

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

TIAGO FELIPE DE SENES LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA E
RECOMBINOGÊNICA DE EXTRATOS OBTIDOS DE RAÍZES
DE *Macrosiphonia petraea* (A. SAINT-HILAIRE) K. SCHUM
(APOCYNACEAE) EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila
melanogaster***

Mundo Novo – MS

Novembro – 2012

TIAGO FELIPE DE SENES LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA E
RECOMBINOGÊNICA DE EXTRATOS OBTIDOS DE RAÍZES
DE *Macrosiphonia petraea* (A. SAINT-HILAIRE) K. SCHUM
(APOCYNACEAE) EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila
melanogaster***

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

Novembro – 2012

TIAGO FELIPE DE SENES LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA E
RECOMBINOGÊNICA DE EXTRATOS OBTIDOS DE RAÍZES
DE *Macrosiphonia petraea* (A. SAINT-HILAIRE) K. SCHUM
(APOCYNACEAE) EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila
melanogaster***

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 21 de Novembro de 2012

Prof^ª Dr^ª Zaira da Rosa Guterres - Orientadora (UEMS) _____
Prof^ª Dr^ª Ana Francisca Gomes da Silva (UEMS) _____
Prof^ª MSc. Cássia Fernanda Yano (UEMS) _____

Dedico este trabalho a minha mãe Ana Lúcia de Senes, por me dar a possibilidade de sonhar coisas impossíveis e de caminhar livremente em direção aos meus sonhos e porque esteve pronta em todos os momentos, a compartilhar os desafios e alegrias da minha existência.

RESUMO

A população utiliza *Macrosiphonia petraea* para fins medicinais, empregada nas formas de chá e infuso, indicada como depurativa, anti-sifilítica, anti-reumática, anti-ulcerogênica, antinociceptiva e principalmente como anti-inflamatória, sendo um dos usos mais comuns no Estado de Mato Grosso do Sul. Diante da ampla utilização desta planta para o tratamento de várias doenças e a falta de informações sobre seu potencial genotóxico, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade genotóxica e recombinogênica dos extratos: aquoso (EAq), etanólico (EEtOH), hidrometanólico (EHM), extrato hexânico (EHex) e fase acetato de etila (FAcOEt), obtidos de raízes de *M. petraea* por meio de células somáticas de *Drosophila melanogaster* (SMART - *Somatic Mutation And Recombination Test*). Para tanto foram utilizados dois cruzamentos com o objetivo de identificar a possibilidade da bioativação do composto, são eles: [1] o cruzamento padrão (ST), fêmeas virgens da linhagem *flr³/TM3, bd^s* cruzadas com machos *mwh*. [2] para o cruzamento de alta bioativação (HB), fêmeas virgens da linhagem *ORR/ORR; flr³/TM3, Bd^s* cruzadas com machos *mwh*. Para tanto, foram utilizadas larvas de 72 horas provenientes dos cruzamentos ST e HB, tratadas com diferentes concentrações de EAq, EEtOH, EHM, EHex e FAcOEt. Como controle negativo utilizou-se o solvente (1% de Tween-80, Etanol a 3% e água) e como positivo o cloridrato de doxorubicina - DXR (0,125 mg/mL). Os resultados observados nos descendentes dos cruzamentos ST e HB, indicaram que houve um aumento estatisticamente significativo na frequência de todas as categorias de manchas mutantes no EAq, EEtOH, EHM quando comparado com o controle negativo. No entanto, indivíduos tratados com FAE obteve 100% de mortes. Estes dados sugerem que nas condições experimentais descritas, o EAq e EEtOH apresentaram atividade genotóxica e citotóxica nas maiores concentrações, EHex foi potencialmente genotóxico, e o FAcOEt foi citotóxico, indicando a natureza prejudicial de seus extratos antes e após metabolização.

Palavras-chave: Velame branco. Recombinação. Alcaloide. Medicina popular. SMART.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo Geral	2
2.2. Objetivos Específicos	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS	3
3.1. Coleta e identificação	3
3.2. Preparação dos extratos	3
3.3. Agente Químico	3
3.4. Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART - <i>Somatic Mutation And Recombination Test</i>)	4
3.4.1. Cruzamentos realizados	4
3.4.2. Manutenção do meio	4
3.4.3. Obtenção e Coleta de larvas	5
3.4.4. Tratamentos	5
3.4.5. Montagem e Análise das Lâminas	5
3.4.6. Detecção da genotoxicidade	6
4. RESULTADOS	6
5. DISCUSSÃO	11
6. CONCLUSÃO	14
REFERÊNCIAS	14
ANEXOS	21

1. INTRODUÇÃO

A família Apocynaceae descrita por Antoine Laurent de Jussieu (1774), pertence à ordem Gentianales e inclui um total de 550 gêneros com cerca de 5100 espécies tropicais e subtropicais, algumas tem poucos registros de coletas em regiões temperadas (RAPINI, 2000). No Brasil ocorrem mais de 850 espécies distribuídas em 90 gêneros, representadas por plantas de hábitos variados.

As espécies dessa família apresentam, na sua maioria, látex branco e abundante, em alguns espécimes esta característica é visível apenas nos ramos terminais (SOUZA; LORENZI, 2005).

A família Apocynaceae pode ser considerada uma das mais importantes fontes vegetais de constituintes químicos com utilidade terapêutica na medicina moderna como terpenoides, flavonoides e principalmente alcaloides. Alcaloides isolados do gênero *Rauwolfia* (resepina, ajmalicina, ajmalina, ajmalinina, serpentina e serpentinina) são utilizados em casos de hipertensão e arritmias cardíacas, e do gênero *Strophantus* os glicosídeos cardiotônicos (ouabaína, estrofantindina e cimarina) (DI-STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

Além de apresentar inúmeras propriedades medicinais, a família Apocynaceae também se destaca quanto a sua importância econômica, como por exemplo, as espécies do gênero *Aspidosperma* (*A. polyneuron*; *A. pyriformium*), fornecedoras de madeiras de excelente qualidade usada em construções, fabricação de móveis e ferramentas (RIBAS; SOUZA; LORENZI, 2005), outras espécies apresentam potencial paisagístico pela beleza de suas flores ou pela forma do tronco e da copa.

Dentre as espécies cultivadas no Brasil, destaca-se *Allamanda cathartica*, *Nerium oleander*, *Plumeria rubra* e *Thevetia peruviana* (HOPKINS et al., 1999; SOUZA; LORENZI, 2005). Frutos comestíveis estão presentes nos gêneros: *Ambelania*, *Couma*, *Hancornia* e *Rhigospira*, como o látex da sorva (*Couma utilis*) que foi utilizado para a produção da goma de mascar. Populações africanas, e indígenas da América do Sul utilizam toxinas de algumas espécies para envenenar flechas para caça e pesca (METCALFE; CHALK, 1950; RODRIGUES, 2001).

A espécie *Macrosiphonia petraea* (A. Saint-Hilaire) K. Schum alvo deste estudo ocorre em boa parte do Brasil, sendo encontrada no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul, é popularmente

conhecida pelos nomes de Losna do campo, Guaranítica, Boleadinha, Barbasco, Jalapa, Jalapa-branca e Velame-branco de acordo com a região em que se desenvolve (WOODSON, 1938).

A população utiliza *M. petraea* para fins medicinais, empregada nas formas de chá e infuso, indicada como depurativa, anti-sifilítica, anti-reumática, anti-ulcerogênica, antinociceptiva e principalmente como anti-inflamatória, sendo um dos usos mais comuns no Estado de Mato Grosso do Sul (RATES, 2001).

Os dados da literatura indicam a relação da composição química dos extratos de plantas da família Apocynaceae, com a atividade citotóxica e genotóxica, especialmente os alcaloides isolados desta família. Em análise fitoquímica qualitativa de raízes de *Macrosiphonia velame* verificou-se a presença de alcaloides, flavonoides e taninos (VIOLANTE *et al.*, 2009). Entretanto, Assis (2012) não encontrou alcaloides nesta planta, novos estudos fitoquímicos estão em andamento para verificar a presença destes metabólitos.

Poucos dados referente à toxicidade acerca dessa planta são encontrados na literatura, o que reforça a necessidade de estudos quanto às suas possíveis atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, justificando o presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Diante da importância da descoberta de novas substâncias com atividades biológicas, este trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos: genotóxico e recombinogênico dos extratos aquoso, etanólico, hidro-metanólico, hexânico e fase acetato de etila obtidos das raízes de *Macrosiphonia petraea* (velame-branco).

2.2. Objetivos Específicos

✓ Relacionar a concentração utilizada do extrato aquoso, etanólico, hidrometanólico, hexânico e fase acetato de etila com os efeitos genotóxicos.

✓ Evidenciar o potencial genotóxico e recombinogênico dos extratos com o aumento e/ou diminuição da frequência de manchas mutantes observadas no teste SMART.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta e identificação

As raízes de *Macrosiphonia petraea* (A. Saint-Hilaire) K. Schum foram coletadas nos arredores da cidade de Campo Grande (Mato Grosso do Sul - Brasil), no ano de 2009. O material vegetal foi identificado pela pesquisadora MSc. Ubirazilda Maria de Resende sendo a exsicata nº 23771 incorporada ao Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

3.2. Preparação dos extratos

O extrato aquoso (EAq) foi preparado de acordo com o uso popular, 100 mL de água filtrada adicionada a 2g de pó obtido das raízes de *M. petraea*, após fervura de 10 minutos o extrato foi filtrado e determinado o volume final, foram feitas as diluições utilizadas no SMART.

Os extratos etanólico (EEtOH), hidrometanólico (EHM), hexânico (EHex) e fase acetato de etila (FAcOEt) foram preparados e fornecidos por Luiz Roberto de Assis Junior, Mestrando em Química Orgânica (Ênfase em Produtos Naturais), no Laboratório de Pesquisa 1 (LP1) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande-MS, Brasil. Para ser utilizado no ensaio SMART, os extratos foram diluídos em 1% de Tween-80, 3% de etanol e água Milli-Q.

3.3. Agente Químico

O cloridrato de doxorrubicina (DXR) (Biorrub® - Biosintética Ltda., cidade de São Paulo, estado de São Paulo, Brasil – CAS Nº 23214-92-8), é um antibiótico antineoplásico antraciclínico isolado de culturas do fungo *Streptomyces peucetius var. caesius* (CHABNER *et al.*, 1996).

O DXR foi utilizado neste ensaio como indutor de mutações (controle positivo). As antraciclinas podem intercalar-se no DNA, afetando muitas de suas funções, incluindo sua síntese e a do RNA. Por conseguinte, as antraciclinas são mutagênicas e carcinogênicas (CHABNER *et al.*, 1996; RANG *et al.*, 2007).

3.4. Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (*Somatic Mutation And Recombination Test – SMART*) em células somáticas de asas de *Drosophila melanogaster*

Graf e colaboradores (1984) desenvolveram o teste SMART em células somáticas de *D. melanogaster*, fundamentado em marcadores genéticos para a forma e o tipo de tricomas (pelos) que revestem as asas destas moscas. A *Drosophila* é uma espécie modelo utilizada em um grande número de pesquisas como em experimentos de genotoxicidade (GRAF et al., 1984, GRAF; VAN SCHAİK, 1992) e ensaios toxicológicos (KAR et al., 2001; NAZIR et al., 2003). É um organismo eucariótico extensivamente estudado e que permite a obtenção de resultados confiáveis, os quais podem ser extrapolados para vertebrados.

O sequenciamento do genoma da *D. melanogaster* revelou uma alta conservação evolutiva quando comparado ao genoma humano, apresentando alta homologia para genes controladores do sistema de reparo do DNA (RUBIN et al., 2000) bem como para outras doenças (KAZANTSEV et al., 2002; BIER, 2005).

3.4.1. Cruzamentos realizados

Para a obtenção dos descendentes necessários ao teste foram realizados dois diferentes cruzamentos: o cruzamento padrão (ST - Standard Cross) utilizando fêmeas virgens *flr³/TM3* cruzadas com machos *mwh/mwh* (Graf et al., 1989) e o cruzamento de alta bioativação (HB - High Bioactivation) cruzando fêmeas virgens *ORR* com machos *mwh/mwh* (GRAF; VAN SCHAİK, 1992).

Destes cruzamentos nascem dois tipos de descendentes, os trans heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Esses descendentes são distintos fenotipicamente, baseados no marcador *TM3/Bds*. O fenótipo dos descendentes MH desenvolve asa normal, com borda lisa, enquanto que os descendentes BH apresentam asas mal formadas, com aparência picotada ou serrilhada, denominadas “*serrate*”.

Os descendentes MH podem expressar pelos mutantes nas asas originados de alterações mutagênicas e recombinogênicas ocorridas entre os locos gênicos *mwh* e *flr³* e entre o *flr³* e o centrômero. Já os descendentes BH possuem o cromossomo balanceador *TM3/Bds* que inviabiliza a formação de eventos de recombinação (GUZMÁN-RINCON; GRAF, 1995).

3.4.2. Manutenção do meio

Os estoques das moscas foram mantidos em frascos de 250 mL contendo meio de cultura de *D. melanogaster*, preparados com 820 mL de água, 25 g de *Saccharomyces cerevisiae* Meyen (levedura formulada comercialmente como Fermento Biológico Fleischmann), 11 g de base para meio de cultura (Ágar Ágar, Tipo I), 156 g de *Musa ssp.* (banana), 1 g de Metilparabeno I (comercialmente Nipagin), este meio foi fervido e distribuído de maneira uniforme nos frascos, os quais foram mantidos em estufa de fotoperíodo, com temperatura de 22° C e umidade relativa do ar em torno de 65%.

3.4.3. Obtenção e Coleta de larvas

Foram selecionadas aproximadamente 400 fêmeas virgens das linhagens *flr³* e *ORR*, as quais foram cruzadas com a 200 machos da linhagem *mwh*, por um período de 48 horas, posteriormente os casais foram transferidos para frascos contendo uma base sólida de ágar-ágar coberta por uma camada de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*) suplementado com açúcar por um período de 8 horas para coleta de ovos. Após 72 ± 4 horas, as larvas de 3° estágio de desenvolvimento, foram lavadas com água corrente, coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina, posteriormente submetidas aos tratamentos.

3.4.4. Tratamentos

Grupos de aproximadamente 100 larvas foram transferidos para tubos de vidro contendo 1,5 g de meio de cultura alternativa (purê de batata instantâneo Yoki® Alimentos) e 5,0 mL do EAq nas concentrações de (1,25; 2,5 e 5 mg/mL); e 5,0 mL de EEtOH, EHM, EHex e FAcOEt nas concentrações (0,25; 0,5 e 1 mg/mL), como controle negativo foi utilizado o solvente, preparado com 1% de Tween-80, 3% de etanol e água Milli-Q, como controle positivo o DXR na concentração de 0,125 mg/mL. Após se alimentarem do meio e completarem a metamorfose, os adultos emergentes foram coletados e preservados em etanol 70%.

3.4.5. Montagem e Análise das Lâminas

As asas foram destacadas do corpo e colocadas aos pares sobre lâminas e fixadas com solução de Faure, onde prosseguiram para análise microscópica. A análise das manchas mutantes foi feita em microscópio óptico de luz com aumento de 400X onde se observou células de todas 7 regiões (A, B, C', C, D, D' e E) de cada asa, classificando-as em manchas simples, quando expressam apenas um dos marcadores (*mwh* ou *flr³*), ou manchas gêmeas, no caso de expressão com dois marcadores (*mwh* e *flr³*) na mesma mancha (GRAF et al., 1984). Quanto ao tamanho, as manchas foram classificadas em pequenas, uma vez que apresentam 1 ou 2 pelos mutantes e grandes quando expressavam mais de 2 pelos mutantes.

3.4.6. Detecção da genotoxicidade

Após a análise das asas, os dados foram analisados estatisticamente seguindo a metodologia descrita por Frei e Würzler (1988), onde se utiliza o teste do X^2 para proporções com nível de significância 5%, baseando-se na hipótese de que na série tratada, a frequência de manchas não pode ser maior do que a frequência de mutação do controle apropriado e que a frequência de mutação induzida na série tratada não pode ser menor do que a maior frequência de mutação espontânea observada no controle.

Com base na frequência de indução de manchas induzidas, a atividade recombinogênica foi calculada como: frequência de mutação (F_M)= frequência de manchas observadas em moscas BH / frequência de manchas observadas em moscas MH; frequência de recombinação (F_R)= $1 - F_M$. Frequência total de manchas (F_T)= total de manchas observadas nas moscas MH (considerando manchas *mwh* e *flr³*) / N° de moscas; mutação= $F_T \times F_M$; recombinação= $F_T \times F_R$ (SANTOS et al., 1999; SINIGAGLIA et al., 2006).

4. RESULTADOS

A avaliação da genotoxicidade foi realizada por meio dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH), de ambos os cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB), os quais foram tratados em idênticas condições. Para a realização do teste foram realizados experimentos com três diferentes concentrações do extrato aquoso (EAq), etanólico (EEtOH), hidrometanólico (EHM), hexânico (EHex) e fase

acetato de etila (FAcOEt) obtidos das raízes de *M. petraea*, concomitantemente foi adicionado o controle negativo (CN) e controle positivo (DXR).

A Tabela 1 (ANEXO) mostra os resultados obtidos com os descendentes MH do cruzamento ST tratados com 1,25 e 2,5 mg/mL de EAq, as frequências totais de manchas foram respectivamente 0,73 e 0,78; os resultados obtidos são estatisticamente inconclusivos quando comparados com o controle negativo, cuja frequência total de manchas foi de 0,48. No entanto, na concentração 5 mg/mL, a frequência total de manchas foi de 1,90, indicando que esta concentração é genotóxica e citotóxica pois o número de indivíduos adultos tratados com esta concentração foi 75% menor do que o observado nas demais concentrações.

No controle positivo (DXR) o total de manchas foi de 8,68 estatisticamente significativo quando comparado com o controle negativo, as manchas mutantes, estão distribuídas em simples pequena, simples grande e gêmeas (Gráfico 1).

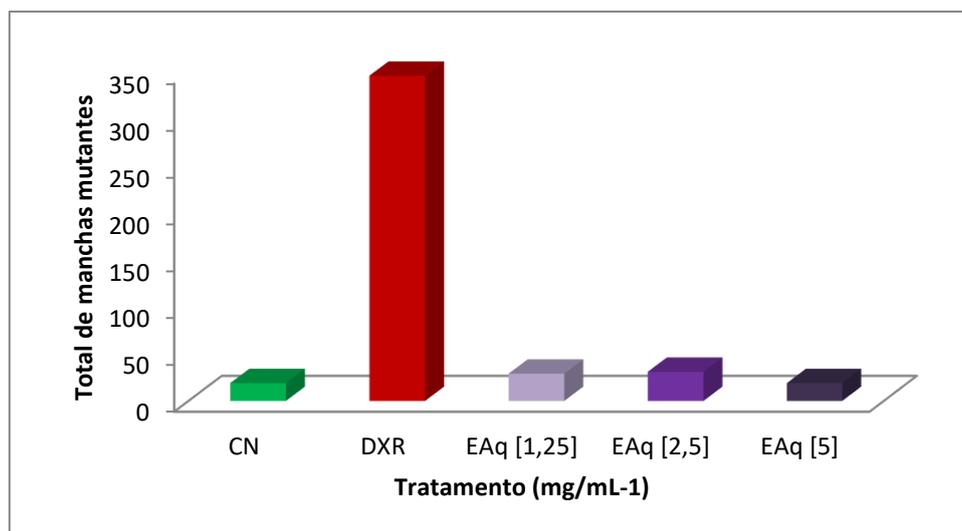


Gráfico 1. Total de manchas mutantes observadas nos indivíduos resultantes do cruzamento padrão (ST), tratados com EAq.

Para os descendentes BH do cruzamento ST, a frequência total de manchas variou de 0,37 a 0,45, enquanto que a obtida no controle negativo foi de 0,17. Calculando-se a frequência de recombinação, verifica-se que 62 a 71% das mutações ocasionadas, são devidas a eventos de recombinação.

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos do tratamento com o EAq nos descendentes MH do cruzamento HB, verifica-se que as frequências de mutações variaram de 2,25 a 3,65, enquanto que a encontrada no controle negativo foi de 0,70. Comparando-se as frequências de mutações obtidas nos grupos tratados com EAq com o controle negativo,

verifica-se que o EAq é genotóxico em todas as concentrações e citotóxico na concentração de 5 mg/mL (Gráfico 2).

Nos descendentes BH do cruzamento HB as frequências de mutações variaram de 1,30 a 1,96, enquanto que a observada no controle negativo foi de 0,17. Os grupos tratados diferem significativamente do controle negativo, a recombinação variou de 52 a 55% (Tabela 2).

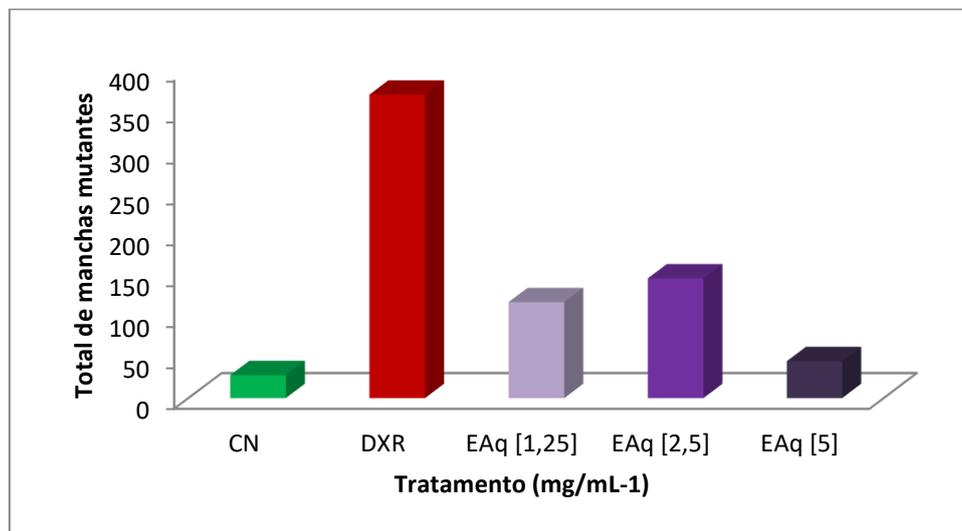


Gráfico 2. Total de manchas mutantes observadas nos indivíduos resultantes do cruzamento alta bioativação (HB), tratados com EAq.

A Tabela 3 apresenta os resultados da análise das frequências de manchas mutantes obtidas nos descendentes do cruzamento ST, tratados com diferentes concentrações do EEtOH, verifica-se que a frequência de mutações obtidas no controle negativo foi de 0,48, enquanto que os grupos tratados com o EEtOH apresentaram frequência de mutações variando de 0,85 a 1,25.

Para os descendentes BH do cruzamento ST, o EEtOH apresentou diagnóstico genotóxico para as concentrações 0,25 e 0,5 mg/mL e efeito citotóxico na concentração de 1,0 mg/mL.

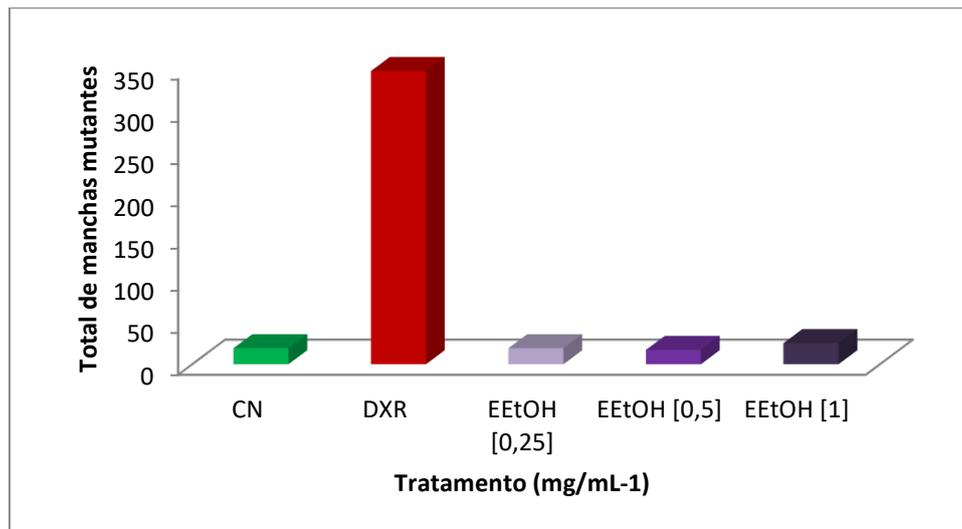


Gráfico 3. Total de manchas mutantes observadas nos indivíduos resultantes do cruzamento padrão (ST), tratados com EEtOH.

A Tabela 4 apresenta os resultados do cruzamento HB, cujos descendentes foram tratados com diferentes concentrações do EEtOH. Observa-se que a frequência de manchas mutantes no controle negativo foi de 0,70, enquanto que a encontrada nos grupos tratados com o EEtOH variou de 3,05 a 4,23. Verifica-se que o total de manchas nos grupos tratados, difere estatisticamente das obtidas no controle negativo (Gráfico 4). Entretanto, os indivíduos tratados com DXR apresentaram um total de mutações de 9,5 distribuídas em todas as categorias de manchas, apresentando um elevado potencial genotóxico.

Nos descendentes BH do cruzamento HB, as concentrações 0,25, 0,5 e 1 mg/mL do EEtOH, induziram um aumento estatisticamente significativo no número de manchas mutantes, quando comparadas com as observadas no controle negativo. A frequência de recombinação foi de 66%.

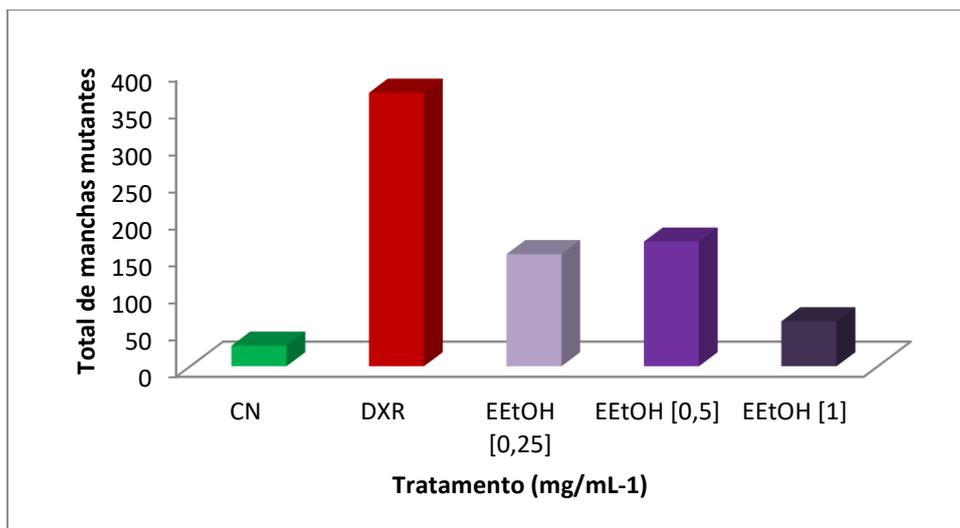


Gráfico 4. Total de manchas mutantes observadas nos indivíduos resultantes do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com EEtOH.

A Tabela 5 apresenta os resultados da análise das frequências de manchas mutantes obtidas nos descendentes do cruzamento ST, tratados com diferentes concentrações do EHM, verifica-se que a frequência de mutações obtidas no controle negativo foi de 0,30, enquanto que os grupos tratados com o EHM apresentaram frequência de mutações variando de 0,20 a 0,35 (Gráfico 5).

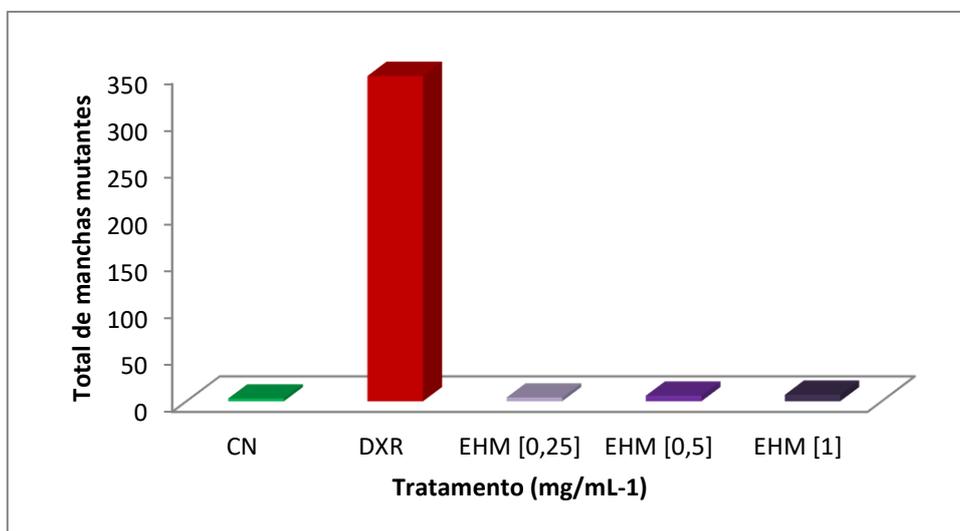
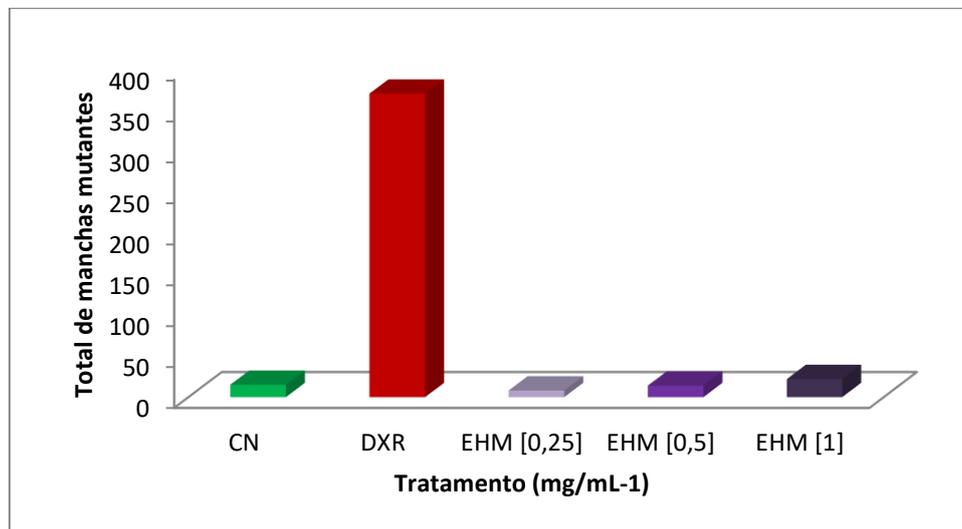


Gráfico 5. Total de manchas mutantes observadas nos indivíduos resultantes do cruzamento padrão (ST), tratados com EHM.

Na Tabela 6 os resultados apresentados nos descendentes MH do cruzamento HB, cujos descendentes foram tratados com diferentes concentrações do EHM. Observa-se que o

numero total de manchas mutantes no controle negativo foi de 0,75, enquanto que a observada nos grupos tratados com o EHM variou de 0,40 a 1,10. Verifica-se que o numero total de mutações encontradas nos grupos tratados, não difere estatisticamente das obtidas no controle negativo (Gráfico 6).



Gráfico 6. Total de manchas mutantes observadas nos indivíduos resultantes do cruzamento de alta bioativação (ST), tratados com EHM.

A FAcOEt apresentou atividade citotóxica, em todas as concentrações utilizadas, nas duas linhagens (ST e HB), todas as larvas morreram antes de atingirem o estdio de pupa.

A Tabela 7 mostra os resultados obtidos com os descendentes MH do cruzamento ST tratados com EHex, as frequências totais de manchas variaram de 0,30 a 0,70. As menores concentrações, apresentaram resultados estatisticamente inconclusivos quando comparadas com o controle negativo, cuja frequencia total de manchas foi de 0,30. Enquanto que a concentração de 1 mg/mL, foi genotóxica, pois o total de mutações difere significativamente da observada no controle negativo (Gráfico 7).

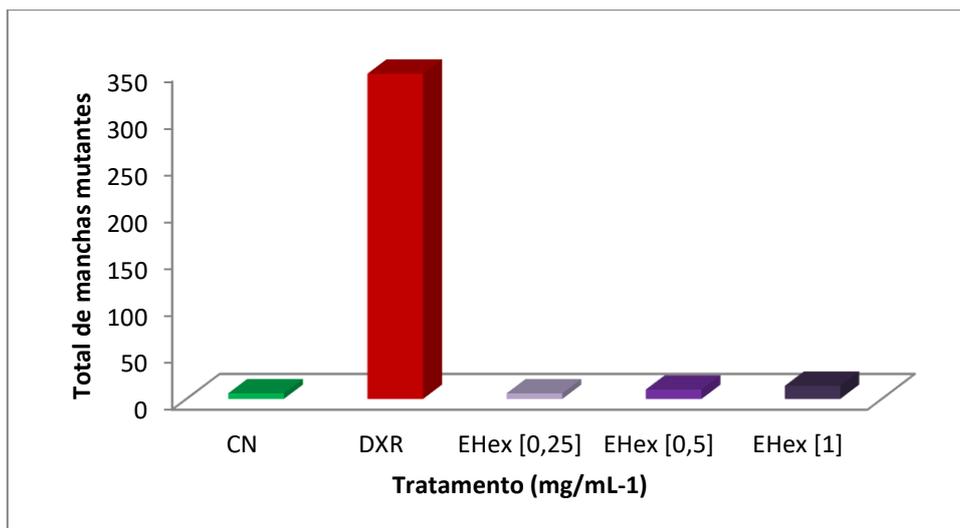


Gráfico 7. Total de manchas mutantes observadas nos indivíduos resultantes do cruzamento padrão (ST), tratados com EHex.

Na Tabela 8 os resultados obtidos do tratamento com o EHex nos descendentes MH do cruzamento HB, na concentração de 1 mg/mL, mostram aumentos significativos nas frequências totais de manchas. O aumento no total de manchas foi dose resposta (Gráfico 8).

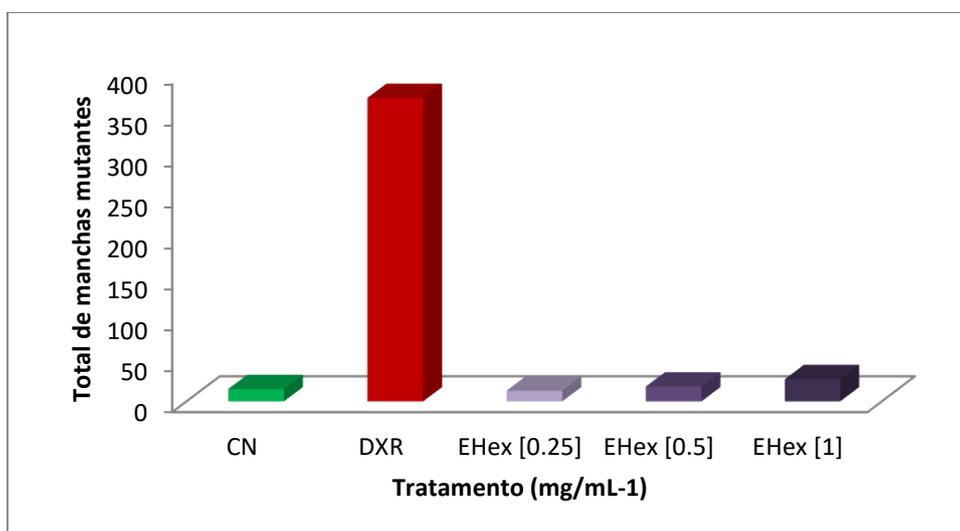


Gráfico 8. Total de manchas mutantes observadas nos indivíduos resultantes do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com EHex.

5. DISCUSSÃO

Diversas pesquisas têm sido conduzidas com diferentes espécies de Apocynaceae, visando o isolamento e a caracterização de metabólitos especiais, que apresentem potenciais

biológicos (farmacológicos) ainda não relatados. O estudo das atividades biológicas (citotóxica, mutagênica, genotóxica, antigenotóxica e antioxidante) de extratos de plantas, metabólitos secundários e seus derivados, são realizados em diversos organismos testes (COZZI et al., 1997; SILVA et al., 2008; VILAR et al., 2008).

Este trabalho tornou-se o primeiro estudo quanto à atividade mutagênica e recombinogênica de extratos obtidos de *M. petraea* avaliados em células somáticas de asas de *D. melanogaster* (SMART). Este ensaio tem sido utilizado como ferramenta para avaliar a interação de compostos químicos com a molécula de DNA, tornando-se um importante indicador de riscos à saúde humana.

Os resultados obtidos indicou que o potencial genotóxico dos EAq e EEtOH, foram similares nos cruzamentos ST e HB, entretanto, as numero total de manchas mutantes encontradas nos descendentes MH do cruzamento HB, são 4 vezes, maior do que as observadas no ST, este resultado indica que estes extratos apresentam metabólitos que são ativados pela enzima de metabolização de xenobióticos, (citocromo oxidase P-450).

A atividade citotóxica e genotóxica observada nos EAq e EEtOH, podem ser atribuídas aos constituintes destes extratos. O esteroide, neridienona A foi isolado do extrato etanólico (ASSIS, 2012), esta substância apresenta atividade anti-inflamatória, é citotóxica para células humanas (BAI et al., 2007) sendo, a provável responsável pela atividade citotóxica mencionada para os extratos de *M. petraea*.

Os resultados obtidos com os extratos EM e EHex indicam que somente a maior concentração (1 mg/mL) foi genotóxica para os descendentes MH das linhagens ST e HB. De acordo com Assis (2012), do EHex, foram isolados os compostos lupeol, α -amirina, β -amirina, β -sitosterol, acetato de ácido oleanólico, acetato do ácido ursólico, ácido arjunólico e asiático). A atividade genotóxica observada seja devido a interação desses metabólitos, considerando que os triterpenos (ácido ursólico e oleanólico) não são genotóxicos, pois de acordo com Resende (2006), reduziram significativamente a frequência de micronúcleos policromáticos obtidos de medula óssea de camundongos Balb/c, induzidos por DXR, apresentando assim atividade antigenotóxica.

Da FAcOEt etila foram isolados o lupeol, α -amirina, β -amirina, ácido oleanólico e acetato do ácido ursólico (ASSIS, 2012). Esta fase foi citotóxica em todas as concentrações avaliadas no ensaio SMART. Este resultado pode ser atribuído aos triterpenóides (α -amirina e β -amirina). De acordo com Barros (2011) uma mistura de α -amirina e β -amirina, induziu morte celular por apoptose em células leucêmica HL-60.

São poucos os relatos sobre a atividade citotóxica e genotóxica de extratos obtidos de plantas do gênero *Macrosiphonia*, este gênero também é descrito em muitas publicações com o nome de *Mandevilla* (SIMÕES et al., 2007). O efeito genotóxico e antigenotóxico de extratos etanólicos obtidos de *Mandevilla velutina*, foi avaliado em dois sistemas teste: Micronúcleo em medula óssea de ratos Swiss e o ensaio SMART. Os dois testes indicaram que o extrato não é genotóxico (SILVA et al., 2008).

6. CONCLUSÃO

Os extratos obtidos de *M. petraea* possuem metabólitos secundários, que são capazes de ativar promutágenos em mutágenos, ou ainda ser genotóxico direto para *Drosophila melanogaster*.

O EAq indicou ser genotóxico e citotóxico em elevadas concentrações, o EEtOH possui efeito genotóxico e citotóxico em altas concentrações, o EHex apresentou atividade genotóxica, o EHM foi genotóxico, EM aferiu ser genotóxico quando avaliado pelo teste SMART, assim, como o FAcOEt.

A atividade genotóxica, verificada nos extratos foi devida e à sensibilidade e eficiência do SMART em permitir a detecção de eventos mutacionais e recombinações em células somáticas.

REFERÊNCIAS

ASSIS, L. F. **Estudo Fitoquímico e de Genotoxicidade das Raízes da *Macrosiphonia petraea* (Apocynaceae)**. (Dissertação de Mestrado em Química). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Departamento de Química, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2012.

ASSIS, C. M.; MORENO, P. R. H.; YOUNG, M. C. M.; CAMPOS, I. P. A.; SUFFREDINI, I. B. Isolamento e avaliação da atividade biológica dos alcalóides majoritários de *Tabernaemontana angulata* Mart. ex Müll. Arg., Apocynaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. p.626-631, 2008.

BARBAN, J. R. **Revisão Taxonômica do Gênero *Macrosiphonia* Muell. – Arg. (Apocynaceae).** (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo, 1985.

BARROS, F. W. A.; BANDEIRA, P. N.; LIMA, D. J. B.; MEIRA, A. S.; FARIAS, S. S.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SANTOS, H. S.; LEMOS, T. L. G.; MORAIS, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; Ó PESSOA, C. Amyrin esters induce cell death by apoptosis in HL-60 leukemia cells. **Bioorganic e Medicinal Chemistry.** n. 19, p.1268-1276, 2011.

BAI, L.; WANG, L.; ZHAO, A.; HASEGAWA, T.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; HIROSE, K.; SAKAI, J.; BAI, J.; ANDO, M. Bioactive pregnanes from *Nerium Oleander*. **Journal Nature Products.** n.70, p.14-18, 2007.

BIER, E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. **Nature.** v.9, p.9-22, 2005.

CASTRO, L. S.; PERAZZO, F. F.; MAISTRO, E. L. Genotoxicity of *Ambelania occidentalis* (Apocynaceae) leaf extract *in vivo*. **Genetics and Molecular Research.** v.8, n.2, p.440-447, 2009.

CHABNER, B.; ALLEGRA, C.J.; CURT, G.; CALABRESI, P. **Agentes antineoplásicos. In: Goodman & Gilman's: As bases farmacológicas da terapêutica.** Ed. By Goodman LS. McGraw-Hill, Rio de Janeiro. p.909-952, 1996.

COZZI, R.; RICORDY, R.; AGLITTI, T.; GATTA, V.; PERTICONE, P.; DE SALVIA, R. Ascorbic acid and b-carotene as modulators of oxidative damage. *Carcinogenesis.* **Oxford.** v.18, n.1, p.223-228, 1997.

DING, Y. F.; BAO, X. D.; AN, J. M. Progress research of antitumor agents vinblastine analogues. *Chinese Pharmaceutical Journal* v.26, p.424-428, 2005.

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, n.4, p.297-308, 1988.

GRAF, U.; FREI, H.; KÄGI, A.; KATZ, A. J. WÜGLER, F. E. Thirty Compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**. v.222, p.359-373, 1989.

GRAF, U.; SPANÓ, M. A.; RINCÓN, J. G.; ABRAHAM, S. K.; ANDRADE, H. H. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. **African Newsletter on Occupational Health and Safety**. v.6, n.1, p.9-13, 1996.

GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**. v.271, p.59-67, 1992.

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

GUZMÁN-RINCÓN, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth, F. M.; Corkun, L. D.; Guzmán-Rincón, J. (eds). *Biomonitoring and Biomarkers as indicators of Environmental Change*. New York - NY. **Phenom Press**. p.169-181, 1995.

JUSSIEU, A. L. Exposition d'un nouvel ordre des plantes adopte dans les demonstrations du Jardin Royal. **Academie Royale des Sciences: Histoire et Memoires de Mathematique et de Physique de Paris**. p.214-240, 1774.

KARR, J. R. Assessment of biotic integrity using fish communities. **Fisheries**. v.6, p.21-27, 1981.

KAR, C. D.; NAZIR, A.; SAXENA, D. K. Effect of three chlorinated pesticides on *hsw* stress gene in transgenic *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. v.15, p.173-186, 2001.

KAZANTSEV, A.; WALKER, H. A.; SLEPKO, N. A bivalent Huntingtin binding peptide suppresses polyglutamine aggregation and pathogenesis in *Drosophila*. **Nature Genetics**. v.30, p.367-376, 2002.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; ÁLAMO, C. **Historia de la psicofarmacología**. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2003.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; DE PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.100, n.7, p.783-787, 2005.

MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as tradicional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**. v.110, p.165-170, 2007.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. Anatomy of the dicotyledons: leaves stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. **Oxford: Clarendon Press**, vol. 2, 1950.

NAZIR, A.; SAXENA, D. K.; KAR, C. D. Induction of hsp 70 in transgenic *Drosophila*: biomarker of exposure against phthalimide group of chemicals. **Biochimica Biophysica Acta**. v.1621, p.218-225, 2003.

NOGUEIRA, P. C. L.; ANDRADE, M. S.; SAMPAIO, T. S.; RIBEIRO, A. S.; MORAES, V. R. S.; MACHADO, S. M. F.; ALVES, P. B.; OLIVA, G.; THIEMANN O. H. **Estudo fitoquímico e avaliação farmacológica de plantas da família Apocynaceae e Guttiferae do estado de Sergipe**. II Seminário de Pesquisa FAP-SE. Aracajú, 2004.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. Oxford. **Toxicon**. v.39, p.603-613, 2001.

RESENDE, F. A.; BARCALA, C. A. M. A.; FARIA, M. C. S.; KATO, F. H.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. **Life Science**. n. 79, p.1268–1273, 2006.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. Micropopagação de *Aspidosperma polyneuron* (peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. Viçosa-MG. **Revista Árvore**. v.29, n.4, p.517-524, 2005.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas-RS. Editora Ulbra, 2003.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: Editora UFLA/FAEPE. p.180, 2001.

RUBIN, G. M.; YANDELL, M. D.; WORTMAN, J. R.; GABOR, M. G. L.; NELSON, C. R.; HARIHARAN, I. K.; FORTINI, M. E.; LI, P. W.; APWEILER, R.; FLEISCHMANN, W. Comparative genomics of the eukaryotes. **Science**. v.287, p.2185–2195, 2000.

SANTOS, J. H.; GRAF, U.; REGULY, M. L.; ANDRADE, H. H. R. The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research** 444:355-365, 1999.

SILVA, R. M. G.; SOUSA, N. C.; GRAF, U.; SPANÓ, M. A. Antigenotoxic effects of *Mandevilla velutina* (Gentianales, Apocyanaceae) crude extracts on cyclophosphamide-induced micronuclei in Swiss mice and urethane-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Biology**. v.31, n.3, p.751-758, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª edição: Editora UFRGS/ Editora UFSC. p.87-99, 2001.

SIMÕES, A. O.; KINOSHITA, L. S.; ENDRESS, M. E. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª edição. Porto Alegre, Florianópolis, Editora UFRGS/ Editora UFSC. n.17, p.87-90, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2005.

VILAR, J. B.; FERREIRA, F. L.; FERRI, P. H.; GUILLO, L. A.; CHEN CHEN, L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**. v.68, n.1, p.141-147, 2008.

VIOLANTE, I. M. P.; SOUZA, I. M.; VENTURINI, C. L.; RAMALHO, A. F. S.; SANTOS, R. A. N.; FERRARI, M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. n. 19, p.452-457, 2009.

VOGEL, E. M.; GRAF, U.; FREI, H.; NIVARD, M. M. J. The results of assay in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. In: MCGREGOR, D. B.; RICE, J. M.; VENITT, S. (eds). The use of Short and Medium-term Test for carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation. **IARC Scientific Publications**, Lyon. n.144, p.427-470, 1999.

VON POSER, G. L.; MENTZ, L. A. **Diversidade biológica e sistemas de classificação**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. (6ª edição) Porto Alegre, Florianópolis, Editora UFRGS/ Editora UFSC. p.75-91, 2007.

WOODSON, R. E. J.; MOORE, J. A. The vascular anatomy and comparative morphology of apocynaceous flowers. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**. v.65, p.135-166, 1938.

ANEXOS

Tabela 1. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes do cruzamento ST, tratados com o extrato aquoso de raízes (EAq) de *M. petraea* e seus controles negativos (Contr. Neg.) e positivo (DXR).

Genótipos e Conc. (mM)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a										Total manchas mwh ^c (n)	Recombinação %		
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2		MSG (>2 céls) ^b m = 5		MG m = 5		TM m = 2							
<i>mwh/flr³</i>															
Contr. Neg.	40	0.40	(16)		0.05	(02)		0.03	(01)		0.48	(19)		19	
DXR	40	3.18	(127)	+	2.23	(89)	+	3.28	(131)	+	8.68	(347)	+	347	96
1.25	40	0.68	(27)	I	0.05	(02)	i	0.00	(00)	i	0.73	(29)	i	29	62
2.5	40	0.73	(29)	+	0.03	(01)	i	0.03	(01)	i	0.78	(31)	i	31	71
5	10*	1.60	(16)	+	0.20	(02)	i	0.10	(01)	i	1.90	(19)	+	19	
<i>mwh/TM3</i>															
Contr. Neg.	30	0.17	(05)		0.00	(00)					0.17	(05)		5	
DXR	30	0.37	(11)	+	0.00	(00)	+				0.37	(11)	+	11	
1.25	30	0.30	(09)	i	0.07	(02)	i				0.37	(11)	i	11	
2.5	20	0.40	(08)	i	0.05	(01)	i				0.45	(09)	i	9	
5	30	0.40	(12)	i	0.03	(01)	i				0.43	(13)	+	13	

^aDiagnóstico 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 a = b = 0,05.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

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

Tabela 2. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes do cruzamento HB, tratados com o extrato aquoso de raízes (EAq) de *M. petraea* e seus controles negativos (Contr. Neg.) e positivo (DXR).

Genótipos e Conc. (mM)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a										Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)	Recombinação %
		MSP (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2		MSG (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5		MG <i>m</i> = 5		TM <i>m</i> = 2					
<i>mwh/flr</i> ³													
Contr. Neg.	40	0.70	(28)	0.00	(00)	0.00	(00)	0.70	(28)			28	
DXR	40	3.9	(156) +	1.95	(78) +	3.4	(136) +	9.5	(370) +			370	92
1.25	40	2.68	(107) +	0.25	(10) +	0.00	(00) i	2.93	(117) +			117	93
2.5	40	3.08	(123) +	0.50	(20) +	0.08	(03) i	3.65	(146) +			146	63
5	20*	2.00	(40) +	0.20	(04) +	0.05	(01) i	2.25	(45) +			45	
<i>mwh/TM3</i>													
Contr. Neg.	30	0.40	(12)	0.07	(02)			0.17	(05)			5	
DXR	30	0.73	(22) +	0.03	(01) +			0.76	(23) +			23	
1.25	30	1.30	(39) +	0.00	(00) i			1.30	(39) +			39	
2.5	30	1.77	(53) +	0.03	(01) i			1.80	(54) +			54	
5	25	1.88	(47) +	0.08	(02) i			1.96	(49) +			49	

^aDiagnóstico 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 $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

^dApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr*³.

Tabela 3. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes do cruzamento ST, tratados com o extrato etanólico de raízes (EEtOH) de *M. petraea* e seus controles negativos (Contr. Neg.) e positivo (DXR).

Genótipos e Conc. (mM)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a										Total manchas mwh ^c (n)	Recombinação %		
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2		MSG (>2 céls) ^b m = 5		MG m = 5		TM m = 2							
<i>mwh/flr³</i>															
Contr. Neg.	40	0.40	(16)		0.05	(02)		0.03	(01)		0.48	(19)		19	
DXR	40	3.2	(127)	+	2.23	(89)	+	3.28	(131)	+	8.68	(347)	+	347	96
0.25	20	0.80	(16)	+	0.05	(01)	i	0.10	(02)	i	0.95	(19)	+	19	
0.5	20	0.60	(12)	i	0.10	(02)	i	0.15	(03)	i	0.85	(17)	i	17	
1	20	1.00	(20)	+	0.10	(02)	i	0.15	(03)	i	1.25	(25)	+	25	
<i>mwh/TM3</i>															
Contr. Neg.	30	0.17	(05)		0.00	(00)				^d	0.17	(05)		5	
DXR	30	0.4	(11)	+	0.00	(00)	+				0.37	(11)	+	11	
0.25	20	1.00	(20)	+	0.10	(02)	i				1.10	(22)	+	22	
0.5	10	0.60	(06)	+	0.00	(00)	i				0.60	(06)	+	6	

^aDiagnóstico 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 a = b = 0,05.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

^dApenas 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 nos descendentes do cruzamento HB, tratados com o extrato etanólico de raízes (EEtOH) de *M. petraea* e seus controles negativos (Contr. Neg.) e positivo (DXR).

Genótipos e Conc. (mM)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a										Total manchas mwh ^c (n)	Recombinação %		
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2		MSG (>2 céls) ^b m = 5		MG m = 5		TM m = 2							
<i>mwh/flr³</i>															
Contr. Neg.	40	0.70	(28)		0.00	(00)		0.00	(00)		0.70	(28)		28	
DXR	40	3.9	(156)	+	1.95	(78)	+	3.4	(136)	+	9.5	(370)	+	370	93
0.25	40	3.15	(126)	+	0.60	(24)	+	0.05	(02)	i	3.80	(152)	+	152	66
0.5	40	3.35	(134)	+	0.88	(35)	+	0.00	(00)	i	4.23	(169)	+	169	66
1	20	2.45	(49)	+	0.55	(11)	+	0.05	(01)	i	3.05	(61)	+	61	
<i>mwh/TM3</i>															
Contr. Neg.	30	0.40	(12)		0.07	(02)					0.57	(17)		17	
DXR	30	0.7	(22)	+	0.03	(01)	+				0.76	(23)	+	23	
0.25	30	1.50	(45)	+	0.20	(06)	i				1.70	(51)	+	51	
0.5	30	1.77	(53)	+	0.13	(04)	i				1.90	(57)	+	57	
1	25	1.56	(39)	+	0.08	(02)	i				1.64	(41)	+	41	

^aDiagnóstico 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 a = b = 0,05.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

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

Tabela 5. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes do cruzamento ST, tratados com o extrato hidrometanólico de raízes (EHM) de *M. petraea* e seus controles negativos (Contr. Neg.) e positivo (DXR).

Genótipos e Conc. (mM)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a										Total manchas mwh ^c (n)		
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2		MSG (>2 céls) ^b m = 5		MG m = 5		TM m = 2						
<i>mwh/flr³</i>														
Contr. Neg.	20	0.15	(03)		0.15	(03)		0.00	(00)		0.15	(03)		3
DXR	40	3.18	(127)	+	2.23	(89)	+	3.28	(131)	+	8.68	(347)	+	347
0.25	20	0.20	(04)	i	0.00	(00)	-	0.00	(00)	i	0.20	(04)	i	4
0.5	20	0.25	(05)	i	0.00	(00)	-	0.05	(01)	i	0.30	(06)	i	6
1	20	0.35	(07)	i	0.00	(00)	-	0.00	(00)	i	0.35	(07)	i	7

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würbler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância a = b = 0,05.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Tabela 6. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes do cruzamento HB, tratados com o extrato hidrometanólico de raízes (EHM) de *M. petraea* e seus controles negativos (Contr. Neg.) e positivo (DXR).

Genótipos e Conc. (mM)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a										Total manchas mwh ^c (n)		
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2		MSG (>2 céls) ^b m = 5		MG m = 5		TM m = 2						
<i>mwh/flr³</i>														
Contr. Neg.	20	0.65	(13)		0.05	(01)		0.05	(01)		0.75	(15)		15
DXR	40	3.9	(156)	+	1.95	(78)	+	3.4	(136)	+	9.5	(370)	+	370
0.25	20	0.40	(08)	-	0.00	(00)	i	0.00	(00)	i	0.40	(08)	-	8
0.5	20	0.65	(13)	i	0.05	(01)	i	0.00	(00)	i	0.70	(14)	-	14
1	20	1.10	(22)	i	0.00	(00)	i	0.00	(00)	i	1.10	(22)	i	22

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würbler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância a = b = 0,05.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Tabela 7. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes do cruzamento ST, tratados com o extrato hexânico de raízes (EHex) de *M. petraea* e seus controles negativos (Contr. Neg.) e positivo (DXR).

Genótipos e Conc. (mM)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a										Total manchas mwh ^c (n)		
		MSP (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2		MSG (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5		MG <i>m</i> = 5		TM <i>m</i> = 2						
<i>mwh/flr</i> ³														
Contr. Neg.	20	0.15	(03)		0.15	(03)		0.00	(00)		0.30	(06)		6
DXR	40	3.18	(127)	+	2.23	(89)	+	3.28	(131)	+	8.68	(347)	+	347
0.25	20	0.20	(04)	i	0.10	(02)	i	0.00	(00)	i	0.30	(06)	i	6
0.5	20	0.40	(08)	i	0.10	(02)	i	0.00	(00)	i	0.50	(10)	i	10
1	20	0.55	(11)	+	0.10	(02)	i	0.05	(01)	i	0.70	(14)	i	14

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

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Tabela 8. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes do cruzamento HB, tratados com o extrato hexânico de raízes (EHex) de *M. petraea* e seus controles negativos (Contr. Neg.) e positivo (DXR).

Genótipos e Conc. (mM)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a										Total manchas mwh ^c (n)		
		MSP (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2		MSG (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5		MG <i>m</i> = 5		TM <i>m</i> = 2						
<i>mwh/flr</i> ³														
Contr. Neg.	20	0.65	(13)		0.05	(01)		0.05	(01)		0.75	(15)		15
DXR	40	3.9	(156)	+	1.95	(78)	+	3.4	(136)	+	9.5	(370)	+	370
0.25	20	0.40	(08)	-	0.25	(05)	i	0.00	(00)	i	0.65	(13)	-	13
0.5	20	0.65	(13)	i	0.20	(04)	i	0.05	(01)	i	0.90	(18)	i	18
1	20	1.30	(26)	+	0.00	(00)	i	0.05	(01)	i	1.35	(27)	+	27

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

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.