico, diurético, contra doenças dos rins e bexiga, estimulante da vesícula biliar, dentre outras. O extrato alcoólico caseiro é indicado como uso externo para o tratamento de dores reumáticas, contusões e dores de cabeça. Apesar do grande número de trabalhos relacionados ao estudo de *Persea americana*, mais análises toxicogenéticas se fazem necessárias para que sua utilização possa ser feita com relativa segurança. Deste modo, no presente trabalho objetivamos avaliar o efeito citotóxico e genotóxico do extrato hidroalcoólico obtido a partir das folhas do abacateiro, através do teste do micronúcleo em sangue periférico de camundongos tratados com dose única de 2000mg/Kg do referido extrato. Esfregaços sanguíneos foram preparados 48 e 72 horas após o tratamento. A genotoxicidade foi avaliada pela presença de micronúcleos em 2000 células por animal para cada período de tempo, enquanto a citotoxicidade foi analisada através da relação dos eritrócitos imaturos (PCEs) e maduros (NCEs) nas primeiras 1000 células contadas. Os resultados obtidos demonstram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana* não apresenta efeito genotóxico, sendo inclusive observado uma diminuição significativa de PCEs micronucleados. Detectou-se, entretanto, um efeito citotóxico do extrato, demonstrado pela diminuição significativa da taxa PCE/NCE em relação ao controle negativo.

Palavras chave: citotoxicidade; genotoxicidade; *Persea americana*; micronúcleo

Abstract:

Persea americana Mill., a species of plant from the family lauraceae, popularly known as avocado, is cultivated mainly in temperate regions and scarcely in tropical areas. Its cultivation occurs mainly by the production of the fruit and for being a species explored for diverse medicinal purposes. The tea made by the leaves of avocado is used as carminative, antirheumatic, antidiarrheal, diuretic, against diseases of the kidneys and bladder, gallbladder stimulant, among others. In addition to the use in the form of tea, the homemade alcoholic extract is indicated as external use for the treatment of rheumatic pains, bruises, and headaches. Despite the large number of studies related to the *P. americana*, toxicogenic analyzes are necessary for that their use can be made with relative safety. Thus, the present study aims to analyze the cytotoxic and genotoxic effect of the hydroalcoholic extract obtained from the leaves, through the micronucleus test in peripheral blood of mice treated with a single dose of 2000mg / kg of said extract. Blood smears were prepared 48 and 72 hours after treatment. Genotoxicity was assessed by the presence of micronuclei in 2000 cells per animal for each period, while cytotoxicity was analyzed by the ratio of immature erythrocytes (PCEs) and mature (NCEs) in the first 1000 cells counted. The results obtained demonstrate that the hydroalcoholic extract of the leaves of *P. americana* does not present genotoxic effect, being even observed a significant decrease of micronucleated PCEs. However, a cytotoxic effect of the extract was detected, as demonstrated by the significant reduction of the PCE / NCE rate in relation to the negative control.

Keywords: citotoxicity, genotoxicity; *Persea Americana*; micronucleus

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	13
I.1. USO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	13
I.2. <i>Persea americana</i> Mill.....	15
I. 3. TESTE DO MICRONÚCLEO <i>in vivo</i>	17
I.4 . Objetivos.....	19
I.4.1. Objetivo geral.....	19
I.4.2. Objetivo específico.....	19
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
II.1. Coleta da espécie vegetal.....	19
II.2. Preparo dos extratos hidroalcoólicos.....	19
II.3. Animais	20
II.4. Investigação das potencialidades citotóxicas e genotóxicas dos extratos vegetais através do teste do micronúcleo <i>in vivo</i>	20
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
III.1 Conclusões	24
IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

LISTA DE FIGURAS:

FIGURA 1. Folha e fruto de *P. americana*, Mill..... 15

FIGURA 2. Individuo do qual foram coletadas as folhas. 15

FIGURA 3. Eritrócito policromático micronucleado. 22

LISTA DE TABELAS:

TABELA 1: Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em camundongos 48h após os diferentes tratamentos..... 21

TABELA 2: Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em camundongos 72h após os diferentes tratamentos..... 22

I. INTRODUÇÃO

I.1. USO DE PLANTAS MEDICINAIS

A relação do homem com o uso e identificação de espécies vegetais para fins medicinais vem desde o tempo pré-histórico. A evidência mais antiga do uso de plantas para tal fim foi encontrada em uma placa de argila em Nagpur – Índia, com aproximadamente 5000 anos, que apresenta 12 receitas para a preparação de fármacos, fazendo uso de mais de 250 plantas, algumas delas possuidoras de alcaloides como a papoula e a mandrágora (KELLY, 2009).

Com o avanço dessa relação e o início da vida em sociedade, o ser humano aprendeu a reconhecer e a categorizar os materiais provenientes de plantas para diversas funcionalidades. A evolução desse conhecimento, passados de geração para geração e propagada dentro de um povoado, produziu o bem conhecido sistema de medicamentos baseados em plantas, como o Ayurvedic e Unani (MAMEDOV, 2012). Um exemplo disso é o livro "Pen T'Sao", escrito por volta de 2.500 anos a.C. pelo imperador chinês na época, Shen Nung. Nele são descritos 365 medicamentos feitos com partes secas de plantas medicinais, sendo boa parte destas utilizadas até hoje, como a cânfora, casca de canela, “erva de Jimson”, entre diversas outras (WIART, 2006; PETROVSKA, 2012).

O início do século XIX marca um ponto importante no conhecimento sobre o uso de plantas medicinais com a descoberta e isolamentos de alcaloides em diversas plantas, e posteriormente, com o isolamento de glicosídeos. Assim deu-se início as pesquisas científicas farmacológicas. Com o avanço dos métodos químicos, outras substâncias ativas de plantas medicinais também foram descobertas, como taninos, saponinas, óleos etéricos, vitaminas, hormônios, entre outros (DERVENDZI, 1992).

Com base na evolução histórica do uso de plantas medicinais, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1978, passou a reconhecer a fitoterapia como terapia alternativa de enfermidades humanas (Ministério da Saúde, 2006) e na década de 90 apresentou dados onde aproximadamente 70% da população mundial tinha o uso de plantas como o único meio para o tratamento de enfermidades, sendo utilizadas em torno de 35.000 a 70.000 espécies de plantas para fins medicinais (AKERELE, 1992; MAMEDOV, 2012).

No Brasil, a porcentagem da população que faz uso de plantas medicinais chega a valores próximos aos 80%, demonstrando o quão difundido é o método de medicina alternativa no país (CANTARELLI, 2012). Fatores que justificam esse número elevado estão relacionados ao difícil acesso por parte das populações carentes aos centros de

atendimento hospitalares e as dificuldades para realização de exames e obtenção de medicamentos. Soma-se a isso, o aspecto cultural e à facilidade de obtenção de plantas medicinais (VEIGA JUNIOR et al., 2005). Além disso, o aumento do custo dos medicamentos e o incentivo ao consumo de produtos naturais, promovido pelas mídias, afetam não só a parcela carente, mas também as demais classes sociais (AZEVEDO e SILVA, 2006; BRASILEIRO et al., 2008).

Uma vez que o natural vem acompanhado da ideia de que é saudável, muitos utilizam plantas medicinais sem se preocupar se elas apresentam algum tipo de efeito adverso, seja esse ocasionado por suas próprias substâncias, ou até pela presença de adulterantes que estiveram envolvidos desde o cultivo até a preparação do fitoterápico (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). Desta forma, é importante inclusive que sejam realizados estudos em plantas de uma mesma espécie, mas que se encontram em regiões diferentes, pois modificações químicas podem ocorrer em decorrência da manipulação humana e de fatores ambientais variáveis (MACIEL et al., 2002).

Em 2012, segundo dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), 1026 casos de intoxicação por plantas foram registrados no Brasil. As pesquisas para se averiguar a seguridade são incipientes no país e um número considerável de espécies da flora nativa ainda são consumidas sem se conhecer, ou, tendo-se poucos estudos de suas propriedades farmacológicas (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Efeitos tóxicos gerados por espécies vegetais são variados e estão relacionados ao produto de seus metabólitos secundários. Reações alérgicas, assim como distúrbios respiratórios, cardiovasculares e neurológicos, são alguns dos efeitos dessas substâncias ao entrarem em contato com o organismo (MACÊDO et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2009). Diversos compostos químicos isolados de espécies consideradas medicinais e associados a proteção da planta com o ataque de microrganismos e predadores, apresentaram ação citotóxica ou genotóxica, ocasionando danos ao DNA e levando a efeitos carcinogênicos (AMES et al., 1983; AGNER et al., 1999 apud MACÊDO et al., 2008). Por isso, testes toxicológicos e toxicogenéticos, assim como análises para compreensão da verdadeira funcionalidade das plantas em relação aos motivos pelos quais elas são empregadas na medicina popular, são de total importância para uma utilização segura e para contribuir com a comunidade científica, viabilizando a continuação de estudos na área e possibilitando uma ampliação de conhecimentos sobre o tema.

I.2. *Persea americana* Mill.

Persea americana Mill., espécie pertencente à família Lauraceae, é popularmente conhecida como abacateiro, possuindo uma copa arredondada e densa; comprimento em média de 12 a 20 metros, mas podendo ultrapassar os 30 metros; folhas simples e um fruto de casca verde-escuro (figura 1) e polpa cremosa, com uma única semente grande e esférica em seu interior (PINTO, 1873). Seu cultivo se dá principalmente em regiões temperadas e escassamente nas áreas tropicais, sendo visada principalmente pela produção de seus frutos e por ser uma espécie explorada na medicina popular (ANTIA et al., 2005).

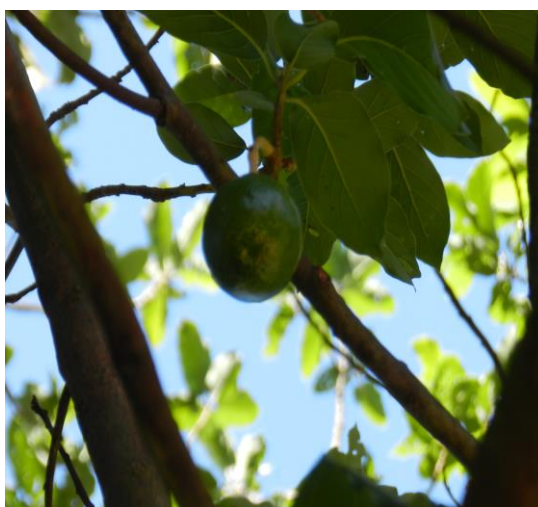


Figura 1. Folha e fruto de *P. americana*, Mill.



Figura 2. Indivíduo do qual foram coletadas as folhas. Localizado nas coordenadas 22°45'48.8"S; 43°41'42.0"W

No Brasil, segundo Pio Corrêa, a *P. americana* foi introduzida no início do século XIX, em 1809, sendo originária da América tropical, na região compreendida entre o México e o Peru. Hoje seu cultivo está espalhado em quase todo território nacional, sendo em maior número nas áreas tropicais e subtropicais do país (Ministério da Saúde, 2002; LORENZI e MATOS, 2008).

O óleo extraído da polpa do fruto é estável, não secativo, rico em vitaminas A, B, D, E e G, fitosterol e lecitina, o que lhe garante importantes propriedades na preparação de cosméticos, como cremes para tratamento de pele seca, contra radiação ultravioleta, antienvhecimento e compostos antioxidantes (LORENZI e MATOS, 2008; GUIMARÃES, 2015). Na Nigéria, o extrato das folhas de *P. americana* tem sido usado como antidiabético, anti-hipertensivo, analgésico e anti-inflamatório (ADEYEMI et al., 2002; OWOLABI et al., 2005; ANTIA et al., 2005). No Brasil, extratos alcoólicos caseiros são utilizados como produtos tópicos para dores reumáticas, contusões e dores de cabeça (LORENZI e MATOS, 2008).

A rica quantidade de fitoquímicos que a *P. americana* apresenta, é alvo de diversas pesquisas, o que gera benefícios no seu entendimento e possibilita identificar seus efeitos benéficos e prejudiciais. Estudos com extratos do fruto, sendo esses etanólicos, clorofórmicos, de acetato de etila e petróleo, demonstraram a presença de componentes com importante papel na inibição do crescimento de células cancerosas, evidenciando efeito anticancerígeno no esôfago e no cólon de pacientes com câncer (LALEH, 2013). Em 2013, Falodun et al. isolaram um composto do extrato metanólico da casca da raiz, que também demonstrou propriedade anticancerígena, só que este contra células do câncer de mama.

Contrário aos benefícios, o extrato metanólico das folhas e fruto apresentou efeito genotóxico. Os pesquisadores observaram a presença de aberrações cromossômicas tais como quebras, deleções e fragmentos em linfócitos periféricos humanos (KULKARNI et al., 2010). Além disso, o extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana*, assim como de diversas outras plantas, demonstraram aumentar a absorção dermal de ¹⁴C-cafeína (MUHAMMAD et al., 2016).

Os resultados dos trabalhos citados acima demonstram mais uma vez que, contradizendo a crença de que há apenas propriedades benéficas, os extratos naturais podem conter componentes químicos com atividades mutagênicas, teratogênicas e/ou carcinogênicas. Se os componentes genotóxicos estão presentes, eles podem intercalarse com a molécula de DNA, levando a danos genéticos em regiões de controle do ciclo

celular e apoptose, acelerando o processo neoplásico. Dessa forma, é muito importante a inclusão da abordagem genotóxica em avaliações toxicológicas dos compostos terapêuticos (SANTOS et al., 2008).

Como extratos obtidos a partir de *P. americana* são utilizados no tratamento de diversas enfermidades, muitas vezes de forma indiscriminada e sem cautela, faz-se necessário testes de citotoxicidade e genotoxicidade para aferir seu uso de forma segura.

I. 3. TESTE DO MICRONÚCLEO *in vivo*

Em âmbito mundial, tem-se encontrado forte relação entre exposição a agentes genotóxicos e desenvolvimento de diversos efeitos nocivos à saúde, principalmente com a incidência de câncer e defeitos ao nascimento (FERNÁNDEZ, 2003). O teste do micronúcleo consiste em um método amplamente utilizado para a detecção desses agentes, que atuam na quebra cromossômica ou na indução de aneuploidia e segregação cromossômica anormal (HAYASHI et al., 1994; RIBEIRO et al., 2003).

Os micronúcleos se formam pela extrusão de cromossomos inteiros ou seus fragmentos durante a divisão celular, sendo uma porção de cromatina resultante de mitoses aberrantes (REIS et al., 2004). O teste pode ser feito em diferentes tipos de célula, como vegetais, humanas e de outros mamíferos, desde que estas sejam capazes de se dividir ou então de induzir divisão; e que esse processo seja conhecido e passível de controle (FENECH, 2000; CHEQUER, 2008).

O micronúcleo foi reconhecido no final do século XIX pelo fisiologista americano, William Henry Howell e pelo hematologista e histologista francês, Justin Marie Jolly. Eles encontraram pequenas inclusões nas células sanguíneas retiradas de gatos e de ratos e denominaram-nas corpúsculo de Howell-Jolly. Posteriormente, estas foram também observadas nos eritrócitos do sangue periférico de pacientes que sofriam de anemia grave (HAYASHI, 2016).

Quase um século depois, em 1970, a dupla Boller e Schmid desenvolveu o que seria o primeiro método do teste utilizado para avaliar a frequência de eritrócitos micronucleados usando células da medula óssea e do sangue periférico do Hamster chinês, tratado com tremimon (BOLLER e SCHMID, 1970). Nos anos que se seguiram, ainda dentro da década de 1970, o grupo de Schmid fez aprimoramentos no modelo, que foi subsequentemente modificado por Heddle e colaboradores (RIBEIRO et al., 2003). Estes então foram os que construíram os conceitos básicos do teste do micronúcleo e os primeiros a sugerirem o método como uma forma alternativa e barata para se medir danos nos cromossomos (FENECH, 2000; RIBEIRO et al., 2003; HAYASHI, 2016).

Por volta de 1980, alguns países, bem como organizações internacionais, começaram a elaborar suas próprias diretrizes de teste para avaliar a segurança de produtos químicos. O grupo responsável pelo estudo de mutagênese de mamíferos, pertencente a Sociedade de Mutagênicos Ambientais do Japão (CSGMT / JEMS-MMS), começou a estudar os vários fatores que poderiam afetar os resultados do teste. A diferença relacionada ao sexo, idade, entre a injeção intraperitoneal e a aplicação de gavagem oral, foram alguns desses (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test, 1986, 1988; HAYASHI et al., 1989). Os resultados dos ensaios colaborativos foram de grande importância para padronização de protocolos (HAYASHI, 2016).

O Programa Internacional de Segurança Química desenvolveu, em 1983, um projeto para avaliar diferentes produtos químicos em um curto prazo. Carcinógenos e não cancerígenos foram avaliados por vários sistemas de teste *in vivo*, e o teste de micronúcleo obteve o melhor resultado para estimar o potencial cancerígeno de produtos químicos entre os ensaios estudados (ASHBY, 1988).

O ensaio feito em sangue periférico de camundongos analisa o efeito genotóxico do extrato através da observação de micronúcleo em eritrócitos policromáticos anucleados (PCEs). O PCE é o eritrócito jovem, que possui um tempo de vida relativamente curto, no sentido de que ele passou pelo processo de eritropoiese recentemente, fazendo assim com que qualquer micronúcleo que ele contenha, possivelmente tenha sido gerado pelo resultado de danos cromossômicos induzidos também recentemente. Os resultados obtidos da análise, quando positivos, fornecem fortes evidências de genotoxicidade sistêmica ocasionada pelo extrato estudado. Quando negativos, suportam a conclusão de que o mesmo não possui efeito genotóxico *in vivo* (RIBEIRO et al., 2003).

O teste do micronúcleo é amplamente aceito por agências internacionais e instituições governamentais, fazendo parte dos testes recomendados para se obter a seguridade de novos produtos que entram no mercado mundial anualmente, sendo estes: agrícolas, farmacêuticos, aditivos alimentares, entre outros (CHOY, 2001; RIBEIRO et al., 2003). Demonstrou-se também ser um método confiável e amplamente utilizado para se aferir o potencial genotóxico do extrato de plantas (SERPELONI et al., 2008; LUZ et al., 2012; BELCAVELLO et al., 2012).

I.4 . Objetivos

I.4.1. Objetivo geral

Investigar os possíveis efeitos genotóxicos e citotóxicos de extratos hidroalcoólicos obtidos a partir de folhas de *P. americana* através do sistema teste do micronúcleo *in vivo*.

I.4.2. Objetivo específico

Detectar os possíveis efeitos genotóxicos dos extratos de *P. americana* em eritrócitos coletados do sangue periférico de camundongos, pela frequência de micronúcleos;

Avaliar a citotoxicidade dos extratos de *P. americana* em eritrócitos de camundongos, pela alteração do índice de divisão mitótica, contabilizados pela frequência de eritrócitos policromáticos (PCE) em relação a eritrócitos normocromáticos (NCE).

II. MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Coleta e identificação da espécie vegetal

Folhas de um único espécime da espécie *P. americana* foram coletadas no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, nas coordenadas 22°45'48.8"S e 43°41'42.0"W. A espécie teve sua identificação confirmada pelo taxonomista Thiago de Azevedo Amorim do Departamento de Botânica da UFRRJ e depositada sob o número de registro RBR 37993.

II.2. Preparo dos extratos hidroalcoólicos

As folhas da planta, depois de secas à temperatura ambiente, foram armazenadas em frascos âmbar e mantidas em local contendo sílica gel para evitar a umidade. O extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana* foi obtido por maceração na proporção de 60g do material pulverizado e 700 mL de etanol 70%, à temperatura ambiente (25 a 30°C), por 72h, protegido da luz, com agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. Após esse período, o extrato foi filtrado e submetido à evaporação em banho-maria, à temperatura de 60°C, com a obtenção de 7.65g de massa seca (STANGE et al., 2008 com modificações). Uma porção do extrato seco foi pesada

e redissolvida em água destilada para obtenção da concentração utilizada no experimento.

II.3. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albino, machos e fêmeas, pesando em torno de 25g, obtidos no biotério institucional do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno contendo 10 camundongos cada tratamento, com livre acesso a comida e água, em um ciclo de 12 horas luz-escuro, com temperatura controlada de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$.

II.4. Investigação das potencialidades citotóxicas e genotóxicas dos extratos vegetais através do teste do micronúcleo *in vivo*

a) Tratamento:

Os ensaios foram realizados utilizando-se 10 animais por grupo, sendo 05 machos e 05 fêmeas. Grupo I (Experimental): Os animais deste grupo receberam uma dose única de 2000mg/Kg (dose máxima permitida) de extrato hidroalcoólico de folhas de *P. americana* por via oral (intragástrica). Grupo II (controle positivo): os animais receberam uma dose única de 50mg/Kg de ciclofosfamida por via intraperitoneal. Grupo III (controle negativo): receberam apenas água.

b) Preparo das lâminas:

Nos períodos de 48h e 72h após o tratamento, foram coletadas 2 a 3 gotas de sangue periférico de cada animal, pela punção do plexo retro orbital, nos três grupos de tratamento, para confecção das lâminas com os esfregaços. Estes procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Estadual da Zona Oeste (CEUA/UEZO), protocolo n°023/2016.

Após a confecção do esfregaço, as lâminas foram deixadas para secar por 24h, sendo em seguida fixadas em metanol por 10 minutos. Decorrido um prazo de 24 horas após a fixação, as lâminas passaram pelo processo de coloração, que consiste em 3 etapas: 1ª etapa) as lâminas permanecem por 5 minutos no corante de Leishman; 2ª etapa) 15 minutos em uma diluição de 1:6 do corante de Leishman em água destilada; 3ª etapa) 5 minutos em água corrente. Em seguida, as lâminas são postas na posição diagonal para escorrer a água e após secas são montadas com Entellan.

c) Análise das lâminas:

Para cada animal a presença de micronúcleos foi analisada em 4000 eritrócitos imaturos ou policromáticos (PCE), sendo 2000 no tempo de 48h após o tratamento, e 2000 decorridas 72h do tratamento. Para a avaliação do potencial citotóxico, a proporção de eritrócitos policromáticos (PCE) em relação aos eritrócitos maduros ou normocromáticos (NCE), dentre o total de eritrócitos (PCE + NCE), foi determinada contando-se 1000 eritrócitos por animal. As lâminas foram observadas sem conhecimento prévio do tratamento pertencente (às cegas), em microscópio óptico comum, com objetiva de 100X.

Tal protocolo utilizado na análise das laminas, é o proposto por Ribeiro et al. (2003).

d) Análise estatística dos dados:

Para a análise estatística dos dados obtidos através do teste do micronúcleo foi realizada o teste do qui-quadrado (χ^2). Uma diferença de $P < 0,05$ foi considerada significativa estatisticamente. O software utilizado foi o Bioestat 5.0

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas tabelas 1 e 2, representando, respectivamente, as análises feitas 48h e 72h após a aplicação, estão contidos os resultados das frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (Figura 2) e da relação PCE/NCE no sangue periférico de camundongos, submetidos aos 3 diferentes tratamentos.

Tabela 1. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em camundongos 48h após os diferentes tratamentos.

Tratamento	Número de PCEs analisadas	PCENMNs	PCEMNs		Relação PCE/NCE
			Nº	%	
Controle Positivo	20000	19917	83 ^(a)	0,415	0,0066 ^(c)
Controle Negativo	20000	19974	26 ^(b)	0,13	0,345 ^(a)
PA AH	20000	19991	9 ^(c)	0,045	0,164 ^(b)

(a) (b) e (c) letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) de acordo com o teste do χ^2 ; PA HA- Extrato hidroalcoólico de *P. americana*; PCEs – eritrócitos policromáticos; NCE – eritrócitos normocromáticos; PCEMNs – eritrócitos policromáticos micronucleados; PCENMNs – eritrócitos policromáticos não micronucleados.

Tabela 2. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em camundongos 72h após os diferentes tratamentos

Tratamento	Número de PCEs analisadas	PCENMNs	PCEMNs		Relação PCE/NCE
			Nº	%	
Controle Positivo	20000	19977	23 ^(a)	0,115	0,0012 ^(c)
Controle Negativo	20000	19992	8 ^(b)	0,04	0,177 ^(a)
PA AH	20000	19995	5 ^(c)	0,025	0,060 ^(b)

(a) (b) e (c) letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0.05$) de acordo com o teste do χ^2 ; PA HA- Extrato hidroalcoólico de *P. americana*; PCEs – eritrócitos policromáticos; NCE – eritrócitos normocromáticos; PCEMNs – eritrócitos policromáticos micronucleados; PCENMNs – eritrócitos policromáticos não micronucleados.

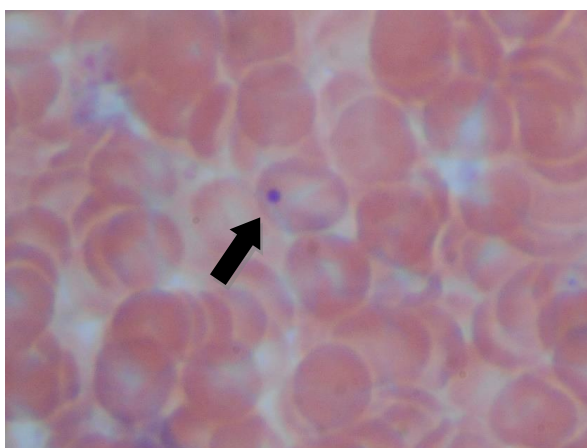


Figura 3. Eritrócito policromático micronucleado, visualizado em microscopia ótica, amplificação de 1000x. Demais células, com coloração avermelhada, eritrócitos normocromáticos não micronucleados.

De acordo com Ribeiro et al. (2013), para que uma substância seja considerada genotóxica através do teste do micronúcleo, deve haver um aumento significativo na frequência de PCEs micronucleados em relação ao controle negativo, seja qual for o tempo de amostragem. As análises realizadas nos dois intervalos de tempo, contabilizaram uma quantidade inferior de eritrócitos policromáticos micronucleados no sangue de camundongos tratados com o extrato, mesmo utilizando-se a dosagem máxima permitida de 2000mg/Kg. No intervalo de 48h, esta redução foi significativa mesmo quando comparada ao controle negativo. Esses resultados demonstram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana* não apresenta efeito genotóxico direto.

Foi notória a redução na quantidade de eritrócitos policromáticos micronucleados, observados no controle positivo, 72h após o tratamento. Este é um dos intervalos de tempo recomendados pela OECD e por outros autores, como Ribeiro et al. (2013), entretanto, não parece ser o ideal para a avaliação dos resultados ao se utilizar a

ciclofosfamida como controle positivo na concentração de 50mg/kg. Essa redução no potencial genotóxico do controle positivo, possivelmente é ocasionado pela metabolização do produto e eliminação dos PCEs micronucleados. Outros autores, como Berno et al. (2016) e Schneider et al. (2016) também obtiveram resultados em que o número de eritrócitos micronucleados apresentou uma diminuição conforme o tempo decorrido após a aplicação da ciclofosfamida.

Embora o extrato não tenha apresentado efeito genotóxico, houve uma diferença significativa na relação PCE/NCE entre os tratamentos. Os animais submetidos ao tratamento com o extrato apresentaram uma relação significativamente menor entre PCEs e NCEs quando comparados ao controle negativo. Segundo Carvalho-Oliveira et al. (2005), a capacidade citotóxica de um extrato é avaliada por um aumento ou diminuição do índice mitótico quando as células são expostas a ele, assim, visto que o extrato hidroalcoólico das folhas da *P. americana* causou uma diminuição na proporção de PCEs quando comparada ao controle negativo, pode-se aferir um efeito citotóxico. Vários trabalhos relatam que a presença de efeitos citotóxicos na ausência de genotoxicidade é uma observação comum (FACHINETTO et al., 2007; LUZ et al., 2012; GOMES et al., 2015; LIMA et al., 2016)

A diminuição na relação PCE/NCE indica que componentes presentes no extrato podem influenciar no crescimento e desenvolvimento celular. Em estudo realizado por Borella et al. (2009), a análise fitoquímica do extrato aquoso das folhas de *P. americana* revelou a presença de taninos e flavonoides, e as atividades enzimáticas associadas a esse último, de acordo com Teixeira et al. (2003), podem ser responsáveis pela inibição da divisão celular. A análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana*, realizada por nosso grupo, demonstrou que além de tanino e compostos fenólicos (flavonas, flavonóis e xantonas), o mesmo também contém saponinas e alcaloides.

As saponinas são produtos do metabolismo secundário que apresentam uma grande variabilidade em estrutura e muitas classes de saponinas já demonstraram algum tipo de atividade antitumoral, algumas atuando através da inibição do ciclo celular e indução de apoptose (UPADHYAY e SINGH, 2012).

Alcalóides são metabólitos secundários provenientes de aminoácidos contendo pelo menos um nitrogênio básico em um anel heterocíclico (RISTON, 2006 apud CORDELL, 1981). Alguns alcaloides extraídos de plantas possuem efeito antitumoral, que por sua vez, está associado a ação antimitótica. O efeito citotóxico dessas

substâncias tem atraído o interesse para pesquisas no desenvolvimento de antineoplásicos no tratamento de câncer (MARQUES e LOPES, 2015).

Além de não ter sido detectada a presença de genotoxicidade, os resultados obtidos neste trabalho indicam um efeito protetor do extrato, visto que, 48h após o tratamento, o número de PCEs micronucleados nos animais submetidos ao extrato foi significativamente menor quando comparado ao controle negativo. Tal efeito pode estar relacionado aos flavonoides e taninos presentes no extrato, aos quais se atribuem propriedades antioxidativas importantes para proteção contra danos celulares. Kaurinovic et al. (2010), por exemplo, associaram o efeito protetor do extrato metanólico de *Laurus nobilis*, família Lauraceae, a eliminação de radicais livres pela presença de flavonoides e sesquiterpenos e Chung et al. (1998), relacionaram o potencial anticarcinogênico e antimutagênico de taninos à sua propriedade antioxidativa na proteção de componentes celulares, incluindo a peroxidação lipídica, quebras no DNA e a formação de 8 hidroxideoxiguanosina. Efeito antimutagênico na ausência de genotoxicidade já foi relatado em outros trabalhos (TAVARES et al., 2011; LIMA et al., 2013).

Resultados semelhantes foram obtidos em outros trabalhos feitos pelo nosso grupo do Laboratório da Atividade Genotóxica de Plantas (LAGeP), ao analisar o extrato hidroalcoólico das folhas de *P. americana* utilizando o sistema teste de *Allium cepa* (SOUZA, 2017). As células meristemáticas das cebolas submetidas ao tratamento não apresentaram aberrações cromossômicas ou presença de micronúcleos, o que demonstra uma ausência de efeito genotóxico direto, segundo o mesmo autor. O efeito citotóxico na ausência de genotoxicidade também foi observado: células com alterações nucleares características de processos de morte celular, alterações citoplasmáticas, vacúolos citoplasmáticos e células em apoptose foram visualizadas por Souza (2017). Além disso, o índice mitótico nas células tratadas com o extrato também se mostrou significativamente menor quando comparado ao do controle negativo. Foi notório a similaridade dos resultados obtidos no teste feito em célula animal, quando comparado ao teste feito em célula vegetal.

III.1 Considerações finais

Os resultados obtidos neste trabalho através das análises realizadas com o teste do micronúcleo evidenciam que o extrato hidroalcoólico de *P. americana* não induz dano cromossômico ou numérico nos eritrócitos imaturos, mesmo utilizando-se a dosagem máxima permitida de 2000mg/Kg. Sendo assim, não apresenta riscos com

relação ao seu potencial genotóxico. Entretanto, foi observado um efeito citotóxico antiproliferativo significativo, demonstrado pela redução de eritrócitos imaturos (PCE) no sangue periféricos dos camundongos submetidos ao extrato.

Portanto, para que se tenha um grau adequado de segurança em seu uso, tanto na forma *in natura* quanto na produção de fármacos, mais pesquisas no campo da mutagenicidade deverão ser feitas. Análise em DNA cometa e sistema de testes com *Drosophila melanogaster*, estão entre os projetos futuros do LAGeP.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEYEMI, O.o; OKPO, S.o; OGUNTI, O.o. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae). **Fitoterapia**, [s.l.], v. 73, n. 5, p.375-380, ago. 2002. Elsevier BV.
- AKERELE, O. **Importance of medicinal plants: WHO's programme**. In: Natural Resources and Human Health: plants of medicinal and nutritional value. Elsevier: Amserdam, 1992.
- Alimentos regionais brasileiros/ Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. – 1. ed.– Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
- AMES, B.N. Dietary Carcinogens and Anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, [s.l.], v. 221, n. 4617, p.1256-1264, set. 1983.
- ANTIA, B.S.; OKOKON, J.E.; OKON, P.A. Hypoglycemic activity of aqueous leaf extract of *Persea americana* Mill. **Indian Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 37, n. 5, p.325-326, out. 2005.
- ASHBY, J. **Evaluation of Short-term Tests for Carcinogens: Report of the International Programme on Chemical Safety's Collaborative Study on *in Vivo* Assays**. New York: Cambridge University Press, 1988.
- AZEVEDO, S.K.S.; SILVA, I.M. Plantas Medicinaiis e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Act Botanica Brasilica**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.185-194, 2006.
- BELCAVELLO, L. et al. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza On Line**, Santa Teresa, Es, v. 3, n. 10, p.140-145, jul-set. 2012.
- BERNO, C.R. et al. 4-Aminoantipyrine reduces toxic and genotoxic effects of doxorubicin, cisplatin, and cyclophosphamide in male mice. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [s.l.], v. 805, p.19-24, jul. 2016.

- BOLLER, K.; SCHMID, W. Chemische Mutagenese beim Sauger. Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als *in vivo*-Testsystem: Hämatologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon. **Humangenetik**, [s.l.], v. 11, p.35-54, 1970.
- BORELLA, J. et al. Efeito alelopático de extratos aquosos de *Persea americana* Mill. sobre *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 3, p.260-265, set. 2009.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 136 p.: il. – (Série C. Projetos, Programas e Relatórios, 1ª edição).
- BRASILEIRO, B.G. et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “programa de saúde da família”. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Governador Valadares, v. 44, n. 4, p.629-635, 2008.
- CANTARELLI, A.P. **Estudos da utilização de plantas medicinais pelos usuários do Sus e das práticas dos profissionais de saúde de Doutor Maurício Cardoso em relação à fitoterapia**. 2012, 70 f. Monografia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Três Passos, RGS.
- CARVALHO-OLIVEIRA, R. et al. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil. **Environmental Research**, [s.l.], v. 98, n. 1, p.1-7, maio 2005.
- CHEQUER, F.M.D. **Utilização do Teste de Micronúcleo na avaliação da toxicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13**. 2008. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.
- CHOY, W.N. Regulatory Genetic toxicology tests. In: DEKKER, Marcel. **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. New York: Copyright, 2001. p. 93-113.
- CHUNG, K. et al. Tannins and Human Health: A Review. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [s.l.], v. 38, n. 6, p.421-464, ago. 1998. Informa UK Limited.

- DERVENDZI V. **Contemporary treatment with medicinal plants**. Skopje: Tabernakul, 1992.
- FACHINETTO, J.M. et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.49-54, mar. 2007.
- FALODUN, A. et al. Novel anticancer alkene lactone from *Persea americana*. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 51, n. 6, p.700-706, abr. 2013.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, [s.l.], v. 455, n. 1-2, p.81-95, nov. 2000.
- FERNÁNDEZ, M.E.M. et al. Detección del daño genotóxico agudo y crónico en una población de laboratoristas ocupacionalmente expuestos. **Iatreia**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.275-282, dez. 2003.
- GOMES, J.V. et al. Induction of cytotoxic and genotoxic effects of Guandu River waters in the *Allium cepa* system. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal Of Applied Science**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.49-58, 1 jan. 2015.
- GUIMARÃES, K.F. **Atividade antioxidante da espécie *Persea americana* comercializada no município de palmas - TO**. 2015, 37 f. Monografia - Curso de Ciências Farmacêuticas, Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas, 2015.
- HAYASHI, M. et al. Difference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test. **Mutation Research/genetic Toxicology**, [s.l.], v. 223, n. 4, p.329-344, ago. 1989.
- HAYASHI, M. et al. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, [s.l.], v. 312, n. 3, p.293-304, jun. 1994.
- HAYASHI, M. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. **Genes And Environment**, [s.l.], v. 38, n. 18, p.1-6, out. 2016.
- KAURINOVIC, B. et al. In Vitro and *in Vivo* Effects of *Laurus nobilis* L. Leaf Extracts. **Molecules**, [s.l.], v. 15, n. 5, p.3378-3390, 7 maio 2010. MDPI AG.
- KELLY, K. **EARLY CIVILIZATIONS: Prehistoric Times to 500 C. E.** New York: Facts On File, 2009.

- KULKARNI, P.; PAUL, R.; GANESH, N. In vitro Evaluation of Genotoxicity of Avocado (*Persea americana*) Fruit and Leaf Extracts in Human Peripheral Lymphocytes. **Journal Of Environmental Science And Health, Part C**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.172-187, ago. 2010.
- LIMA, V.M. de et al. Joannesia princeps: Evaluation of Aqueous Extracts Genotoxicity Utilizing *Allium cepa* Assay and Micronucleus Test. **Journal Of Life Sciences**, [s.l.], n. 12, p.1249-1254, dez. 2013.
- LIMA, V.M. et al. *Mangifera indica* L.: Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potencial of the aqueous extract by the *Allium cepa* test. **World Journal Of Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.352-361, 2016.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2. ed. São Paulo: Plantarum, 2008.
- LUZ, A.C. et al. Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste in vivo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 14, n. 4, p.635-642, 2012.
- MACÊDO, M.F.S. et al. Determining the genotoxicity of an aqueous infusion of *Bauhinia monandra* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 4, p.509-516, 2008.
- MACIEL, M.A.M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.429-438, maio 2002.
- MAMEDOV, N. Medicinal Plants Studies: History, Challenges and Prospective. **Medicinal & Aromatic Plants**, [s.l.], v. 01, n. 08, 2012.
- MARQUES, J.P.; LOPES, G.C. Alcaloides como agentes antitumorais: considerações químicas e biológicas. **UningÁ Review**, Maringá, Pr, v. 21, n. 1, p.56-61, 2015.
- MUHAMMAD, F.; WILEY, J.; RIVIERE, J.E. Influence of some plant extracts on the transdermal absorption and penetration of marker penetrants. **Cutaneous And Ocular Toxicology**, [s.l.], v. 36, n. 1, p.60-66, mar. 2016.
- OECD. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. **OECD Publishing**, Paris, 2014.

- OWOLABI, M.A.; JAJA, S.I.; COKER, H.A.b. Vasorelaxant action of aqueous extract of the leaves of *Persea americana* on isolated thoracic rat aorta. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 76, n. 6, p.567-573, set. 2005.
- PETROVSKA, B.B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, [s.l.], v. 6, n. 11, p.1-5, 2012.
- PINTO, J.A. **Diccionario de botânica brasileira**. Rio de Janeiro: Tipografia Perseverança, 1873.
- REIS, S.R.A. et al. Avaliação da presença de micronúcleos em células esfoliadas da língua de indivíduos dependentes químicos de etanol através dos métodos de Feulgen e Papanicolau. **Revista Odonto Ciência**, v. 19, n. 46, p. 367-371, 2004.
- RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.
- RISTON, J.R. **Estudos Visando à Síntese Estereosseletiva do Alcalóide 275A**. 2006. 191 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- SANTOS, R.A. et al. Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated in vitro. **Biocell**, [s.l.], v. 2, n. 32, p.195-200, 2008.
- SCHNEIDER, B.U. Catelan et al. Cardanol: toxicogenetic assessment and its effects when combined with cyclophosphamide. **Genetics And Molecular Biology**, [s.l.], v. 39, n. 2, p.279-289, jun. 2016.
- SERPELONI, J.M. et al. Avaliação in vivo da anticlastogenicidade de extratos de plantas medicinais do gênero *Miconia* através do teste do micronúcleo. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.47-56, 15 jul. 2008.
- SINITOX (Sistema Nacional de Informações Toxicológicas) [online]. **Registros de Intoxicações/ dados nacionais/ 2012** Disponível em <<http://www.fiocruz.br/sinitox/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=411>> (acesso em 10/04/2017).
- SOUSA, J.V. Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de extratos hidralcoólicos de *Persea americana* Mill., planta medicinal da Família Lauraceae. 2017. Monografia- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2017.

- STANGE, S. et al. Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto, por meio de bioensaios in vivo e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), Cecropiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.637-642, jun. 2009.
- SUTOU, S. Sex difference in the micronucleus test. **Mutation Research/genetic Toxicology**, [s.l.], v. 172, n. 2, p.151-163, nov. 1986.
- SUTOU, S. Strain difference in the micronucleus test. **Mutation Research/genetic Toxicology**, [s.l.], v. 204, n. 2, p.307-316, fev. 1988.
- TAVARES, D. et al. Antimutagenic Potential of *Solanum lycocarpum* against Induction of Chromosomal Aberrations in V79 Cells and Micronuclei in Mice by Doxorubicin. **Planta Medica**, [s.l.], v. 77, n. 13, p.1489-1494, 7 mar. 2011.
- TEIXEIRA, R.O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in in vitro and in vivo assays. **Genetics And Molecular Biology**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.551-555, dez. 2003.
- TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.289-306, jun. 2006.
- UPADHYAY, A.; SINGH, D.K. Pharmacological effects of *Sapindus mukorossi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s.l.], v. 54, n. 5, p.273-280, out. 2012.
- VAHEDI LARIJANI, L. et al. Evaluating the effect of four extracts of avocado fruit on esophageal squamous carcinoma and colon adenocarcinoma cell lines in comparison with peripheral blood mononuclear cells. **Acta Medica Iranica**, [s.l.], v. 52, n. 3, p.201-205, 2014.
- VASCONCELOS, J.; VIEIRA, J.G.P.; VIEIRA, E.P.P. Plantas Tóxicas: Conhecer para Prevenir. **Revista Científica da UFPA**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-10, 2009.
- VEIGA JUNIOR; V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? **Química Nova**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.519-528, jun. 2005.
- WIART, C. **Ethnopharmacology of Medicinal Plants: Asia and the Pacific**. Totowa: Humana Press, 2006.