

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE MUNDO NOVO
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SANDRA DE SOUZA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA E
FOTOGENOTÓXICA DO EXTRATO OBTIDO DAS
RAÍZES DE *Brosimum gaudichaudii* TRÉCUL E *Dorstenia
brasiliensis* LAM. (MOREACEA)**

Mundo Novo – MS

Outubro 2012

SANDRA DE SOUZA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA E
FOTOGENOTÓXICA DO EXTRATO OBTIDO DAS
RAÍZES DE *Brosimum gaudichaudii* TRÉCUL E *Dorstenia
brasiliensis* LAM. (MOREACEA)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul,
como parte dos requisitos para obtenção do
grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Zaira da Rosa Guterres

Mundo Novo – MS

Outubro 2012

SANDRA DE SOUZA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA E
FOTOGENOTÓXICA DO EXTRATO OBTIDO DAS
RAÍZES DE *Brosimum gaudichaudii* TRÉCUL E *Dorstenia
brasiliensis* LAM. (MOREACEA)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

APROVADO EM ____ de _____ de 2012

Prof^a. Dr^a. - Zaíra da Rosa Guterres Orientadora - UEMS _____

Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes – UEMS _____

Prof. Msc. Cássia Fernanda Yano - UEMS _____

Dedico este trabalho a minha família, pela compreensão, paciência, amor, e respeito para comigo. Nas horas difíceis me deram apoio, conselhos e incentivos para não desistir. E ao meu namorado Peterson que durante estes quatro anos foi companheiro, amigo, compreensivo e me apoiou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me concedeu vida, saúde e sabedoria, pois sem os tais não estaria neste ano concluindo a minha graduação.

Agradeço a minha mãe e ao meu pai que em todos os momentos me ajudaram, com palavras maravilhosas, orando por mim sempre que eu achava que não iria conseguir, mas pela graça de Deus consegui chegar ao final deste curso. Tiveram muita compreensão, carinho, amor, paciência para comigo.

Não poderia deixar de agradecer aos meus irmãos Thiago e Davi que me ajudaram e tiveram paciência comigo com o nervoso fala mais alto que tudo.

Também quero agradecer a minha professora Zaira da Rosa Guterres que deste o primeiro ano de graduação foi minha professora, sempre pude contar com esta pessoa maravilhosa que possui um grande conhecimento e me ajudou fazer trabalhos até mesmo de outras matérias, sempre estava disponível quando eu precisei. Não poderia esquecer que esta mãezinha me orientou na elaboração deste trabalho de conclusão de curso teve um carinho enorme para comigo, poderia dizer milhões de palavras mas seria pouco demais para dizer o tanto que te admiro e tenho um carinho para contigo, mas o que eu posso lhe dizer minha amiga é um simples muito obrigada por tudo, não existe dinheiro que pague o que fizeste por mim.

Agradeço ao meu namorado Peterson e toda sua família principalmente a vovó Raimunda pelo o apoio, carinho, compreensão e palavras amigas que ficaram para sempre arquivadas na minha memória.

Agradeço as minhas amigas de laboratório, principalmente a Thalita Zanetti que passamos muitos dias juntas no laboratório.

Agradeço de uma maneira geral a todos os professores, as secretárias, as bibliotecárias e minha amiga Rosalina que zela da limpeza da universidade, pois sem esta equipe eu não teria realizado o meu sonho, um muito obrigado a todos vocês família UEMS de Mundo Novo.

Agradeço a todos os amigos e colegas de classe, pois foi muito bom estudar juntamente com vocês, posso dizer que a companhia dos mesmos foi importante, pois podemos aprender juntos nestes quatro anos.

Agradeço a todos que de uma maneira direta ou indireta me ajudaram alcançar e realizar do meu sonho.

“Um ladrão rouba um tesouro, mas não furta a inteligência. Uma crise destrói uma herança, mas não uma profissão. Não importa se você não tem dinheiro, você é uma pessoa rica, pois possui a maior de todos os capitais: a sua inteligência. Invista nela. Estude!”

Augusto Cury

RESUMO

A família Moreacea possui cerca de 50 gêneros e 1500 espécies, no Brasil são encontradas 27 gêneros com aproximadamente 250 espécies, constituídas por árvores e arbustos, os gêneros mais conhecidos são *Artocarpus*, *Dorstenia* e *Brosimum*. A *Brosimum gaudichaudii* Trécul, é uma espécie nativa do cerrado, popularmente conhecida, como mama-cadela. A *Dorstenia brasiliensis* Lam., é uma erva perene, conhecida popularmente como figueirinha. As folhas de *B. gaudichaudii* T., são empregadas pela medicina popular como medicamento contra gripes e bronquites. Nas cascas, raízes e frutos verdes desta planta são encontrados um princípio ativo utilizado no tratamento de doenças da pele tais como psoríase e do vitiligo. A *D. brasiliensis* L. é utilizada pela medicina popular como anticonceptiva e antimalárica. Nestas plantas são encontradas as furanocumarinas, principalmente psoraleno e bergapteno, que possuem a capacidade fotossensibilizante. Considerando a utilização da *B. gaudichaudii* e *D. brasiliensis* pela medicina popular para o tratamento de diversas doenças, além da ausência de informações sobre as possíveis atividades genotóxicas e ou fotogenotóxicas, Justifica-se a investigação destas atividades por meio do ensaio SMART – Somatic Mutation And Recombination Test, em células somáticas de *Drosophila melanogaster* nas linhagens padrão (ST) e alta bioativação (HB). Para tanto, foram utilizadas larvas de terceiro estágio de desenvolvimento das respectivas linhagens, tratadas seguindo dois protocolos (genotoxicidade e fotogenotoxicidade). No protocolo de genotoxicidade, os extratos etanólicos obtidos de raízes de *B. gaudichaudii* e *D. brasiliensis*, foram avaliados em três concentrações (0,4; 0,8 e 1,6 mg/mL). Como controle positivo utilizou-se 8-metoxipsoraleno (8-MOP) nas concentrações de (0,1; 0,2 e 0,4 mg/mL); como controle negativo o solvente (água Milli-Q, 1% de Tween-80 e 3% etanol. Para avaliar a fotogenotoxicidade, grupos de larvas, foram transferidos para frascos de vidro contendo os extratos, em três concentrações (0,4; 0,8 e 1,6 mg/mL), os quais foram irradiados com luz UVA com comprimento de onda de 340 nm por 15 minutos, posteriormente foram transferidas para frascos contendo meio de cultura. Os resultados observados nos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, indicaram que os extratos e o controle positivo não são genotóxicos, porém houve um aumento estatisticamente significativo nas frequências de todas as categorias de manchas mutantes em presença de irradiação UVA. Indicando que na presença de irradiação os extratos e o 8-MOP apresentam atividade fotogenotóxica.

Palavras chaves: SMART. Vitiligo. Fitoterápico. Drosófila.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivos específicos	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Coleta e preparação dos extratos	11
3.2 Teste SMART	12
3.3 Análise estatística	13
4. RESULTADOS	13
4.1 Frequências de manchas mutantes obtidas nos descendentes ST sem irradiação UVA	13
4.2 Frequências de manchas mutantes obtidas nos descendentes HB sem irradiação UVA	15
4.3 Frequências de manchas mutantes obtidas nos descendentes ST com irradiação UVA	17
4.4 Frequências de manchas mutantes obtidas nos descendentes HB com irradiação UVA	20
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

A família Moreacea possui cerca de 50 gêneros e 1500 espécies e no Brasil são encontradas 27 gêneros com aproximadamente 250 espécies, constituídas por árvores e arbustos (JACOMASSI, et al., 2006). As espécies mais comuns desta família são a amoreira (*Morus* sp), a figueira (*Ficus* spp), a jaqueira (*Artocarpus* spp) e a fruta pão (*Artocarpus* spp) e os gêneros mais conhecidos no Brasil são *Artocarpus*, *Ficus*, *Morus*, *Dorstenia* e *Brosimum* (WATSON; DALLWITZ, 2004).

A *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moreacea), uma espécie nativa do cerrado, com ampla distribuição nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, popularmente conhecida, como mama-cadela, mamica-de-porco, mamica-de-cadela entre outros (JACOMASSI, et al., 2006). Apresenta a madeira leve e macia com utilização na marcenaria, as plantas jovens são empregadas na fabricação de papel; as folhas e frutos servem na dieta alimentar de bovinos, como forrageira (TATAGIBA, 2009). Já a *Dorstenia brasiliensis* Lam. (Moreacea), é uma erva perene, típica dos campos, sendo uma espécie nativa do sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina (BAUER, et al., 1986), conhecida popularmente como figueirinha, carapiá, contraerva, entre outros nomes (PLANTAMED, 2012).

A *B. gaudichaudii* T. tem sido utilizada em estudos multidisciplinares, principalmente por suas propriedades medicinais (JACOMASSI, et al., 2006). É empregada pela medicina popular como medicamento contra gripes, bronquites e como depurativo para o sangue. Nas cascas, raízes e frutos verdes desta planta é encontrado um princípio ativo utilizado no tratamento de doenças da pele tais como psoríase, hanseníase, leucodermia, micoses, dermatite, eczemas e do vitiligo que é uma doença de despigmentação da pele com prevalência de aproximadamente 2% da população mundial (TATAGIBA, 2009).

Segundo Macedo e Ferreira (2004) *B. gaudichaudii* T., geralmente é usada na forma de banho e chás, o órgão mais utilizado é a folha, seguido por cascas do caule, frutos, raízes e sementes, em alguns casos a planta inteira também pode ser utilizada. *B. gaudichaudii* T. (Moraceae), é mais utilizada na forma de banho para tratar o vitiligo e manchas na pele.

Nesta planta encontram-se as furanocumarinas, principalmente psoraleno e bergapteno, que possuem a capacidade fotossensibilizante, sendo responsáveis pelo efeito da repigmentação da pele. A partir da porção inferior do caule e da raiz de *B. gaudichaudii* T., foi elaborado um medicamento comercializado pelo nome de Viticromin®, cujo mecanismo de ação ainda não está esclarecido (LEÃO, et al., 2005).

A *D. brasiliensis* L. é utilizada pela medicina popular como anticonceptiva, antimalárica, anti-reumática, diurética, estimulante digestivo, purgativo, sudorífera, tônico, a partes utilizadas como medicamento são as raízes principalmente, mas pode utilizar a planta por inteiro (PLANTAMED, 2012).

Segundo Bauer et al., (1986) *D. brasiliensis* L. também encontram-se as furanocumarinas, principalmente psoraleno e bergapteno, que possuem a capacidade fotossensibilizante que estão sendo utilizados na terapia destas afecções, combinando-se a sua ingestão com a exposição da luz UV-A.

Apesar da utilização popular da *B. gaudichaudii* T. para tratar diversas doenças, há poucos relatos na literatura sobre as possíveis atividades biológicas (citotóxica, genotóxica e fotogenotóxica) de extratos obtidos desta planta.

Em estudo fitoquímico da casca da raiz de *B. gaudichaudii* T., foram isolados derivados do ácido cinâmico e diidrocinâmico, dez cumarinas entre elas o psoraleno e bergapteno (MONTEIRO et al., 2002). A utilização de plantas contendo cumarinas ou furanocumarinas com propósitos medicinais datam de 2000 a.C., entretanto, suspeita-se que o aumento do uso destas substâncias na medicina popular está ligado à alta incidência de câncer de pele e outras desordens como mutação gênica e aberrações cromossômicas (DIAWARA; TRUMBLE, 1997).

Os psoralenos, tais como o 8-metoxipsoraleno(8-MOP) e 4,5,8-trimetilpsoraleno (TMP) são comumente utilizados em combinação com radiação ultravioleta A (UVA) a irradiação da luz (PUVA) para o tratamento de várias doenças auto-imune, tais como psoríase, vitiligo, linfoma cutâneo das células T, esclerose sistêmica, artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico, entre outros (MESSER et al, 2012). Psoralenos são produtos naturais (furocumarinas lineares) presentes em várias famílias de plantas que são extremamente tóxicos para uma grande variedade de organismos procarióticos e eucarióticos (FRANSCISCO et al, 2012).

Em decorrência das atividades atribuídas as furanocumarinas é necessário determinar o teor destas substâncias em plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos utilizados pelo ser humano, assim como avaliar as possíveis atividades genotóxicas, para estabelecer medidas de controle no uso indiscriminado. Considerando que as furanocumarinas, como a maioria das cumarinas, são substâncias que absorvem energia na região do ultravioleta (UVA) e, por isso, são altamente reativas sob incidência de luz, podendo reagir com moléculas, tais com oxigênio no estado fundamental, resultando na formação do oxigênio singlete (1O_2) ou

radicais hidróxi (OH⁻) ou superóxido (O₂⁻) e com as bases nitrogenadas do DNA, causando mutações (VARANDA et al., 2002).

O teste SMART - Somatic Mutation And Recombination Test apresenta a vantagem de utilizar um organismo eucarioto que possui curto período de geração (aproximadamente 10 dias a 25° C); caracteres morfológicos bem definidos; sistema enzimático semelhante aos dos mamíferos, que permite o metabolismo de agentes xenobióticos; e grande número de linhagens mutantes, muito bem caracterizadas geneticamente (GRAF et al., 1996). É um teste barato, que produz resultados confiáveis, inequívocos e reproduzíveis.

D. melanogaster é um organismo modelo adequado, pois possuem baixo custo de manutenção em laboratório; um ciclo de vida curto, que permite o nascimento de uma nova geração a cada dez dias; a produção de proles numerosas, pois uma única fêmea pode gerar centenas de descendentes; a complexidade das características fenotípicas morfoanatômicas e metabólicas, (SEPEL; LORETO, 2010). É utilizado em pesquisa toxicológica (MUKHOPADHYAY et al., 2003) e em experimentos de genotoxicidade (GRAF et al., 1984, 1998). Além disso, o Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos recomendou o uso de *D. melanogaster* em pesquisas e testes (FESTING et al., 1998; BENFORD et al., 2000).

Segundo Lamar et al., (2002), o ensaio SMART, foi utilizado para avaliar a atividade genotóxica do extrato da planta *Phyllanthus orbicularis* HBK, neste sistema teste o extrato aquoso *P. Orbicularis* não induziu mutações.

Téllez et al., (2007), investigou a genotoxicidade do fitoterápico e dos extratos obtidos de *Equisetum myriochaetum* *in vivo* no ensaio de mancha da asa em *D. melanogaster*. O ensaio SMART foi aplicado na versão padrão com a atividade basal biotransformação (ST), bem como numa versão variante com o aumento da capacidade de bioativação citocromo P450-dependente (HB). O resultado deste estudo demonstrou que o fitoterápico e o extrato de *E. myriochaetum*, sob as condições experimentais testadas, não são genotóxico em experimentos *in vivo*.

Os dados encontrados com o SMART poderão ser extrapolados para humanos, uma vez que o seqüenciamento do genoma da *Drosophila melanogaster*, revelou uma alta conservação evolutiva quando comparado ao genoma humano, não apenas em nível de sequência de DNA, mas principalmente em relação às funções gênicas, demonstrando alta homologia genética (TINCKOO; RUSSELL, 2002).

Considerando a utilização da *B. gaudichaudii* T. e *D. brasiliensis* L. pela indústria de fitoterápicos e pela medicina popular para o tratamento de diversas doenças, além da ausência

de informações sobre as possíveis atividades genotóxicas e ou fotogenotóxicas atribuídas a estas plantas, justifica-se a investigação destas atividades por meio do ensaio SMART, em células somáticas de *Drosophila melanogaster* nas linhagens ST e HB.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a frequência de manchas (mutações) obtidas nos grupos tratados com o controle negativo.
- Relacionar a concentração utilizada com a frequência de mutações.
- Comparar a frequência de mutações dos grupos tratados com os extratos associados à luz ultravioleta (UV) com os resultados dos grupos tratados somente com os extratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

As raízes do *B. gaudichaudii* T. e *D. brasiliensis* L. foram coletadas pela doutoranda Adriana Elias Pires de Quevedo, do Programa de Pós – Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro- Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, no município de Campo Grande – MS, em outubro de 2010. As identificações das espécies foram realizadas pelo Dr. Arnildo Pott e o material testemunho depositado no CGMS, Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil sob a numeração 22325.

As cascas das raízes de *B. gaudichaudii* T. e *D. brasiliensis* L. foram secas em estufa com circulação de ar à temperatura de 40°C até peso constante, triturada em moinho de facas até pó grosso segundo a Farmacopéia Americana 23, ou seja, 100% < que 0.840 µm e 40% ≤ 250µm. O pó foi submetido à determinação dos teores de umidade de cinzas totais (Farmacopéia Brasileira, 4ª edição) e a análise organoléptica. O material pulverizado (600g) foi submetido à extração por percolação com etanol-água 7:3 na proporção vegetal/eluente de 20%. Após a remoção do etanol do percolado em evaporador rotatório a 40 °C, a solução aquosa resultante foi liofilizada obtendo-se os extratos secos.

Para ser utilizado no ensaio SMART, os extratos secos, foram diluídos em 1% de Tween-80, 3% de etanol e água Milli-Q, obtendo-se as concentrações de 0,4; 0,8 e 1,6 mg/mL.

3.2 TESTE SMART

O SMART foi realizado por meio de cruzamentos experimentais entre linhagens: (*mwh*, *flr³* e *ORR*) de *D. melanogaster*. Com essas linhagens foram realizados dois diferentes cruzamentos: 1] cruzamento padrão (ST- *standard cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens “*flr³*”; e 2] cruzamento de alta bioativação (HB- *high bioactivation cross*) entre machos, “*mwh*” e fêmeas virgens “*ORR/flr³*”.

Para a coleta de ovos, os casais dos cruzamentos ST e HB, foram transferidos para frascos contendo base ágar-ágar, coberta com uma camada de fermento biológico suplementado com sacarose, onde permaneceram por um período de 8 horas. Posteriormente as larvas de terceiro estágio de desenvolvimento 72 ± 4 h foram lavadas e coletadas com água corrente com auxílio de peneira de malha fina. Foram tratadas seguindo dois protocolos (genotoxicidade e fotogenotoxicidade): 1) Para avaliar a genotoxicidade, grupos de larvas foram transferidos para frascos de vidros contendo 1,5 g de meio alternativo (purê instantâneo de batata Yoki®) hidratado com três concentrações do extrato etanólico obtido das cascas das raízes de *B. gaudichaudii* T. e *D. brasiliensis* L., em três concentrações (0,4; 0,8 e 1,6 mg/mL). Como controle positivo foi utilizado o 8-MOP (metoxaleno, 8-metoxipsoraleno) nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4 mg/mL; e como controle negativo – solvente (água Milli-Q, 1% de Tween-80 e 3% etanol); 2) Para avaliar a fotogenotoxicidade, grupos de larvas, foram transferidos para frascos de vidro contendo o extrato obtido das cascas da raízes do *B. gaudichaudii* T. e *D. brasiliensis* L., em três concentrações (0,4; 0,8 e 1,6 mg/mL), os quais foram irradiados com luz UVA com comprimento de onda de 340 nm por 15 minutos, posteriormente foram transferidas para frascos contendo 1,5 g de meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo Yoki® - Yoki Alimentos S.A.). Como controle positivo foi utilizado o 8-MOP (metoxaleno, 8- metoxipsoraleno) nas concentrações de (0,1; 0,2 e 0,4 mg/mL) e como controle negativo o solvente (1% de Tween-80, 3% de etanol e água).

Adultos emergentes portadores dos dois tipos de genótipos: *mwh* + / + *flr³* (trans-heterozigoto marcado - MH) e *mwh* + / + *TM³*, *Bd^S* (heterozigoto balanceado – BH) foram

coletados e fixados em etanol 70%. As asas foram destacadas e montadas entre lâminas e lamínulas com solução de Faure e analisadas quanto á ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópios ópticos com magnificação de 400 X.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados observados com os grupos tratados com extrato etanólico obtido das cascas das raízes de *B. gaudichaudii* T. e *D. brasiliensis* L., em três concentrações (0,4; 0,8 e 1,6 mg/mL), foram avaliados estatisticamente por meio do teste Binomial Condicional (KASTEMBAUN; BOWMAN,1970), com nível de significância $\alpha=\beta=0,05$. As frequências de cada tipo de mancha mutante por mosca foram comparadas com os respectivos controles negativos, possibilitando a caracterização dos resultados como positivos, fraco-positivos, negativos ou inconclusivos (FREI; WÜRGLER, 1988). Na aplicação prática do método de decisão, além da hipótese nula, elaborou-se uma hipótese alternativa específica, que requer uma frequência de mutação 2 vezes maior no tratado, do que a obtida no controle negativo.

A hipótese nula postula que não há diferença na frequência de mutações entre o controle negativo e o indivíduo tratado, enquanto que a hipótese alternativa postula *a priori*, que os resultados no tratamento têm um aumento nas frequências de mutações que é 2 vezes maiores que a frequência espontânea observada no controle.

4. RESULTADOS

4.1 FREQUÊNCIAS DE MANCHAS MUTANTES OBTIDAS NOS DESCENDENTES ST SEM IRRADIAÇÃO UVA

Verifica-se que a frequência de mutações obtidas no controle negativo foi de 0,30, enquanto que os grupos tratados com extrato etanólico obtido das raízes de *B. gaudichaudii* L. apresentaram frequências de mutações variando de 0,35 a 0,48 (Tabela 1) e com extrato etanólico obtido das raízes de *D.brasiliensis* as frequências variaram de 0,38 a 0,73(Tabela 2).

Observa-se que 90% das manchas mutantes, obtidas nos grupos tratados com os extratos da *B. gaudichaudii* L. e *D. Brasiliensis* estão classificadas como simples pequena formada por até duas células. Entretanto, os indivíduos tratados com 8-metoxipsoraleno (8MOP) apresentaram frequências de manchas mutantes que variaram de 0,38 a 0,43,

distribuídas em apenas duas categorias: mancha simples pequena e manchas simples grande. Na ausência de UVA os indivíduos que foram tratados com 8-MOP apresentam frequências de mutações que não diferem das que foram observadas nos grupos tratados com o extrato etanólico.

Tabela 1- Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST) após tratamento com extrato etanólico obtido da raiz da *B. gaudichaudii* L (EBG) sem irradiação UVA.

Concentração mg/mL ⁻¹	Indiv. (N)	MSP (1-2 céls) ^b	MSG (>2 céls) ^b	MG	TM	Freq. de mutação por 10 ⁵ céls
ST		<i>m</i> = 2 ^a	<i>m</i> = 5 ^a	<i>m</i> = 5 ^a	<i>m</i> = 2 ^a	
C. N.	20	10 (0,25)	1 (0,03)	1 (0,03)	12 (0,30)	1,23
8-MOP (0,1)	20	12 (0,30) i	2 (0,05)i	1 (0,03) i	15 (0,38) i	1,54
8-MOP (0,2)	20	13(0,33) i	2 (0,05)i	0 (0,00) i	15 (0,38) i	1,54
8-MOP (0,4)	20	14 (0,35) i	3 (0,08)i	0 (0,00) i	17 (0,43) i	1,74
EBG (0,4)	20	14 (0,35) i	0 (0,00)i	1 (0,03) i	14 (0,35) i	1,43
EBG (0,8)	20	12 (0,30) i	2 (0,05)i	0 (0,00) i	14 (0,35) i	1,43
EBG (1,6)	20	16 (0,40) i	3 (0,08)i	0 (0,00) i	19 (0,48) i	1,95

MSP: Mancha simples pequena; **MSG:** Mancha simples grande; **MG:** Mancha gêmea; **TM:** Total de manchas.

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$;

^b Incluindo manchas simples *flr³* raras.

^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas;

^d Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwhTM³*, já que o cromossomo balanceador *TM³* não contém o gene mutante *flr³*.

Tabela 2- Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST) após tratamento com extrato etanólico obtido da raiz da *D. brasiliensis* (EDB) sem irradiação UVA.

Concentração mg/mL ⁻¹	Indiv. (N)	MSP (1-2 céls) ^b	MSG (>2 céls) ^b	MG	TM	Freq. de mutação por 10 ⁵ céls
ST		<i>m</i> = 2 ^a	<i>m</i> = 5 ^a	<i>m</i> = 5 ^a	<i>m</i> = 2 ^a	
C. N.	20	10 (0,25)	1 (0,03)	1 (0,03)	12 (0,30)	1,23
8-MOP (0,1)	20	12 (0,30) i	2 (0,05)i	1 (0,03) i	15 (0,38) i	1,54
8-MOP (0,2)	20	13(0,33) i	2 (0,05)i	0 (0,00) i	15 (0,38) i	1,54
8-MOP (0,4)	20	14 (0,35) i	3 (0,08)i	0 (0,00) i	17 (0,43) i	1,74
EDB (0,4)	20	13 (0,33) i	2 (0,05)i	0 (0,00) i	15 (0,38) i	1,54
EDB (0,8)	20	17 (0,43) i	1 (0,03)i	0 (0,00) i	18 (0,45) i	1,84
EDB (1,6)	20	24 (0,60)+	4 (0,10)i	1 (0,03) i	29 (0,73)+	2,97

MSP: Mancha simples pequena; **MSG:** Mancha simples grande; **MG:** Mancha gêmea; **TM:** Total de manchas.

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$;

^b Incluindo manchas simples *flr³* raras.

^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas;

^d Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM³*, já que o cromossomo balanceador *TM³* não contém o gene mutante *flr³*.

4.2 FREQUÊNCIAS DE MANCHAS MUTANTES OBTIDAS NOS DESCENDENTES HB SEM IRRADIAÇÃO UVA

Verifica-se que a frequência de mutações obtidas no controle negativo foi de 0,38, enquanto que os grupos tratados com extrato etanólico de *B. gaudichaudii* L. apresentaram frequências de mutações variando de 0,35 a 0,45 (Tabela 3) e com extrato etanólico de *D.brasiliensis* as frequências variaram de 0,35 a 0,70 (Tabela 4).

Observa-se que 90% das manchas mutantes, estão classificadas como simples pequena formada por até duas células. Entretanto, os indivíduos tratados com 8-metoxipsoraleno (8-MOP) apresentaram frequências de manchas mutantes que variaram de 0,25 a 0,65, distribuídas em todas as categorias de manchas. As frequências de mutações observadas nos indivíduos que foram tratados com três concentrações de 8-MOP não diferem significativamente das observadas nos grupos tratados com três concentrações do extrato etanólico de *B. gaudichaudii* L e de *D.brasiliensis*.

Tabela 3- Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* do cruzamento alta capacidade de bioativação (HB) após tratamento com extrato etanólico obtido da raiz da *B. gaudichaudii* L (EBG) sem irradiação UVA.

Concentração mg/mL ⁻¹	Indiv. (N)	MSP (1-2 céls) ^b	MSG (>2 céls) ^b	MG	TM	Freq. de mutação por 10 ⁵ céls
HB		<i>m</i> = 2 ^a	<i>m</i> = 5 ^a	<i>m</i> = 5 ^a	<i>m</i> = 2 ^a	
C. N.	20	12 (0,30)	2 (0,05)	1 (0,03)	15 (0,38)	1,54
8-MOP (0,1)	20	10 (0,25) -	0 (0,00)i	0 (0,00)i	10 (0,25) -	1,02
8-MOP (0,2)	20	15 (0,38) i	3 (0,08)i	1 (0,03)i	19 (0,48) i	1,95
8-MOP (0,4)	20	18 (0,45) i	4 (0,10)i	4 (0,10)i	26 (0,65) i	2,66
EBG (0,4)	20	12 (0,30) i	2 (0,05)i	0 (0,00)i	14 (0,35) -	1,43
EBG (0,8)	20	16 (0,40) i	0 (0,00)i	0 (0,00)i	16 (0,40) i	1,64
EBG (1,6)	20	15 (0,38) i	2 (0,05)i	1 (0,03)i	18 (0,45) i	1,84

MSP: Mancha simples pequena; **MSG:** Mancha simples grande; **MG:** Mancha gêmea; **TM:** Total de manchas.

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$;

^b Incluindo manchas simples *flr³* raras.

^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas;

^d Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM³*, já que o cromossomo balanceador *TM³* não contém o gene mutante *flr³*.

Tabela 4- Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* do cruzamento alta capacidade de bioativação (HB) após tratamento com extrato etanólico obtido da raiz da *D. brasiliensis* (EDB) sem irradiação UVA.

Concentração mg/mL ⁻¹	Indiv. (N)	MSP (1-2 céls) ^b	MSG (>2 céls) ^b	MG	TM	Freq. de mutação por 10 ⁵ céls
HB		<i>m</i> = 2 ^a	<i>m</i> = 5 ^a	<i>m</i> = 5 ^a	<i>m</i> = 2 ^a	
C. N.	20	12 (0,30)	2 (0,05)	1 (0,03)	15 (0,38)	1,54
8-MOP (0,1)	20	10 (0,25) -	0 (0,00)i	0 (0,00)i	10 (0,25) -	1,02
8-MOP (0,2)	20	15 (0,38) i	3 (0,08)i	1 (0,03)i	19 (0,48) i	1,95
8-MOP (0,4)	20	18 (0,45) i	4 (0,10)i	4 (0,10)i	26 (0,65) i	2,66
EDB (0,4)	20	14 (0,35) i	0 (0,00)i	0 (0,00)i	14 (0,35) -	1,43
EDB (0,8)	20	16 (0,40) i	1 (0,03)i	0 (0,00)i	17 (0,43) i	1,74
EDB (1,6)	20	28 (0,70)+	0 (0,00)i	0 (0,00)i	28 (0,70) i	2,87

MSP: Mancha simples pequena; **MSG:** Mancha simples grande; **MG:** Mancha gêmea; **TM:** Total de manchas.

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$;

^b Incluindo manchas simples *flr³* raras.

^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas;

^d Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM³*, já que o cromossomo balanceador *TM³* não contém o gene mutante *flr³*.

4.3 FREQUÊNCIAS DE MANCHAS MUTANTES OBTIDAS NOS DESCENDENTES ST COM IRRADIAÇÃO UVA

Verifica-se que a frequência de mutações obtidas no controle negativo foi de 0,35, enquanto que os grupos tratados com extrato etanólico de *B. gaudichaudii* L as frequências de mutações variaram de 1,00 a 1,40 (Tabela 5). Com o extrato de *D.brasiliensis* as frequências variaram de 0,90 a 4,98 (Tabela 6).

Observa-se que cerca de 80% das manchas mutantes estão classificadas como simples grande, formada por mais de duas células. Entretanto, os indivíduos tratados com 8-metoxipsoraleno (8-MOP) apresentaram uma frequência de manchas mutantes que variaram de 2,55 a 2,68, distribuídas em todas as categorias: mancha simples pequena, manchas simples grande e manchas gêmeas; no entanto, ocorre uma prevalência de manchas simples grandes. Os indivíduos que foram tratados com 8-MOP apresentam uma frequência de mutações cerca de 2 vezes maior do que a observada no tratamento com o extrato etanólico de *B. gaudichaudii* L., enquanto que os tratados com extrato etanólico de *D.brasiliensis* na maior concentração (1,6 mg/mL), apresentaram uma frequência de mutação 2 vezes maior do que a obtida com 8-MOP.

Tabela 5- Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST) após tratamento com extrato etanólico obtido da raiz da *B. gaudichaudii* L (EBG) com irradiação UVA.

Concentração mg/mL ⁻¹	Indiv. (N)	MSP (1-2 céls) ^b	MSG (>2 céls) ^b	MG	TM	Freq. de mutação por 10 ⁵ céls
ST		<i>m</i> = 2 ^a	<i>m</i> = 5 ^a	<i>m</i> = 5 ^a	<i>m</i> = 2 ^a	
C. N.	20	8 (0,20)	4 (0,10)	2 (0,05)	14 (0,35)	1,43
8-MOP (0,1)	20	6 (0,15)i	96 (2,40)+	4 (0,10)i	106 (2,65)+	10,86
8-MOP (0,2)	20	12 (0,30)i	85 (2,13)+	5 (0,13)i	102 (2,55)+	10,45
8-MOP (0,4)	20	26 (0,65)+	69 (1,73)+	12 (0,30)i	107 (2,68)+	10,96
EBG (0,4)	20	5 (0,13)-	33 (0,83)+	2 (0,05)i	40 (1,00)+	4,10
EBG (0,8)	20	8 (0,20)i	43 (1,08)+	4 (0,10)i	55 (1,38)+	5,64
EBG (1,6)	20	14 (0,35)i	39 (0,98)+	3 (0,08)i	56 (1,40)+	5,74

MSP: Mancha simples pequena; **MSG:** Mancha simples grande; **MG:** Mancha gêmea; **TM:** Total de manchas.

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$;

^b Incluindo manchas simples *flr³* raras.

^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas;

^d Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM³*, já que o cromossomo balanceador *TM³* não contém o gene mutante *flr³*.

Tabela 6- Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST) após tratamento com extrato etanólico obtido da raiz da *Dorstenia brasiliensis* (EDB) com irradiação UVA.

Concentração mg/mL ⁻¹	Indiv. (N)	MSP (1-2 céls) ^b	MSG (>2 céls) ^b	MG	TM	Freq. de mutação por 10 ⁵ céls
ST		<i>m</i> = 2 ^a	<i>m</i> = 5 ^a	<i>m</i> = 5 ^a	<i>m</i> = 2 ^a	
C. N.	20	8 (0,20)	4 (0,10)	2 (0,05)	14 (0,35)	1,43
8-MOP (0,1)	20	6 (0,15)i	96 (2,40)+	4 (0,10)i	106 (2,65)+	10,86
8-MOP (0,2)	20	12 (0,30)i	85 (2,13)+	5 (0,13)i	102 (2,55)+	10,45
8-MOP (0,4)	20	26 (0,65)+	69 (1,73)+	12 (0,30)i	107 (2,68)+	10,96
EDB (0,4)	20	9 (0,23)i	25 (0,63)+	2 (0,05)i	36 (0,90)+	3,69
EDB (0,8)	20	24 (0,60)+	37 (0,93)+	3 (0,08)i	64 (1,60)+	6,56
EDB (1,6)	20	105(2,63)+	33 (0,83)+	51 (1,28)+	199(4,98)+	20,39

MSP: Mancha simples pequena; **MSG:** Mancha simples grande; **MG:** Mancha gêmea; **TM:** Total de manchas.

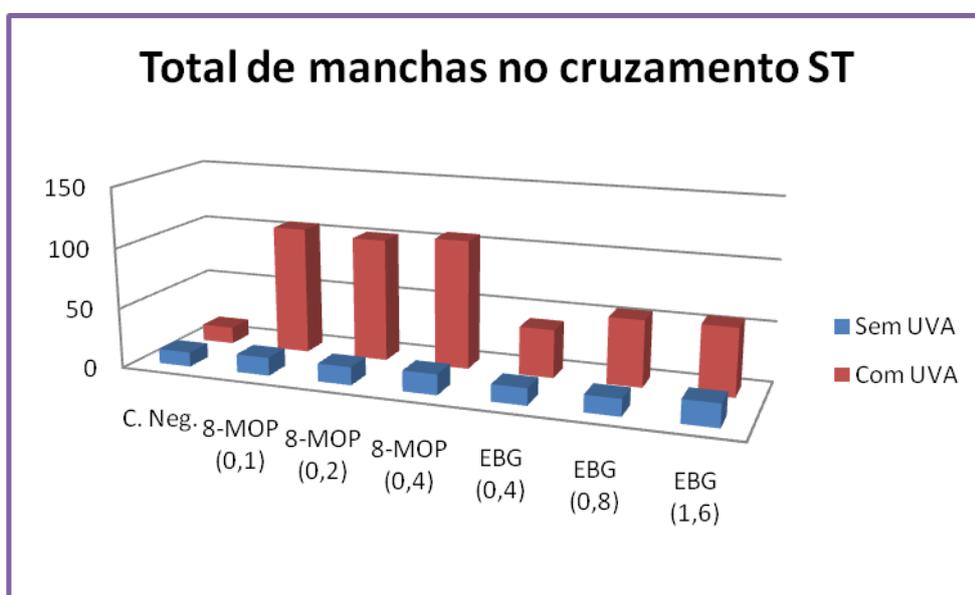
^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$;

^b Incluindo manchas simples *flr³* raras.

^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas;

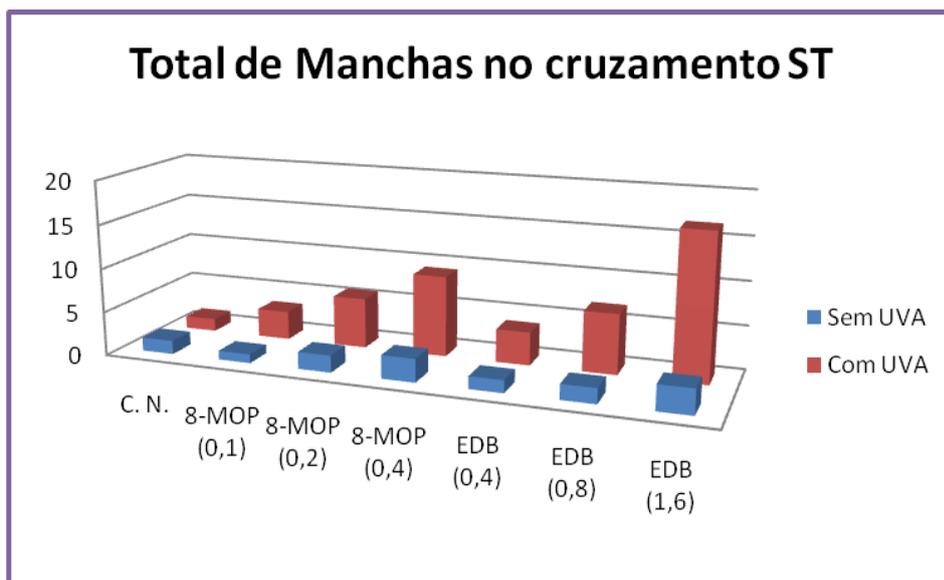
^d Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM³*, já que o cromossomo balanceador *TM³* não contém o gene mutante *flr³*.

No cruzamento ST, os valores das frequências de mutações, dos grupos tratados com os extratos sem irradiação, são similares ao valor obtido no controle negativo. Entretanto os grupos tratados com os extratos com irradiação UVA diferem significativamente do controle negativo. Os grupos tratados com 8-MOP associados à UVA apresentaram uma frequência de mutações 10 vezes maior do que a observada no grupo sem UVA. O 8-MOP e o extrato obtidos *B. gaudichaudii* L. e de *D. brasiliensis* nas três concentrações avaliadas apresentam efeito fotogenotóxico, quando comparados com os resultados obtidos no controle negativo (Gráficos 1 e 2).



C. Neg. – Controle negativo, 8MOP -8-metoxipsoraleno, EBG – Extrato etanólico *Brosimum gaudichaudii*

Gráfico 1- Número total de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) do cruzamento padrão (ST), após os tratamentos com 8-MOP, *B. gaudichaudii* (EBG) sem e com irradiação UVA.



C. Neg. – Controle negativo, 8MOP -8-metoxipsoraleno, EDB – Extrato etanólico *Dorstenia brasiliensis*

Gráfico 2- Número total de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) do cruzamento padrão (ST), após os tratamentos com 8-MOP, *D. brasiliensis* (EDB) sem e com irradiação UVA.

4.4 FREQUÊNCIAS DE MANCHAS MUTANTES OBTIDAS NOS DESCENDENTES HB COM IRRADIAÇÃO UVA

Verifica-se que a frequência de mutações obtidas no controle negativo foi de 0,35, enquanto que os grupos tratados com extrato etanólico de *B. gaudichaudii* L. apresentaram frequências de mutações variando de 1,38 a 3,48 (Tabela 7) e os grupos tratados com extrato etanólico de *D. Brasiliensis* as frequências de mutação variaram de 0,93 a 4,08 (Tabela 8).

Observa-se que mais de 50% das manchas mutantes estão classificadas como gêmeas. Entretanto, os indivíduos tratados com 8-metoxipsoraleno (8-MOP) apresentaram frequências de manchas mutantes que variaram de 0,80 a 2,25, distribuídas em todas as categorias: simples pequena, simples grande e gêmeas, com prevalência de manchas simples grandes.

No cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB), os valores das frequências de mutações, dos grupos tratados com os extratos sem irradiação, são similares ao valor obtido no controle negativo. Entretanto, as frequências de mutações, dos grupos tratados com o extrato com irradiação UVA, diferem significativamente do controle negativo, apresentando atividade fotogenotóxica (Gráficos 3 e 4).

Tabela 7- Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* do cruzamento alta capacidade de bioativação (HB) após tratamento com extrato etanólico obtido da raiz da *B. gaudichaudii* L (EBG) com irradiação UVA.

Concentração mg/mL ⁻¹	Indiv. (N)	MSP (1-2 céls) ^b	MSG (>2 céls) ^b	MG	TM	Freq. de mutação por 10 ⁵ céls
HB		<i>m</i> = 2 ^a	<i>m</i> = 5 ^a	<i>m</i> = 5 ^a	<i>m</i> = 2 ^a	
C. N.	20	13 (0,33)	1 (0,03)	0 (0,00)	14 (0,35)	1,43
8-MOP (0,1)	20	7 (0,18)-	24 (0,60)+	1 (0,03) i	32 (0,80) +	3,28
8-MOP (0,2)	20	14 (0,35)i	42 (1,05)+	0 (0,00) i	56 (1,40) +	5,74
8-MOP (0,4)	20	23 (0,58)i	66 (1,65)+	1 (0,03) i	90 (2,25) +	9,22
EBG (0,4)	20	6 (0,15)-	20 (0,50)+	29 (0,73)+	55 (1,38) +	5,64
EBG (0,8)	20	9 (0,23)-	41 (1,03)+	70 (1,75)+	120 (3,00) +	12,30
EBG (1,6)	20	15 (0,38)i	49 (1,23)+	75 (1,88)+	139 (3,48) +	14,24

MSP: Mancha simples pequena; **MSG:** Mancha simples grande; **MG:** Mancha gêmea; **TM:** Total de manchas.

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$;

^b Incluindo manchas simples *flr³* raras.

^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas;

^d Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM³*, já que o cromossomo balanceador *TM³* não contém o gene mutante *flr³*.

Tabela 8- Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* do cruzamento alta capacidade de bioativação (HB) após tratamento com extrato etanólico obtido da raiz da *D. brasiliensis* (EDB) com irradiação UVA.

Concentração mg/mL ⁻¹	Indiv. (N)	MSP (1-2 céls) ^b	MSG (>2 céls) ^b	MG	TM	Freq. de mutação por 10 ⁵ céls
HB		<i>m</i> = 2 ^a	<i>m</i> = 5 ^a	<i>m</i> = 5 ^a	<i>m</i> = 2 ^a	
C. N.	20	13 (0,33)	1 (0,03)	0 (0,00)	14 (0,35)	1,43
8-MOP (0,1)	20	7 (0,18)-	24 (0,60)+	1 (0,03) i	32 (0,80) +	3,28
8-MOP (0,2)	20	14 (0,35)i	42 (1,05)+	0 (0,00) i	56 (1,40) +	5,74
8-MOP (0,4)	20	23 (0,58)i	66 (1,65)+	1 (0,03) i	90 (2,25) +	9,22
EDB (0,4)	20	21 (0,53)i	9 (0,23)+	7 (0,18)+	37 (0,93) +	3,79
EDB (0,8)	20	42 (1,05)+	16 (0,40)+	9 (0,23)+	67 (1,68) +	6,86
EDB (1,6)	20	93 (2,33)+	33 (0,83)+	37 (0,93)+	163 (4,08) +	16,70

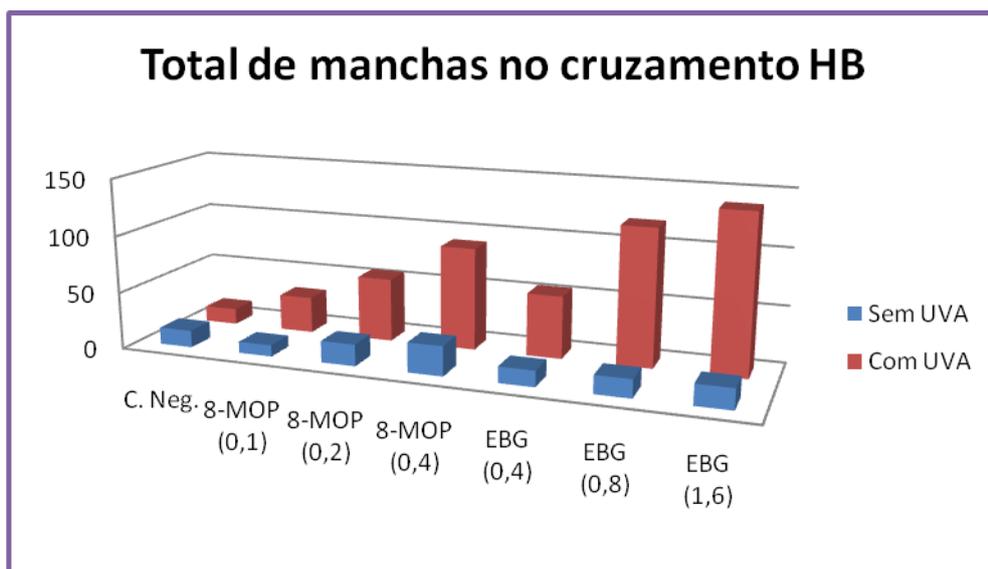
MSP: Mancha simples pequena; **MSG:** Mancha simples grande; **MG:** Mancha gêmea; **TM:** Total de manchas.

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$;

^b Incluindo manchas simples *flr³* raras.

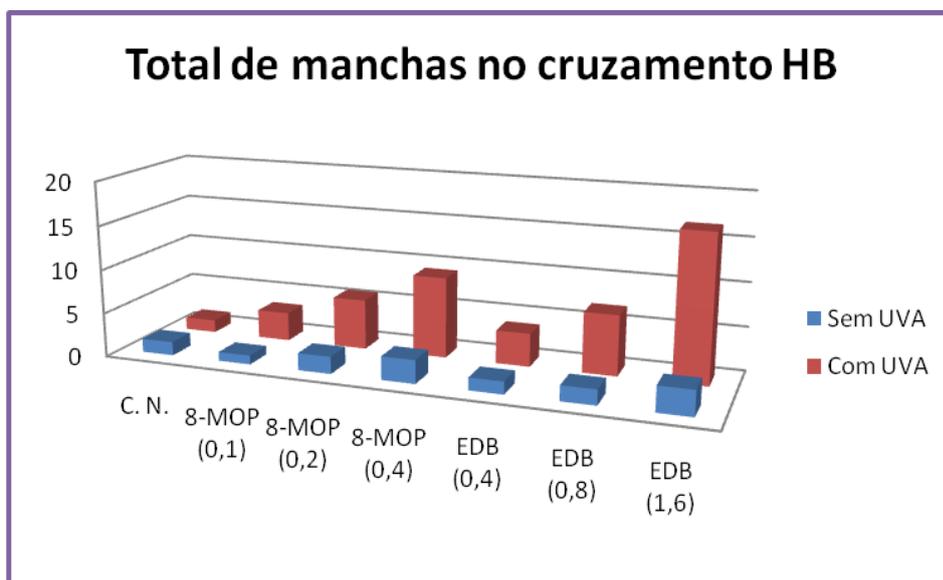
^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas;

^d Apenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM³*, já que o cromossomo balanceador *TM³* não contém o gene mutante *flr³*.



C. Neg. – Controle negativo, 8MOP -8-metoxipsoraleno, EBG – Extrato etanólico *Brosimum gaudichaudii*

Gráfico 3- Número total de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), após os tratamentos com 8-MOP, *B. gaudichaudii* (EBG) sem e com irradiação UVA.



C. Neg. – Controle negativo, 8MOP -8-metoxipsoraleno, EDB – Extrato etanólico *Dorstenia brasiliensis*

Gráfico 4- Número total de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), após os tratamentos com 8-MOP, *D. brasiliensis* (EDB) sem e com irradiação UVA.

5. DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho que avalia a atividade genotóxica e fotogenotóxica do 8-metoxipsoraleno (8-MOP) e dos extratos etanólicos de *B. gaudichaudii* (EBG) e *D. brasiliensis* (EDB) os quais contém furanocumarinas como bergapteone e psoraleno.

Os resultados obtidos com EBG e EDB, sem irradiação (Tabelas 1 e 2), indicam que nas condições experimentais descritas, não exercem atividade genotóxica, pois as frequências de mutações observadas, nos grupos tratados, não diferem significativamente quando comparadas com o controle negativo.

A linhagem de alta bioativação (HB) possui altos níveis da enzima citocromo oxidase, que detecta compostos ou metabólitos que depois de metabolizados se tornam mais tóxicos ou genotóxicos. O ensaio sem UVA (tabelas 3 e 4) com a linhagem HB, sugere que a metabolização dos compostos não aumentou a genotoxicidade das amostras-teste em relação à linhagem padrão.

Os resultados obtidos na presente pesquisa, estão de acordo com os encontrados por Cunha et al (2008), os quais trataram camundongos albinos, por via oral e intra peritoneal, com exsudado da raiz *B. gaudichaudii*, para avaliar a toxicidade desta planta. Os resultados obtidos indicam baixa toxicidade.

Comparando-se os resultados obtidos no controle negativo nos cruzamentos ST e HB sem irradiação (Tabelas 1 e 2) com o controle negativo submetido a irradiação UVA (Tabelas 5 e 6), verifica-se que não houve diferenças entre os grupos tratados. Os dados da literatura indicam que a radiação ultravioleta (UVA) pode ser absorvida por diferentes moléculas celulares, incluindo o DNA, no qual provoca distorções estruturais. As lesões mais comuns induzidas pela radiação UVA são o ciclobutano de pirimidina e o fotoproduto (6-4)-pirimidina-pirimidona (EKER et al., 2009). Estas lesões podem ser reparadas pelas enzimas fotoliasas presentes em *Drosophila* (KIM et al., 1996) deste modo não verificou-se diferença entre os controles negativos (com e sem UVA).

As concentrações avaliadas de 8-MOP, e dos EBG e EDB nos descendentes dos cruzamentos ST e HB (gráficos 1 e 2) indicam que não são genotóxicos, mas após a radiação UVA tornam-se fotogenotóxicos. Os resultados obtidos são devido à ativação das furanocumarina com a irradiação UVA. Os dados encontrados estão de acordo com a literatura, pois a furanocumarina 8-metoxipsoraleno (8-MOP) associado à luz UVA é um gerador de cross-linking no DNA, ocasionando quebras de fitas, ou não disjunção, efeitos mutagênicos e citotóxicos fotoinduzidos (QUEVEDO, 2011).

Verifica-se que a fotogenotoxicidade induzida pelo 8-MOP, bem como pelos extratos é dose resposta. Segundo Bethea et al. (1999), os danos causados no DNA pelo 8-MOP, em doses subletais, pela radiação UVA, podem induzir reparos no DNA.

Todas as concentrações dos EBG e EDB após a irradiação com UVA apresentaram uma alta frequência de manchas mutantes, distribuídas em todas as categorias, estes dados indicam que os extratos geraram, além da quebra do DNA, recombinação (que é expressa pelas manchas gêmeas). Os resultados encontrados podem ser atribuídos a composição química dos extratos que apresentam além das furanocumarinas, piranocumarinas, cumarinas, esteróides, triterpenos, entre outros (QUEVEDO, 2011).

Os resultados da presente pesquisa corroboram com os obtidos por Varanda et al (2002), com o teste de AMES, com a linhagem TA 100 de *Salmonella typhimurium*, tratada com extrato metanólico de *B. gaudichaudii*, indicaram que este extrato induziu um aumento significativo de mutações, o estudo fitoquímico revelou que as furanocumarinas (psoraleno e o bergapteno) são os componentes majoritários do extrato metanólico.

Furanocumarinas são uma classe de componentes naturais presentes em muitos tipos de plantas usadas como alimentos, chás, em medicamentos fitoterápicos ou cosméticos (MESSER et al, 2012). A exposição à furanocumarinas é de interesse especial toxicológico devido às suas propriedades fototóxicas e fotomutagênicas que têm sido bem descrito em vários modelos *in vitro* e *in vivo* (SKLM, 2010 apud MESSER et al, 2012).

As furanocumarinas exibem estruturas tricíclicas planares, hidrofóbicas com dois sítios fotorreativos (3,4-pirona e 4',5'-dupla ligação furano), o que possibilita se intercalar com as bases do DNA (BETHEA et al., 1999), no caso, as bases pirimídicas do DNA (DIAWARA; TRUMBLE, 1997). Interação com o DNA no tratamento com UVA, formando fotoprodutos (LEVEQUE et al., 2002) que dependendo da dose, podem interferir na replicação, síntese e reparo do DNA, levando à morte da célula (ZARABSKA et al., 2000; TEREGUN et al., 1999) ou a inibição da síntese de DNA. Acredita-se que a inibição da síntese de DNA pode explicar o efeito benéfico do PUVA nas desordens proliferativas como psoríase (LEVEQUE et al., 2002).

Apesar de o tratamento PUVA ter importante atividade terapêutica, os pacientes estão sujeitos a indesejáveis efeitos colaterais, tanto em curto prazo (eritema, hiperpigmentação, genotoxicidade) como em longo prazo (catarata, risco de câncer de pele) (CHIMICHI et al., 2002). O aumento no uso destas substâncias na medicina tem sido ligado à alta incidência de câncer de pele e outras desordens, assim como trocas entre cromátides irmãs, mutação gênica e aberrações cromossômicas em humanos (DIAWARA; TRUMBLE,

1997). Mesmo após a interrupção do tratamento não há significativo decréscimo do risco de desenvolvimento de câncer de pele (NIJSTEN; STERN, 2003).

6. CONCLUSÕES

Foi demonstrado por meio do ensaio SMART que os extratos obtidos de *B. gaudichaudii* e de *D. Brasiliensis*, e o 8-metoxipsoraleno (8-MOP) apresentam atividade fotogenotóxica induzida pela luz ultravioleta A (UVA). Estes resultados indicam que os extratos obtidos destas plantas induzem quebras de fita do DNA, a utilização destes extratos associados a luz UVA podem contribuir para o desenvolvimento de câncer de pele.

REFERÊNCIAS

- BAUER, L.; NOLL, I. B. Furanocumarinas de *Dorstenia brasiliensis* LAM. **Caderno de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 163 - 170, 1986.
- BENFORD, D. J.; HANLEY, B. A.; BOTTRILL, K.; OEHLISCHLAGER, S.; BALLS, M.; BRANCA, F.; CASTENGNARO, J. J.; DESCOTES, J.; HEMMINIKI, K.; LINDSAY, D.; SCHITTER, B. Biomarkers as predictive tools in toxicity testing. **Alternative to Laboratory Animals**. v. 28, p. 119 - 131, 2000.
- BETHEA, D.; FULLMER, B.; SYED, S.; SELTZER, G.; TIANO, J.; RISCHKO, C. Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. **Journal of Dermatological Science**. v. 19, p. 78 - 88, 1999.
- CHIMICHI, S. et al. A convenient synthesis of psoralens. **Tetrahedron**. v. 58, p. 4859 - 4863, 2002.
- CUNHA, L. C.; PAULA, J. R.; SÁ, V. A.; AMORIM, M. E. P.; BARROS, I. C. M.; BRITO, N. S. Acute toxicity of *Brosimum gaudichaudii* Trécul. root extract in mice: determination of both approximate and median lethal doses, **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 18, n. 4, p. 532 - 538, 2008.
- DIAWARA, M. M.; TRUMBLE, J. T. Effects of linear furanocoumarins on the herbivore *Spodoptera exigua* and the parasitoid *Archytas marmoratus*: host quality and parasitoid success. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 819 - 824, 1997.
- EKER, A. P.; QUAYLE, C.; CHAVES, I.; VAN DER HORST, G. T. DNA repair in mammalian cells: Direct DNA damage reversal: elegant solutions for nasty problems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 6, p. 968 - 980, 2009.

FESTING, M. F. W.; BAUMANS, V.; COMBES, D. R.; HADLER, M.; HENDRIKSEN, F. M.; HOWARDS, B. R.; LOVELL, D. P.; MOORE, G. J.; OVEREND, P.; WILSON, M. S. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions. **Alternative to Laboratory Animals**. v. 26, p. 283 - 301, 1998.

FRANCISCO, C. S.; RODRIGUES, L. R.; CERQUEIRA, N. M .F. S. A.; OLIVEIRA-CAMPOS, A. M. F.; RODRIGUES, L. M. Synthesis of novel benzofurocoumarin analogues and their anti-proliferative effect on human cancer cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 47, p. 370 - 376, 2012.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result, **Mutation Research**, v. 203, p. 297 - 308, 1988.

GRAF, U.; ABRAHAM, S. K.; GUZMAN-RINCON, J.; WÜRGLER, F. E. Antigenotoxicity studies in *Drosophila Melanogaster*. **Mutation Research**, v. 402, p. 203 - 209, 1998.

GRAF, U.; VAN SCHAİK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 271, p. 59 - 67, 1996.

GRAF, U.; WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Mutagenesis**, v. 6, p. 153 - 188, 1984.

JACOMASSI, E.; MOSCHETA, I. S.; MACHADO, S. R. Morfoanatomia histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (moreacea). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 3, p. 575 - 597, 2006.

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

KIM, S. T.; MALHOTRA, K.; RYO, H.; SANCAR, A.; TODO, T. Purification and characterization of *Drosophila melanogaster* photolyases. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 363, n. 2, p. 97 - 104, 1996.

LAMAR, A. S.; FUENTES, J. L.; FONSECA, G.; CÁPIRO, N.; FERRER, M.; ALONZO, A.; BALUJA, L.; COZZI, R.; SALVIA, R.; FIORE, M.; LLAGOSTERA, M. Assessment of the potential genotoxic risk of *Phyllanthus orbicularis* HBK aqueous extract using in vitro and in vivo assays. **Toxicology Letters**, v. 136, p. 87 - 96, 2002.

LEÃO, A. R.; CUNHA, L. C.; PARENTE, L. M. L.; CASTRO, L. C. M.; CHAUL, A.; CARVALHO, H. E.; RODRIGUES, V. B.; BASTOS, M. A. Avaliação clínica toxicológica preliminar do Viticron® em pacientes com vitiligo. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 1, p. 15 - 23, 2005.

LEVEQUE, N. et al. Validation of a microdialysis-gas chromatographic-mass spectrometric method to assess 8-methoxypsoralen in psoriatic patient dermis. **J Chromatogr B**. v. 780, p. 119 - 127, 2002.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 40 - 44, 2004.

MESSER, A.; RAQUET, N.; LOHR, C.; SCHRENK, D. Major furocoumarins in grapefruit juice II: Phototoxicity, photogenotoxicity, and inhibitory potency vs. cytochrome P450 3A4 activity. **Food and Chemical Toxicology**. v. 50, p. 756 – 760, 2012.

MONTEIRO, V. D. F.; MATHIAS, L.; VIEIRA, I. J. C.; SCHIPSEMA, J.; BRAZ, R. Prenylated coumarins, chalcone and new cinnamic acid and dihydrocinnamic acid derivatives, **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 13, n. 2, p. 281 - 287, 2002.

MUKHOPADHYA, Y. I.; SAXENA, D. K.; KAR CHOWDHURI, D. Hazardous effects of effluent from the chrome plating industry: 70 kda heat shock protein expression as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila Melanogaster* (Hsp 70-Lacz). **Environmental health perspectives**. v. 111, p. 1926 - 1932, 2003.

NIJSTEN, T.; E.; C.; STERN, R.; S. The increased risk of Skin Cancer Is Persistent After Discontinuation of Psoralen+Ultraviolet A: A Cohort Study. **J Invest Dermatol**. v. 121, n. 2, p. 252 - 258, 2003.

PLANTA MED. *Dorstenia brasiliensis* Lam. 2012. Disponível em: <http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Dorstenia_brasiliensis.htm>. (último acesso em 29 de março 2012).

QUEVEDO, A.; E.; P. Tese de Doutorado "Atividade Melanogênica, Genotóxica e Antiproliferativa de Extratos de *Brosimum Gaudichaudii* e *Dorstenia Brasiliensis* Induzida por Radiação UVA. Tese apresentada ao Programa de Pós--graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Doutor. p. 101, 2011.

SEPEL, L. M. N.; LORETO, E. L. S. 2010: Um Século de *Drosophila* na Genética. **Genética na escola**. v. 05, n. 02, p. 42 – 47, 2010.

TATAGIBA, F. Mama-cadela, **Plantas do cerrado 2009**. Disponível em: <<http://www.biologo.com.br/plantas/.../mama-cadela>>. (último acesso em 21 de fev. 2011).

TÉLLEZ, M. G. O.; RODRÍGUEZ, H. B.; OLIVARES, G. Q.; SORTIBRÁN, A. N. C.; CETTO, A. A.; ARNAIZ, R. R. A phytotherapeutic extract of *Equisetum myriochaetum* is not genotoxic either in the *in vivo* wing somatic test of *Drosophila* or in the *in vitro* human micronucleus test, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 182 – 189, 2007.

TEREGUN, M.; OZTURK, S.; SELMAN-PAKOGLU, N. An unusual cause of burn injury: unsupervised use of drugs that contain psoralens. **J Burn Care Rehabil**. v. 20, p. 2 - 5, 1999.

THE FAMILIES OF FLOWERING PLANTS: **descriptions, illustrations, identification, information retrieval**. Disponível em: <http://delta-intkey.com>. (último acesso em 21 de fev. 2011).

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

VARANDA, E. A.; POZETTI, G. L.; LOURENÇO, M. V.; VILEGAS, W.; RADDI, M. S. G. Genotoxicity of *Brosimum Gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 257 - 264, 2002.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, information retrieval**, 2004. Disponível em: < <http://delta-intkey.com>>. Acesso em: 21 de fev. 2011.

ZARABSKA, Z. et al. PUVA (psoralen+UVA) photochemotherapy: processes triggered in the cells. **II Farmaco**. v. 55, p. 515 - 520, 2000.