

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS – FCBA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

PAMELLA FUKUDA DE CASTILHO

**POTENCIAL MUTAGÊNICO E CITOTÓXICO DE SEMENTES DE *Aleurites*
moluccana (L.) WILLD. *IN VITRO*.**

**Dourados, MS
Outubro de 2016**

Pamella Fukuda de Castilho

POTENCIAL MUTAGÊNICO E CITOTÓXICO DE SEMENTES DE *Aleurites moluccana* (L.) WILLD. *IN VITRO*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, com orientação da Prof.^a Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira.

Dourados, MS

Outubro, 2016

Pamella Fukuda de Castilho

POTENCIAL MUTAGÊNICO E CITOTÓXICO DE SEMENTES DE *Aleurites moluccana* (L.) WILLD. *IN VITRO*.

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em: 18 de outubro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Me. Fabiana Gomes da Silva Dantas
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof.^a Dra. Anelise Samara Nazari Formagio
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof.^a Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira
Universidade Federal da Grande Dourados

*“Tudo tem seu tempo,
Há um momento oportuno
para cada coisa debaixo do céu.”*

Eclesiastes 3, 1

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e sempre: a Deus e a Maria, por terem me dado o dom da vida, intercedido por mim e guiado todos meus passos até hoje.

A minha base, minha família: Marcelo, Érika, Nicolle e Mitsue. Por tudo que sou, pelo o que me tornei, pelo amor, carinho e incentivo. Amo vocês incondicionalmente.

A minha orientadora Prof^a. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira, pela oportunidade, pela orientação, pelos ensinamentos, conselhos e carinho.

A minha coorientadora Fabiana Gomes da Silva Dantas, que teve papel fundamental em todo meu trabalho, desde a elaboração até a execução. Pela sua paciência, humildade, ensinamentos, pelo acolhimento e pela amizade. A você toda forma de obrigada possível.

Ao meu namorado Rafael, por todo amor que me dedicou, pelos conselhos, pela ajuda, pelos ensinamentos, por ter me ajudado a ter um olhar humilde e grato, percebendo desde os pequenos aos grandes detalhes. Obrigada por fazer a diferença na minha vida.

As minhas amigas irmãs Andreza, Elismary e Kamila, muito obrigada por todos momentos, risos, apoio, amizade, carinho, cuidado, compartilhado durante esses anos.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia Aplicada: Allan, Danny, Mel, Andressa, Adriana, Boni, Fernanda, Renata, Thaianne, Luana, Stephanie e Nayara, onde eu não só obtive conhecimentos, mas também amigos, os quais levarei por toda minha vida. Em especial, meus amigos Wellinton e Vagner, “irmãos científicos”, companheiros de sala, pela ajuda, pelo companheirismo, cumplicidade, risos e muitas brincadeiras. Podem sempre contar comigo.

A V turma de biotecnologia, pois é um grande prazer dizer que faço parte dessa TURMA, conhecida pelo companheirismo, pela amizade, pela cumplicidade. Sem vocês tudo teria sido muito mais difícil.

A todos meus amigos que estão longe, mas que me apoiaram para que eu tivesse força para enfrentar todos os meus desafios e chegar até aqui.

A equipe da Universidade Estadual de Maringá, que contribuiu para realização dos testes de citotoxicidade.

Ao corpo docente, aos técnicos e a Faculdade Federal da Grande Dourados de uma forma geral.

E a todos que contribuíram para a realização do meu trabalho, para a construção do meu conhecimento e minha jornada acadêmica.

RESUMO

O sobrepeso é um problema de saúde pública e está relacionado ao aumento da taxa de morbidade e mortalidade, essa circunstância engloba tanto questões de saúde quanto de estética. Hoje em dia, os padrões de beleza foram alterados, associando-a com o corpo esbelto e esguio e fazendo com que as pessoas busquem o emagrecimento para se adequar a esses padrões, através de diversos meios como por exemplo a utilização de produtos naturais. No entanto, esses produtos podem apresentar efeitos colaterais indesejáveis. Neste sentido, o objetivo foi verificar a atividade mutagênica e citotóxica de sementes de *Aleurites moluccana* que vem sendo usada popularmente para a perda de peso. O potencial mutagênico foi avaliado pelo teste de Ames (Kado) com duas linhagens de *Salmonella* Typhimurium TA 98 e TA 100 com e sem ativação metabólica e a citotoxicidade pelo teste de redução do MTS com células HeLa (adenocarcinoma cervical humano). Analisou-se o número de colônias revertentes por placa e o índice de mutagenicidade no teste de AMES e as sementes de *A. moluccana* demonstraram potencial mutagênico nas concentrações 38800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 19400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sem ativação metabólica para linhagem TA 98 e para a TA 100 na concentração 19400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com e sem ativação metabólica. No ensaio de citotoxicidade, as sementes de *A. moluccana* apresentaram potencial citotóxico após 48 horas nas concentrações 38800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 19400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ indicando viabilidade celular de 49,95% e 35,31% respectivamente. Os resultados obtidos demonstram que as sementes de *A. moluccana* exibiram potencial mutagênico e citotóxico em determinadas concentrações, evidenciando o risco do seu consumo e também de produtos naturais em que sua composição química e toxicidade é desconhecida, porém, não sabe-se quais são os compostos que atribuíram essas atividades as sementes, sendo necessário mais testes e análises fitoquímicas para assegurar sua utilização.

Palavras-chave: Emagrecimento, Noz da Índia e Teste de Ames.

ABSTRACT

Overweight is a public health problem and is associated with increased morbidity and mortality, this event encompasses issues of health and esthetic. Nowadays, the standards of beauty have changed, associating it with the slender body and slim, making people look for to lose weight to fit these models, through various means such as the use of natural products. However, these products may have undesirable side effects. In this sense, the objective was to assess the mutagenicity and cytotoxicity activity of *Aleurites moluccana* seed that has been popularly used for weight loss. The mutagenic potential was measured by the Ames test (Kado) with two strains of *Salmonella* Typhimurium TA 98 and TA 100 with and without metabolic activation and the cytotoxicity by MTS reduction assay with HeLa cells (human cervical adenocarcinoma). Was analyzed the number of revertants colonies per plate and mutagenicity index in the AMES test and seeds of *A. moluccana* demonstrated potential mutagenic at concentrations of 38.800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 19.400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ without metabolic activation for strain TA 98 and TA 100 at concentration 19.400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ with and without metabolic activation. In the cytotoxicity assay, seeds of *A. moluccana* showed cytotoxic potential after 48 hours at concentrations of 38.800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 19.400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ indicating cell viability of 49.95% and 35.31% respectively. The results showed that seeds of *A. moluccana* exhibited mutagenic and cytotoxic potential in certain concentrations, showing risk of your consumption and also natural products in which its chemical composition and toxicity is unknown, however, do not know is what are the compounds that have given these activities seeds, requiring more testing and phytochemical analysis to ensure its use.

Keywords: Ames Test, Noz da Índia and Weight loss.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Viabilidade celular das células HeLa com 24 horas de incubação com diferentes concentrações (1-1/8) da solução da semente de *A. moluccana* 42
- Figura 2. Viabilidade celular das células HeLa após 48 horas de incubação com diferentes concentrações (1-1/8) da solução da semente de *A. moluccana*. *** P<0,005 vs Controle. 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade mutagênica expressa pela média de revertentes/placa \pm desvio padrão e índice de mutagenicidade (IM) da solução da semente de *A. moluccana* na linhagem TA 98 de *S. Typhimurium* com ativação metabólica (+S9) e sem ativação metabólica (-S9). 41

Tabela 2. Atividade mutagênica expressa pela média de revertentes/placa \pm desvio padrão e índice de mutagenicidade (IM) da solução da semente de *A. moluccana* na linhagem TA 100 de *S. Typhimurium* com ativação metabólica (+S9) e sem ativação metabólica (-S9). 41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

CIVITOX – Centro Integrado de Vigilância Toxicológica

CO₂ – Dióxido de carbono

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Deoxyribonucleic acid

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid

ELISA – Enzyme linked immuno sorbent Assay

FCBA – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

Formazan – 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan

HeLa – Celulas imortais do tipo adenocarcinoma humano de colo de útero

IC₅₀ – Índice de citotoxicidade para 50% das células

IM – Índice mutagênico

Kg – Quilogramas

m – Metros

M – Molar

mL – Mililitros

mM – Milimolar

MS – Mato Grosso do Sul

MTS – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

NaCl – Cloreto de sódio

nm – Nanômetro

NPD – 4-nitro-*o*fenilenodiamino

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Phosphate buffered saline

pH – Potencial hidrogeniônico

UFGD – Universidade Federal da Grande Dourados

VIGITEL – Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Por Inquérito Telefônico

x – Vezes

2-ANTR – 2-antramino

μL – Microlitros

°C – Graus Celsius

μg – Micrograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVOS GERAIS	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 OBESIDADE	16
3.2 PRODUTOS NATURAIS UTILIZADOS PARA O EMAGRECIMENTO	17
3.3 <i>Aleurites moluccana</i> (L.) WILLD.	18
3.3.1 Características gerais	18
3.3.2 Potencial biológico	19
3.4 ATIVIDADE MUTAGÊNICA DE PLANTAS MEDICINAIS	20
3.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA DE PLANTAS MEDICINAIS	22
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
5. ANEXO 1.....	33

1. INTRODUÇÃO

O sobrepeso, o excesso de gordura corporal e a obesidade são condições físicas que têm despertado muita discussão na área da saúde. De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a proporção de adultos obesos vem aumentando cada vez mais, tornando essa condição um problema de saúde pública mundial. O sobrepeso além de estar relacionado com questões saúde, também compreende questões de estética. Na antiguidade o excesso de peso era sinal de saúde, prosperidade e beleza, pois garantia uma ingesta energética favorável para manter as necessidades de sobrevivência e proteção (MALIK et al., 2013; CFN, 2015).

Porém com o decorrer do tempo, a modernização alterou esses padrões e a beleza está associada a um corpo esbelto e esguio. Têm-se atualmente o que é conhecido como “culto ao corpo”, que pode ser definido como, a preocupação dos indivíduos com seus corpos, a fim de aproximá-lo o máximo possível do padrão de beleza estabelecido pela sociedade. De modo geral, o culto ao corpo envolve práticas de atividade física, dietas, intervenções cirúrgicas, utilização de medicamentos e também de produtos naturais (CASTRO et al, 2003; MOHAMMED E AHMAD, 2014).

Assim, os produtos naturais, como as plantas são muito utilizados para se obter o emagrecimento, devido a presença de princípios ativos provenientes do metabolismo secundário. Esses são responsáveis pelo efeito terapêutico das plantas medicinais, entre eles podemos citar os flavonoides, alcaloides, terpenoides e taninos. Essas substâncias complexas podem favorecer o emagrecimento, atuando de diferentes formas no organismo (GOBBO-NETO E LOPES, 2007; MALHEIROS et al., 2010; YUN, 2010).

Há diversas plantas relatadas na literatura com potencial emagrecedor. Atualmente, a semente de uma árvore ornamental, nativa da Indonésia e da Índia, popularmente conhecida como Noz da Índia, cuja planta tem nome científico de *Aleurites moluccana* (L.) Willd. vem sendo amplamente utilizada para o emagrecimento. Entretanto o Departamento de Toxicologia do Mato Grosso Do Sul emitiu uma nota técnica alertando sobre o potencial efeito tóxico dessa semente (CIVITOX-MS, 2016).

Uma vez que esses produtos naturais são compostos por diversos constituintes sendo uns facilmente identificáveis e outros não, há a possibilidade de possuírem efeitos

secundários indesejáveis (LOEW E KASZKIN, 2002). Pesquisas científicas demonstraram efeitos toxicológicos de plantas comumente utilizadas como medicinais, sabendo que essa utilização provém na maioria das vezes de conhecimento popular, é necessário a realização de estudos e testes que comprovem sua real atividade biológica para assegurar sua utilização (WARGOVICH et al., 2001).

Há testes que são aceitos pelas agências e corporações governamentais que são capazes de detectar substâncias potencialmente prejudiciais a saúde e que podem assegurar o consumo desses produtos (SANTOS et al., 2012). Na literatura ainda não há dados sobre as características toxicológicas da Noz da Índia e a realização de testes para comprovar sua atividade biológica torna-se então necessária.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o potencial mutagênico e citotóxico de sementes de *A. moluccana*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial mutagênico de sementes de *A. moluccana*, por meio de ensaios de mutação gênica reversa com *S. Typhimurium* (teste de Ames);
- Avaliar o potencial citotóxico de sementes de *A. moluccana* através do teste baseado na redução de MTS.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Obesidade

A obesidade é considerada um problema de saúde pública mundial, e está relacionada a diversos fatores, tais como: ingestão de alimentos com alto teor calórico, sedentarismo, predisposição genética e fatores ambientais (MALIK et al., 2013; NAPPI et al., 2016).

Dados da OMS revelam que entre 1980 e 2013, a proporção de adultos obesos no mundo subiu de 28,8% para 36,9% entre os homens e de 29,8% para 38% entre as mulheres (CFN, 2015). No Brasil, uma pesquisa realizada pela Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas (Vigitel) divulgou que o índice de brasileiros acima do peso, passou de 43% em 2006 para 52,5% em 2014 (VIGITEL, 2014).

Esses dados demonstram como o excesso de peso é uma enfermidade que tem afetado cada vez mais pessoas por ano, e isto é um fator extremamente preocupante já que ela também é um agente etiológico multifatorial para diversos outros distúrbios, como: diabetes, problemas cardiovasculares, alguns tipos de câncer, doenças renais, hipertensão, infertilidade, complicações respiratórias e depressão, sendo que esta última pode estar relacionada com os estereótipos sociais vinculados ao corpo (HAMMOUD et al., 2012).

Estar acima do peso não condiz com os protótipos de beleza estabelecidos e aceitos atualmente. A indústria cultural valoriza o corpo esbelto e esguio, e as mídias sociais tem um papel fundamental na disseminação desse modelo, fazendo com que as mulheres, incessantemente, busquem esse padrão de beleza imposto pela sociedade (MELO E OLIVEIRA, 2011).

Reverter esse quadro de sobrepeso torna-se então imprescindível para a saúde física e mental, uma vez que a busca pelo emagrecimento não tem sido almejada só por questões saúde, mas para se adequar aos padrões de beleza impostos pela sociedade atual. Nesse âmbito diversos tratamentos tem sido adotados, dentre eles métodos que não estão limitados apenas a intervenções cirúrgicas, como cirurgia bariátrica ou lipoaspiração, como também a prática de atividades físicas, modificações no estilo de vida, dietas e utilização de fármacos sintéticos e produtos naturais (MOHAMMED E AHMAD, 2014).

3.2 Produtos naturais utilizados para o emagrecimento

Os produtos naturais são considerados fontes de matéria-prima de grande importância na descoberta e desenvolvimento de novas drogas. Estima-se que compostos naturais e seus derivados contribuíram para produção de cerca de um terço dos medicamentos presentes atualmente no mercado (ZHOU et al., 2010).

As plantas medicinais são utilizadas pela população devido a insatisfação com a eficácia, alto custo e reações adversas dos medicamentos sintéticos, acompanhado da admiração pelos “produtos naturais” e “mundo verde”. Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas são os responsáveis por essas propriedades fitoterápicas (GOBBO-NETO, LOPES, 2007; MALHEIROS, et. al., 2010).

No Brasil, mais de 90% da população utiliza plantas medicinais e isso reflete na indústria de fitoterápicos, que movimenta aproximadamente 1 bilhão de reais por ano (CORREA E ALVES, 2008). Um dos destaques que essa área vem tendo é no tratamento da obesidade e do sobrepeso, pessoas acometidas estão buscando métodos alternativos, como os produtos naturais por acreditarem que esses produtos apresentam segurança, eficiência e preço mais acessível quando comparados com os medicamentos convencionais (MANENTI, 2010).

Algumas espécies já foram descritas na literatura pelo seu potencial no tratamento da perda de peso e é importante que essas pesquisas sejam cada vez mais difundidas, haja vista os benefícios que podem trazer tanto para a população quanto para o desenvolvimento, gestão e comercialização nas indústrias dos fitoterápicos e produtos farmacêuticos (SILVA et al., 2010).

Bacharis trimera, família Asteraceae, conhecida popularmente como “carqueja” é encontrada em regiões tropicais e tem uma ampla utilização na medicina tradicional em diversos estados do Brasil, sua folha é utilizada na forma de infusão para o emagrecimento (DE SOUZA et al., 2012). Também é popularmente consumida para outros distúrbios, como: hipertensão, anemia, reumatismo, infecção urinária, diabetes, obstrução hepática, calculos biliares, entre outros (ALBUQUERQUE, 1997; RODRIGUES E CARVALHO, 2001; MOREIRA et al., 2002; NUNES et al., 2003; DOS SANTOS E DE LIMA, 2008; ALBERTASSE et al., 2010; COSTA E

MAYWORM, 2011; ZENI E BOSIO, 2011; BIESKI et al., 2012; MEYER et al., 2012; LOPES E PANTOJA, 2013).

Annona muricata L., família Annonaceae, conhecida como graviola é encontrada em partes subtropicais e tropicais do mundo. Acredita-se que toda planta tem propriedades medicinais. No Brasil diversos estados têm realizado estudos sobre o uso tradicional dessa planta, que é usada para o emagrecimento, tratamento de infecções, picadas de cobra, câncer, dispneia, hipertensão, diabetes, inflamações, febre, dores na lombar e tontura (MOREIRA et al., 2002; DOS SANTOS E DE LIMA, 2008; SANTOS et al., 2012; LIPORACCI E SIMÃO, 2013; MACÊDO et al., 2013).

Hancornia speciosa Gomes, família Apocynaceae, conhecida popularmente como “mangaba”, é uma planta encontrada no cerrado brasileiro. O chá por decocção de sua entrecasca apresenta propriedades para o emagrecimento, além de ser utilizada para tratamento contra diabetes, tuberculose, hipertensão, dores na lombar, dermatite e úlcera (SILVA et al., 2010; SANTOS et al., 2013).

Outra planta muito utilizada popularmente para o emagrecimento é a *Hibiscus sabdariffa L.*, família Malvaceae, “hibisco”, é amplamente cultivado em área tropicais, suas flores apresentam efeitos substâncias para o emagrecimento. Ademais, seus cálices são utilizados para preparar chás quentes e bebidas frias contra a hipertensão, pirexia, inflamação, doenças hepáticas, pedras nos rins e bexiga. Também é relatado como agente antibacteriano, antifúngico, hipocolesterolêmico, antiespasmódico e protetor cardiovascular (LIN et al., 2003; FAKEYE et al., 2007).

Além dessas plantas já descritas na literatura, recentemente, a semente de *A. moluccana*, também pertencente a família das Euphorbiaceae tem sido indicada pela cultura popular para auxiliar na perda de peso.

3.3 *Aleurites moluccana* (L.) Willd.

3.3.1 Características gerais

A. moluccana (Euphorbiaceae) popularmente conhecida “nogueira-do-iguape” é uma árvore ornamental, nativa da Indonésia e da Índia, e no Brasil tornou-se bem aclimatizada e adaptada ao sul e sudoeste, destaca-se entre as angiospermas sendo uma das mais diversificadas e complexas (LIMA, 2006). É abundantemente distribuída na

região pantropical e inclui cerca de 300 gêneros e 6000 espécies. Em território brasileiro, existem cerca de 70 gêneros e 1000 espécies, sendo uma das principais família da flora brasileira (SOUZA E LORENZI, 2008).

Também pela descrição de Souza e Lorenzi (2008) as plantas que pertencem a esta família são de hábitos diversos, existindo como ervas, subarbustos, árvores e trepadeiras. Possuem flores de sexo separado, reunidas em inflorescências muito variadas e possuindo de 5-6 tépalas, folhas alternas inteiras ou partidas, fruto seco equisocarpo e sementes ricas em endosperma na maioria das vezes oleaginosos.

O gênero *Aleurites* possui as seguintes espécies: *A. trisperma*, *A. codata*, *A. montana*, *A. fordii*, *A. montance*, *A. rockinghamensis* e *A. moluccana*. Tendo essa última suas características descritas por Krisnawati et al., (2011) como uma árvore de porte médio e grande coroa de propagação, que pode atingir 20 m de altura e 0,9 m de diâmetro, casca marrom acinzentada, folhas de formas bem distintas, flor monóica de coloração branca levemente esverdeada, fruta verde a marrom podendo conter de 2 a 3 sementes em seu interior.

3.3.2 Potencial biológico

A planta também destaca-se pelo seu uso medicinal em diversos tratamentos, como: antiinflamatória, gonorréia, dor de cabeça, asma, conjutivite, úlceras, antitumoral, cicatrização de feridas e erupções na pele e também como desintoxicante alimentar. Já o óleo de sua semente, sofre modificações e é usado como substituto do diesel e seus resíduos são convertidos em álcool ou pirólise (ORWA et al., 2009; PRASAD et al., 2011; CESCA et al., 2012).

Extratos de folhas e casca de *A. moluccana* demonstraram efeitos biológicos como propriedades antivirais e também efeitos antibacterianos contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em estudos realizados anteriormente (LOCHER et al., 1996). Pedrosa e colaboradores (2002) também observou efeitos hipolipemiantes do extrato metanólico das folhas de *A. moluccana* em testes com ratos.

Cesca e colaboradores (2012) demonstraram que o extrato de folhas secas de *A. moluccana* possuem propriedades antiinflamatórias de uso tópico e Quintão e colaboradores (2011) os efeitos antinociceptivos.

Outra parte que vem sendo utilizada de *A. moluccana* é sua semente, conhecida também como “Noz da Índia” está sendo amplamente difundida, via internet e redes sociais como uma milagrosa fonte de emagrecimento que permite perder até 12 kg em um mês.

Sites de livre acesso, “descrevem” as propriedades medicinais da planta e até a sua forma de uso: fracionar a semente e consumir um pedaço por dia, até ter a perda de peso desejável. Primeiramente, fraciona-se em 8 pedaços e ingere durante 8 dias, depois em 4 pedaços, em 2 e por fim a semente inteira.

Essas informações não estão sendo veiculadas somente no Brasil, elas tiveram um alcance mundial: “e sobre a “legítima Noz da Índia”, a *A. moluccana*, o que encontramos foi que em Sidney, na Austrália, está sendo comercializado um produto da América do Sul, com o nome botânico de *A. moluccana*. Conhecido lá como “Latin Seed” e “Slim Seed” (semente latina e semente emagrecedora), que alega ter a habilidade de reduzir o peso corporal e que isso está sob investigação” (FOOD AUTHORITY, 2011).

De acordo com as descrições de Wargovich e colaboradores (2001) apesar dos produtos de origem vegetal poderem atuar de forma similar a medicamentos, eles possuem também efeitos colaterais, sendo necessário reunir os conhecimentos populares e os científicos, para garantir a segurança e eficácia desses produtos. Parte da população de países em desenvolvimento faz uso rotineiro das plantas medicinais desconhecendo os riscos envolvidos.

3.4 Atividade mutagênica de plantas medicinais

Dearfield e colaboradores (2002) definem mutagenicidade como uma alteração permanente no conteúdo ou na estrutura do material genético de um organismo. Podem desenvolver o câncer e outros processos crônicos degenerativos, quando mutam células somáticas e podem ser herdáveis em decorrência de mutação de células germinativas.

Os compostos considerados mutagênicos podem induzir alterações genômicas visando diretamente e/ ou indiretamente o DNA. Quando expostos a um agente mutagênico, a frequência de mutações espontâneas que tem uma média de 10^{-8} a 10^{-10} podem aumentar de 1 a 10 vezes (AJITH E SOJA, 2006).

Essa exposição à agentes mutagênicos pode ser de vários tipos: provenientes da dieta (mutágenos gerados durante o cozimento de alimentos ou presentes na dieta) endógenos (óxido nítrico, radicais livres de oxigênio); radiação (exposição aos raios-X para diagnóstico e radioterapia) poluição (efluentes industriais, pesticidas, incineração do lixo) e também a metabólitos secundários (provenientes do metabolismo de plantas) (RIBEIRO E MARQUES, 2003).

Existem vários ensaios que são capazes de detectar substancias potencialmente mutagênicas para a saúde humana. Um teste que é amplamente utilizado na pesquisa científica e aceito por agências e corporações governamentais é o teste de Ames ou ensaio *Salmonella*/microsoma o qual possui capacidade de avaliar compostos mutagênicos em drogas sintéticas, amostras ambientais, derivados de alimentos e plantas medicinais (SANTOS et al., 2012; AOUATIF et al., 2013; PARRELLA et al., 2013; OZKAN et al., 2013).

Este método utiliza linhagens de *Salmonella* Typhimurium, auxotróficas para histidina, que apresenta diferentes mutações no operon desse aminoácido, o que as torna incapazes de crescer na ausência do mesmo (histidina-dependentes). Novas mutações no local dessas mutações pré-existentes, ou nas proximidades dos genes, podem restaurar a função do gene e permitir que as células sintetizem histidina. Estas células recém-mutadas podem crescer na ausência de histidina e formar colônias. Devido a isso, o teste é muitas vezes citado como “ensaio de reversão”. Este ensaio detecta dois tipos de mutação: deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) ou substituição de bases no DNA (MARON e AMES, 1983; MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Essas linhagens de *S. Typhimurium* não apresentam enzimas de metabolização, não tendo capacidade de identificar agentes mutagênicos de ação indireta. Então, adiciona-se ao teste o que é chamado de “fração S9”, que é obtida a partir do fígado de ratos e contém enzimas de metabolização de xenobióticos (MARON E AMES, 1983). De acordo com Santos e colaboradores (2006) todas essas propriedades conferem grande credibilidade ao teste, sendo considerado eficiente e sensível na identificação e caracterização de diferentes agentes mutagênicos.

Estudos realizados por Ferreira e Vargas (1999) demonstraram a atividade mutagênica através do ensaio com *S. Typhimurium* a diversos extratos de plantas

utilizadas na medicina popular no sul do Brasil: *Myrciaria tenella* Berg. (Myrtaceae), *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae), *Tripodanthus acutifolius* Tiegh. (Loranthaceae) e *Cassia corymbosa* Benth. (Leguminosae), essa atividade mutagênica é provavelmente devido a presença de flavonoides, taninos e antraquinonas nos extratos.

Elgorashi et al. (2003) investigaram os efeitos mutagênicos potenciais de plantas usadas na medicina tradicional sul-africana. Os resultados indicaram que extratos do bulbo de *Crinum macowanii*, folhas de *Diospyros whyteana*, *Catharanthus roseus*, *Ziziphus mucronata* e ramos de *Combretum mkhzenze* apresentaram potencial mutagênico.

Ocimum basilicum L. é uma planta usada na medicina popular na forma de infuso como antiespasmódica, carminativa, contra catarros e disenteria e seu extrato apresentou potencial mutagênico (LOPEZ et al., 2000). Outro exemplo são os derivados antraquinônicos de *Aloe vera* L. que é uma planta muito utilizada em produtos farmacêuticos e cosméticos (PARRA et al., 2000).

Maciel e colaboradores (2002) afirmam que as plantas podem apresentar efeitos indesejáveis, então é extremamente importante realizar testes para avaliar as atividades biológicas das plantas utilizadas popularmente, afim de garantir a segurança no consumo desses produtos naturais.

3.5 Atividade citotóxica de plantas medicinais

Um composto é considerado potencialmente citotóxico quando pode induzir a morte celular ou apresentar efeitos negativos nas funções celulares (EISENBRAND et al., 2002). As células podem responder de duas formas a um efeito tóxico: reversivelmente, quando é privada de nutrientes e fatores de crescimento ou irreversivelmente, quando as células se diferenciam, entram em apoptose ou senescência (FRESHNEY, 2001).

Há diversos relatos na literatura sobre a atividade citotóxica das plantas medicinais ou dos extratos obtidos a partir das mesmas. Segundo Abdul-Awal (2016), os extratos brutos de casca e folha de *Hibiscus tiliaceus*, planta popularmente usada na forma de infusão, apresentaram grande potencial citotóxico.

Os extratos de cinco plantas medicinais *Albizia adianthifolia*, *Alchornea cordifolia*, *Alchornea laxiflora*, *Pennisetum purpureum* e *Spathodea campanulata* utilizadas popularmente em Camarões na África Central também apresentaram citotoxicidade (KUETE et al., 2016).

Outras plantas selecionadas no nordeste brasileiro, apresentaram potencial citotóxico: *Byrsonima sericea*, *Duranta repens*, *Himatanthus bracteatus*, *Ipomoea purga*, *Ixora coccinea*, *Mabea piriri*, *Ocotea longifolia* e *Psychotria capitata* (DA SILVA et al., 2016).

De acordo com Capasso e coladores (2000) a maioria dos fitoterápicos que são utilizados tanto por automedicação quanto por prescrição médica, não possuem o seu perfil tóxico totalmente conhecido. Com isso, a realização de testes com intuito de identificar fatores de risco é imprescindível.

Na avaliação da citotoxicidade, pode-se utilizar diferentes parâmetros, geralmente os ensaios que testam essa atividade, examinam *endpoints* que podem indicar: alteração morfológica e replicação das células, colapso da barreira de permeabilidade celular, efeitos nas membranas celulares das organelas e função mitocondrial reduzida (HODSGSON et al., 2004).

O ensaio MTS é um exemplo desses testes que podem ser utilizados, detecta somente células vivas e o sinal gerado é dependente do grau de ativação dessas células. É amplamente aplicado e um dos mais sensíveis quanto a exposição das células a substâncias tóxicas, detectando a citotoxicidade. É um teste colorimétrico, e como característica dos mesmos, são rápidos e precisos (MOSMANN, 1983; FOTAKIS e TIMBREL, 2006).

O método baseia-se em células vivas que utilizam o MTS, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, um sal solúvel em água de coloração amarela, como substrato e o reduz através da clivagem do anel pela atividade de desidrogenases mitocondriais, presentes e funcionais exclusivamente nestas células vivas, a um produto de cor roxa e insolúvel em água, o sal formazan 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan, desta forma, pode-se através da mudança de cor, visualizar as células metabolicamente ativas. Após a exposição das células ao composto a ser testado e submetido ao período de incubação das mesmas em contato com o MTS,

as amostras são medidas espectrofotometricamente pelo leitor de ELISA (VELLONEN et al., 2004).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-AWAL, S.M., et al. (2016). Evaluation of pharmacological activity of *Hibiscus tiliaceus*. *Springer Plus*, v.5, p. 1209.

AJITH, T. A.; SOJA, M. (2006). A comparative study on the antimutagenicity of atorvastatin and lovastatin against directly acting mutagens. *Cell Biol Toxicol*, v. 22, p. 269 - 274.

ALBERTASSE, P.D.I.; THOMAZ, L.D.; ANDRADE, M.A. (2010). Medicinal plants and their uses in Barra do Jucu community, Vila Velha Municipality, Espírito Santo State, Brazil. *Rev. bras. plantas med.*, v.12.

ALBUQUERQUE, U.P. (1997). Etnobotânica: uma aproximação teórica e epistemológica. *Revista Brasileira de Farmácia.*, v. 78, p. 60–64.

AOUATIF, C.; LOOTEN, P.; PARVATHI, M. V.; RAJA-GANESH, S.; PARANTHAMAN, V. (2013). Genotoxicological Evaluation of NUTRALYS Pea Protein Isolate. *ISRN Toxicology*, v. 2013.

BIESKI, I.G.C.; RIOS SANTOS, F.; DE OLIVEIRA, R.M.; ESPINOSA, M.M.; MACEDO, M.; ALBUQUERQUE, U.P.; DE OLIVEIRA MARTINS, D.T. (2012).

Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, v. 2012.

CAPASSO, R.; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. (2000). Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*, v. 71, p. 58-65.

Carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. CASTRO, A.L. (2003). Culto ao corpo e sociedade: mídia, estilos de vida e cultura de consumo. São Paulo: Annablume: FAPESP.

CESCA, T.G. et al. (2012). Antinociceptive, anti-inflammatory and wound healing features in animal models treated with a semisolid herbal medicine based on *Aleurites moluccana* L. Willd. Euforbiaceae standardized leaf extract Semisolid Herbal. *Journal of ethnopharmacolog*, v. 143, p. 355-362.

CONSELHO FEDERAL DE NUTRICIONISTA. (2015). Disponível em: <http://www.cfn.org.br/index.php/oms-alerta-que-obesidade-esta-aumentando-em-varios-paises/> . Acesso em 10/2016.

CORREA, C.C.; ALVES, A.F. (2008). Plantas medicinais como alternativa de negócios: caracterização e importância, 46th Congress, Rio Branco, Acre, Brasil. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER).

COSTA, V.; MAYWORM, M. (2011). Medicinal plants used by the community of Tenentes District-Extrema Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Braz. J. Med. Plants.*, v.13, p. 282–292.

DA SILVA, T. B. C., et al. (2016). Cytotoxic Potential of Selected Medicinal Plants in Northeast Brazil. *BMC Complementary and Alternative Medicine* v. 16, p. 199.

DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M. C.; MCCARROLL, N. E.; MAUER, I.; ALCOVIC, L. R. (2002). Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutation Research*, v. 521, p. 121 – 135.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. (2002). Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, p. 193-236.

ELGORASHI, E.E.; TAYLOR, J.L.S.; MAES, A.; VAN STADEN, J.; DE KIMPE, N.; VERSCHAEVE, L. (2003). Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. *Toxicol Lett.*, v. 143, p. 195-207.

FAKEYE, T. O.; ADEGOKE, A. O.; OMOYENI, O. C.; FAMAKINDE, A.A. (2007). Effects of water extract of *Hibiscus sabdariffa*, Linn (Malvaceae) 'Roselle' on excretion of a diclofenac formulation. *Phytotherapy Research*, v. 21, p. 96–98.

FERREIRA, I.C.D.F.; VARGAS, V.M.F. (1999). Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella*/microsome assay. *PhytotherRes.*, v. 13, p. 397-400.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, v. 160, p. 171-177.

FRESHNEY, I. (2001). Application of cell cultures to toxicology. *Cell Biology and Toxicology*, v.17, p. 213-230.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381.

HAMMOUD, A.O.; MEIKLE, A.W.; REIS, L.O.; GIBSON, M.; PETERSON, C.M.; CARRELL, D.T. (2012). Obesity and male infertility: a practical approach. *Semin Reprod Med.*, v.30, p. 486–95.

HODGSON, E.; LEBRANC, G. A.; MEYERS, S. A.; SMART, R.C. (2004). Introduction to Biochemical and Molecular Methods in Toxicology. In: HODGSON E (Ed.). A textbook of modern toxicology. 3 edition. New Jersey: John Wiley & Sons, p. 13-22.

KRISNAWATI, H.; KALLIO, M.H.; KANNINEN, M. (2011). *Aleurites moluccana* (L.) Willd: ecology, silviculture and productivity. *Center for International Forestry Research*.

KUETE, V.; TCHINDA, C.F.; MAMBE, F.T.; BENG, V.P.; EFFERTH, T. (2016). Cytotoxicity of methanol extracts of 10 Cameroonian medicinal plants towards multi-factorial drug-resistant cancer cell-lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 16, p. 267.

LIMA, L.R. (2006). Estudos taxonômicos em *Croton* seção *Lamprocroton* (Mull. Arg.) Pax. (Euphorbiaceae). Tese de doutorado - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LIN, W.L.; HSIEH, Y.J.; CHOU, F.P.; WANG, C.J.; CHENG, M.T.; TSENG, T.H. (2003). Hibiscus protocatechuic acid inhibits lipo-polysaccharide-induced rat hepatic damage. *Archives of Toxicology*, v.77, p.42–47.

LIPORACCI, H.S.N.; SIMÃO, D.G. (2013). Ethno botanical survey of medicinal plants from home gardens of Bairro Novo Horizonte, Ituiutaba - MG. *Braz. J. Med. Plants.*, v. 15, p. 529–540.

LOCHER, C.P.; WITVROUW, M.; DE BETHUNE, M.; BURCH, M.T.; MOWER, H.F.; DAVIS, H.; LASURE, A.; PAUWELS, R.; CLERCQ, E.; VLIETINCK, A.J.; ISAAC, O. (1996). Antiviral activity of hawaiian medicinal plants against human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Phytomedicine*, v. 2, p. 259–264.

LOEW, D.; KASZKIN, M. (2002). Approaching the problem of bioequivalence of herbal medicinal products. *Phytotherapy Research*, v.16, p. 705-711.

LOPES, G.F.G.; PANTOJA, S.C.S. (2013). Levantamento das espécies de plantas medicinais utilizadas pela população de Santa Cruz – RJ. *Rev. Eletrônica Novo Enfoque.*, v. 16, p. 62–80.

LOPEZ, A.G.L.; PARRA, A.V.; RUIZ, A.R.; PILOTO, J. (2000). Estudo toxicogénico de um extrato fluido de *Ocimum basilicum* L.(albahaca blanca). *Rev. Cubana Plant Méd.*, v.5, p. 78-83.

MACÊDO, M.S.; RIBEIRO, D.A.; DE ALMEIDA SOUZA, M.M. (2013) .Uso de plantas medicinais cultivadas em uma área de caatinga em Assaré – CE. *Cad. De. Cult. e Ciênc.*, v.12, p. 36–45.

MACIEL, M. A. M.; et al. (2002). Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química nova*, v. 25, p. 429-438.

MALHEIROS, A. et al. (2010). Considerações gerais sobre aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais. In: BRESOLIN, T. M. B; CHECHINEL-FILHO, V. (organizadores) *Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar*. São Paulo: Santos, p. 417.

MALIK, V.S.; WILLETT, W.C.; HU, F.B. (2013). Global obesity: Trends, risk factors and policy implications. *Nat. Rev. Endocrinol.*, v. 9, p. 13–27.

MANENTI, A.V. (2010). Plantas medicinais utilizadas no tratamento da obesidade: uma revisão. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do Grau

de Bacharel no Curso de Nutrição da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

MARON, D. M.; AMES, B. N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res*, v. 113, p. 173 – 215.

MELO, C. M.; OLIVEIRA, D.; RAMALHO, O. (2011). Uso de inibidores de apetite por mulheres: um olhar a partir da perspectiva de gênero. *Ciência e saúde coletiva*, v. 16, p. 2523-2532.

MEYER, L.; QUADROS, K.E.; ZENI, A.L.B. (2012). Etnobotânica na comunidade de Santa Bárbara, Ascurra, Santa Catarina, Brasil. *Rev. Bras. De. Biociências*, v. 10, p. 258.

MOHAMMED, K. A.; AHMAD M. A. (2015). The role of dentistry in treatment of obesity – Review. *The Saudi Journal for Dental Research*. v. 6, p. 152–156.

MOREIRA, R.C.T.; COSTA, L.B.; COSTA, R.C.S.; ROCHA, E.A. (2002). Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus - BA, Brasil. *Acta Farm. Bonaer.*, v. 21, p. 205–211.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. (2000). The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*, v. 455, p. 29 – 60.

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxic assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63.

NAPPI, C.; GAUDIERI, V.; PETRETTA, M., & CUOCOLO, A. (2016). Noninvasive Cardiac Imaging in Obesity: Challenges and Opportunities. *Current Cardiovascular Imaging Reports*, v.9, p. 25.

NUNES, G.P.; SILVA, M.F.; RESENDE, U. M.; SIQUEIRA, J.M. (2003). Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Rev. bras. farmacogn.*, v. 13, p. 83-92.

ORWA, C.; MUTUA, A.; KINDT, R.; JAMNADASS, R.; ANTHONY, S. (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. *World Agroforestry Centre*, Kenya.

OZKAN, H.; GULTEKIN, D. D.; SEZEN, S.; OZGERIS, B.; GULLUCE, M.; TÜMER, F. (2013). Mutagenic assessment of three synthetic pyridine-diaryl ketone derivatives. *Toxicology and Industrial Health*, v. 2013.

PARRA A.V.; LÓPEZ, A.G.; RUIZ, A.R.; FERRER, J.P.; MARTINEZ, R.R. (2000). Derivados antraquinónicos del Aloe vera l. tamizaje genotóxico. *Rev Cubana Plant Med*, v. 5, p. 46-50.

PARRELLA, A.; LAVORGNA, M.; CRISCUOLO, E.; ISIDORI, M. (2013). Mutagenicity, Genotoxicity, and Estrogenic Activity of River Porewaters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 2013.

PEDROSA, R.C.; MEYRE-SILVA, C.; CECHINEL-FILHO, V.; BENASSI, J.C.; OLIVEIRA, L.P.S.; ZANCANARO, V.; DAL MAGRO, J.; YUNES, R.A. (2002). Hypolipidaemic activity of methanol extract of *Aleurites moluccana*. *Phytotherapy Research*, v.16, p. 765–768.

PRASAD, B. D. et al. (2011). Screening of wound healing activity of bark of *Aleurites moluccana* L. *International Journal Of Pharmaceutical Research & Analysis*, v. 1, p. 21-25.

QUINTÃO, N. L. M.; MEYRE-SILVA, C.; SILVA, G. F.; ANTONIALLI, C. S.; ROCHA, L. W.; LUCINDA-SILVA, R. M.; MALHEIROS, A.; SOUZA, M. M.; CECHINEL-FILHO, V.; BRESOLIN, T. M. B. (2011). *Aleurites moluccana* (L.) Willd. Leaves: Mechanical Antinociceptive Properties Of a Standardized Dried Extract And Its Chemical Markers. *Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine*. v. 2011, p. 10.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D. (2007). Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v. 9, p. 17-35.

SANTOS, F. J.; MOURA, D. J.; PÉRES, V. F.; SPEROTTO, A. R.; CAMARÃO, E. B.; CAVALCANTE, A. A.; SAFFI, J. (2012). Genotoxic and mutagenic properties of *Bauhinia platypetala* extract, a traditional Brazilian medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 144, p. 474-482.

SANTOS, F. V.; COLUS, I. M. S.; SILVA, M. A.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. (2006). Assessment of DNA damage induced by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. *Food Chem Toxicol*, v. 44, p. 1585-1589.

SANTOS, S.L.D.X.; DA NÓBREGA, A.R.R.; BARBOSA, J.A.A.; BRASILEIRO, T. F. (2012). Plantas utilizadas como medicinais em uma comunidade rural do semi-árido da Paraíba, Nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Farm.*, v. 93, p. 68-79.

SILVA, M.A.B; MELO, L.V.L.; RIBEIRO, R. V.; DE SOUZA, J. P. M.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D.; SILVA, R. M. (2010). Ethnobotanical survey of plants used as anti-hyperlipidemic and anorexigenic by the population of Nova Xavantina-MT, Brazil. *J. Pharmacogn.*, v. 20, p. 549–562.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. (2005). *Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, Baseado em APG II*. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, p. 640.

VELLONEN, K. S.; HONKAKOSKI, P.; URTTI, A. (2004). Substrates and inhibitors of efflux protein interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *European Journal Of Pharmaceutical Sciences*, v.23, p. 181-188.

Vigitel Brasil 2014 Saúde Suplementar: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Agência Nacional de Saúde Suplementar. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

WARGOVICH, M.J.; WOODS, C.; HOLLIS, D.M.; ZANDER, M.E. (2001). Herbals, cancer prevention and Health. *J. Nutri.*, v. 131, p. 3034-3036.

YUN, J.W. (2010). Possible anti-obesity therapeutics from nature. A review. *Phytochem.*, v.71, p.1625–1641.

ZHOU, X.; LI, Y.; CHEN, X. (2010). Computational identification of bioactive natural products by structure activity relationship. *J Mol Graph Model.*, v. 29, p. 38–45.

5. ANEXO 1

Artigo científico

O artigo científico descrito neste item será submetido a revista *Journal of Ethnopharmacology* e as normas para a submissão neste periódico encontram-se disponíveis em: <http://elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/506035/authorinstructions>

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E CITOTÓXICO DE SEMENTES DE *Aleurites moluccana* (L.) WILLD.

CASTILHO, P. F.^{*,}; DANTAS, F. G. S.^a; XXXX; OLIVEIRA, K. M. P.^a

^aFaculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Resumo

Introdução: As sementes de *Aleurites moluccana* L. Willd. popularmente conhecidas como “Noz da Índia” vem sendo utilizadas como fonte emagrecedora. Em fevereiro de 2016 o Departamento de Toxicologia do Mato Grosso Do Sul emitiu uma nota técnica alertando sobre o seu potencial tóxico, no entanto não há estudos toxicológicos descritos na literatura. O objetivo foi do estudo foi avaliar a atividade mutagênica e citotóxica de sementes de *A. moluccana*.

Materiais e métodos: A forma popularmente indicada para uso da semente é fracioná-la e consumir um pedaço por dia, até a perda de peso desejável. Primeiramente, fraciona-se uma semente inteira em 8 pedaços e ingere durante 8 dias, depois em 4 pedaços, em 2 e por fim a semente inteira. Logo, as concentrações testadas foram diluídas de modo a reproduzir a forma como é indicada no seu uso popular, obtendo as concentrações de 38800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 19400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 9700 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 4850 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O potencial mutagênico foi avaliado pelo teste de Ames (Kado) com duas linhagens de *Salmonella* Typhimurium TA 98 e TA 100 com e sem ativação metabólica e a citotoxicidade pelo teste de redução do MTS com células HeLa (adenocarcinoma cervical humano).

Resultados: Analisou-se o número de colônias revertentes por placa e o índice de mutagenicidade no teste de AMES. As sementes de *A. moluccana* demonstraram potencial mutagênico nas concentrações 38800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 19400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sem ativação metabólica para linhagem TA 98 e para a TA 100 na concentração 19400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com e sem ativação metabólica. No ensaio de citotoxicidade, as sementes de *A. moluccana* apresentaram potencial citotóxico após 48 horas nas concentrações 38800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 19400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ indicando viabilidade celular de 49,95% e 35,31% respectivamente.

Conclusões: As sementes de *A. moluccana* apresentaram potencial citotóxico e mutagênico em determinadas concentrações.

Palavras-chave: Emagrecimento, Noz da Índia, Produtos naturais e Teste de Ames.

Abstract

Introduction: As seeds of *Aleurites moluccana* L. Willd. Popularly known as "Noz da Índia" has been used as a source of weight loss. In February 2016 the Department of Toxicology of Mato Grosso do Sul issued a technical note on its toxic potential, however there are no toxicological studies in the literature. Aim of the study to evaluate the mutagenic and cytotoxic activity of *A. moluccana* seeds.

Materials and Methods: The popular way to use the seed is to fractionate it and consume one piece per day, up to a desirable weight loss. First, a whole seed is divided into 8 pieces and ingested for 8 days, then into 4 pieces, 2 pieces, and finally the whole seed. Thus, concentrations tested with dilution to reproduce as indicated in their popular use, obtaining concentrations of 38.800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 19.400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 9.700 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 4.850 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The mutagenic potential was measured by the Ames test (Kado) with two strains of *Salmonella* Typhimurium TA 98 and TA 100 with and without metabolic activation and the cytotoxicity by MTS reduction assay with HeLa cells (human cervical adenocarcinoma).

Results: Was analyzed the number of revertant colonies per plate and mutagenicity index in the AMES test and seeds of *A. moluccana* demonstrated potential mutagenic at concentrations of 38.800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 19.400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ without metabolic activation for strain TA 98 and TA 100 at concentration 19.400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ with and without metabolic activation. In the cytotoxicity assay, seeds of *A. moluccana* showed cytotoxic potential after 48 hours at concentrations of 38.800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 19.400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ indicating cell viability of 49.95% and 35.31% respectively.

Conclusions: The results showed that seeds of *A. moluccana* exhibited mutagenic and cytotoxic potential in certain concentrations.

Keywords: Ames test, Noz da Índia and Weight loss.

1. Introdução

Os produtos naturais têm sido uma fonte inesgotável para obtenção de substâncias com potencial terapêutico. A utilização desses produtos é uma prática datada há tempos e está relacionada à integração dos aspectos populares às propriedades químicas que são fundamentadas na estrutura e princípios ativos (Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Malheiros et al., 2010; Yun, 2010). As plantas medicinais são utilizadas para os mais variados efeitos, dentre os quais podemos destacar: antimicrobianos, antitumorais, anti-reumático, diurético, antiobesidade, tratamentos estéticos, dentre outros.

O sobrepeso é considerado um problema de saúde mundial com custos sociais exorbitantes, sendo relacionado ao aumento da taxa de morbidade e mortalidade. Além dos aspectos da saúde, o excesso do peso também está relacionado com a estética. Na antiguidade, o ganho de peso e o conseqüente acúmulo de gordura eram vistos como sinais de saúde e prosperidade, porém, com o passar dos tempos os padrões de beleza se transformaram e atualmente a sociedade busca incessantemente o “corpo perfeito” (Yun, 2010).

Vários são os fatores que estimulam as pessoas a buscarem o emagrecimento para se enquadrarem nos padrões de beleza impostos pela sociedade. Assim, pode-se notar o aumento do número de propagandas veiculadas na mídia que envolvem questões estéticas, bem como a infinidade de regimes que prometem a perda de peso e os variados produtos dietéticos que fornecem subsídios para as pessoas acreditarem na simbologia de que a beleza física proporciona felicidade (Souto e Ferro-Bucher, 2006).

De acordo com (Yun, 2010) um dos meios utilizados para atingir esse ideal são os produtos naturais. As plantas medicinais são utilizadas como coadjuvantes na perda de peso, por possuírem componentes como flavonoides, alcaloides e terpenoides que favorecem o emagrecimento atuando como hipolipidêmicos, antioxidantes, hipocolesterolêmico, reduzindo o consumo de energia e aumentando o gasto energético. Essas propriedades que as plantas medicinais podem apresentar, juntamente com a admiração pelos “produtos naturais” e o “mundo verde” faz desse método uma grande estratégia para o emagrecimento.

Recentemente, a semente de *A. moluccana*, uma árvore ornamental, popularmente conhecida como “Noz da Índia” e pertencente à família Euphorbiaceae,

vem sendo difundida como potencial fonte emagrecedora, prometendo eliminar até 12 kg em somente uma semana. Sites que possuem livre acesso descrevem “a milagrosa” semente e indicam sua forma de uso, que consiste em fracionar a semente em pedaços e ingeri-los a cada dia, até obter a perda de peso desejável (Cesca et al., 2012).

Entretanto, essas plantas que são utilizadas como medicinais, advém, na maioria das vezes de conhecimentos empíricos, desconhecendo sua real atividade biológica. Os metabólitos secundários que apresentam efeito terapêutico podem possuir também efeitos colaterais indesejáveis. Estudos científicos demonstraram efeitos toxicológicos associados a diversas plantas comumente utilizadas como medicinais, por esta razão, é necessário reunir conhecimentos populares e científicos para assegurar o uso e eficácia desses produtos (Wargovich et al, 2001).

Existem testes amplamente utilizados na pesquisa científica e aceitos por agências e corporações governamentais que avaliam a capacidade toxicologica desses produto (Santos et al., 2012). Desta forma, baseado no uso popular e na ausência de estudos toxicológicos que garantam o consumo seguro da Noz da Índia, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial mutagênico e citotóxico de sementes de *A. moluccana*.

2. Materiais e métodos

2.1 Obtenção e preparo do material vegetal

As sementes de *A. moluccana* foram obtidas em uma loja de produtos naturais, na cidade de Birigui, estado de São Paulo, sudeste do Brasil.

A forma popularmente indicada para uso da semente é fracioná-la e consumir um pedaço por dia, até a perda de peso desejável. Primeiramente, fraciona-se uma semente inteira em 8 pedaços e ingere durante 8 dias, depois em 4 pedaços, em 2 e por fim a semente inteira. Logo, as concentrações testadas foram diluídas de modo a reproduzir a forma como é indicada no seu uso popular.

Assim, para o preparo da solução, foi realizada a maceração de uma semente e adicionado 10 mL de água (quantidade supostamente necessária para ingerir a semente), homogeneizou-se e uma alíquota de 5 mL foi considerada solução estoque e a partir desta, foi realizada a diluição seriada de 1-1/8 da semente.

2.2 Teste mutagenicidade

A avaliação do potencial mutagênico da semente de *A. moluccana* foi realizada pelo Teste de Ames pelo método de microssuspensão descrito por (Kado et al., 1983).

Para o preparo do inóculo alíquotas de 0,1 mL de *S. Typhimurium* TA 98 e TA 100 foram inoculadas em 20 mL de Caldo Nutriente (Oxoid n. 2) e incubadas a 37 °C por 16 horas em uma incubadora com agitação orbital de modo a obter uma suspensão de aproximadamente 1×10^8 bactérias/mL. Após este tempo as cepas foram concentradas por centrifugação (10.000 giros a 4 °C) por 10 minutos e ressuspensas em 4 mL de tampão fosfato 0,2 M.

Os ensaios foram realizados na presença e ausência da fração microssomal S9. Foram adicionados nos tubos teste 50 µL de tampão fosfato 0,2 M ou fração S9, 5 µL da solução da semente (concentrações 1, 1/2, 1/4 e 1/8) e 50 µL da suspensão bacteriana. Os tubos foram pré-incubados por 90 minutos a 37 °C. Após o período de incubação foi adicionado 2 mL de top ágar (0,6% de ágar, 0,6% de NaCl, 0,05 mM L-histidina, 0,05 mM biotina, pH 7,4, 45 °C) aos tubos e a mistura foi vertida em placas com ágar mínimo (1,5% de ágar, solução de Vogel-Boner 50 x e solução de glicose 10%). As placas foram incubadas a 37 °C por 48-66 horas e posteriormente, as colônias revertentes His + foram contadas.

Os controles positivos utilizados nos ensaios sem ativação metabólica foram: 4-nitro-*o*-fenilenodiamino (NPD) (10µg/placa) para a linhagem TA98 e azida sódica (2,5µg/placa) para a linhagem TA100. Nos ensaios com ativação metabólica foi empregado o mesmo composto 2-antramino (2-ANTR) (0,63µg/placa) para as duas linhagens. Como controle negativo foi utilizado o DMSO. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração da solução.

2.3 Teste de citotoxicidade

Os ensaios foram realizados com as células HeLa (Adenocarcinoma humano de colo de útero) disponibilizadas pela Prof^a Dr^a Melyssa Melyssa Fernanda Norman Negri da Universidade Estadual de Maringá, Brasil. Foram cultivadas a 37 °C e CO₂ inferior a 5% em meio Eagle's modificado por Dulbecco's (DMEM; Gibco) composto por 10%

de soro bovino fetal (Gibco) e 1% de penicilina/streptomicina (P/S; Gibco). Os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia proposta por (Capoci et al., 2015).

Após atingirem 80% de confluência as células foram separadas utilizando solução de tripsina EDTA (Gibco) a 25% e ajustadas a uma concentração de 2×10^5 células/mL com DMEM fresco sem P/S. Primeiramente, 200 μ L da suspensão de células padronizada foi adicionada a microplaca de 96 poços e incubada por 24 horas antes do tratamento com a solução. Todas as incubações do teste de citotoxicidade foram realizadas com CO₂ inferior a 5%.

Após o período de incubação a microplaca foi devidamente lavada com tampão PBS e adicionou-se a solução da semente nas concentrações testadas e as placas foram novamente incubadas a 37 °C e CO₂ inferior a 5% por 24 e 48 horas de tratamento.

A citotoxicidade da solução da semente foi avaliada pelo método baseado na redução de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazólio) em meio DMEM sem vermelho de fenol. MTS é um biorredutor de células epiteliais humana em formazan, que é solúvel em meio de cultura de tecido. Após a adição do MTS as placas foram incubadas por 3 horas a 37 °C no escuro. A absorbância do formazan foi medida a 490 nm usando uma leitora de microplaca *ASYS* (Biochrom, Holliston, MA, EUA). Como controle negativo foi realizada a leitura das células nas mesmas condições, porém sem tratamento com a solução da semente. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A citotoxicidade da solução da semente foi dada como a porcentagem de viabilidade celular, calculada pela seguinte equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Média amostra tratada}}{\text{Média controle negativo}} \times 100$$

Calculou-se também o IC₅₀ que é a concentração necessária para reduzir em 50% a viabilidade celular, para esse cálculo foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50.



A pedido da autora os Capítulos 3, 4 e 5 foram retirados do pdf.

Referências:

Abdelgadir, H.A., Van Staden, J., 2013. Ethnobotany, ethnopharmacology and toxicity of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae): A review. South African Journal of Botany. 88, 204–218.

Centro Integrado de Vigilância Toxicológica – CIVITOX, 2016. Intoxicação pelo uso da Noz da Índia. http://www.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/sites/88/2016/02/Nota-T%C3%A9cnica-001_2016_No-z-da-India.pdf (accessed 09.10.2016).

Cesca, T.G. et al., 2012. Antinociceptive, anti-inflammatory and wound healing features in animal models treated with a semisolid herbal medicine based on *Aleurites moluccana* L. Willd. Euforbiaceae standardized leaf extract Semisolid Herbal. Journal of ethnopharmacolog. 143, 355-362.

Gobbo-Neto, L., Lopes, N. P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química nova. 30, 374-381.

Goel, G., Makkar, H.P.S., Francis, G., and Becker, K., 2007. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. Int J Toxicol. 26, 279 – 288.

Hui, W. H., Hoi, C. T., 1968. An examination of the euphorbiaceae of Hong-Kong. Australian Journal of Chemistry. 21, 1675-1677.

Kado, N. Y., Langley, D., Eisenstadt, E., 1983. A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay. Increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. Mutat. Res. 121, 25-32.

Malheiros, A. et al., 2010. Considerações gerais sobre aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais, in: Bresolin, T. M. B., Chechinel-Filho, V., Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Santos, pp. 417.

Maron, D. M., Ames, B. N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutat Res. 113, 173 – 215.

Mazzatorta, P., Tran, L. A., Schilter, B., Grigorov, M., 2007. Integration of structure - activity relationship and artificial intelligence systems to improve in silico prediction of Ames test mutagenicity. *J Chem Inf Mod.* 47, 34-38.

Meyre-Silva, C., More, T. C., Yunes, R. A., Santos, A. R. S., Dal Magro, J., Delle-Monache, F., Chechin-Filho, V., 1997. A triterpene and a flavonoid C-glycoside from *Aleurites moluccana* L. Willd. (Euphorbiaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense.* 16, 169-172.

Oliveira-Filho, E.C., Francisco, J. R., 2000. Toxicity of *Euphorbia milii* Latex and Niclosamide to Snails and Nontarget Aquatic Species. *Ecotoxicol Environ Saf.* 46, 342-50.

Prasad, M., Kumar, A., Mishra, D., Srivastav, S.K., Srivastav, A.K., 2010. Acute Toxicity Of *Euphorbia Royleana Boiss* (Euphorbiaceae) latex on freshwater catfish, *Heteropneustes Fossilis* (Siluriformes, Heteropneustidae). *Acta Toxicol. Argent.* 18, 5-9.

Raghavendra, H.L., Prashith Kekuda, T.R., Valleesha, N.C., Sudharshan, S.J., Chinmaya, A., 2010. Screening for Cytotoxic activity of Methanol Extract of *Putranjiva roxburghii* Wall (Euphorbiaceae) Seeds. *Pharmacognosy Journal.* 2, 335-337.

Santos, F. J., Moura, D. J., Péres, V. F., Sperotto, A. R., Camarão, E. B., Cavalcante, A. A., Saffi, J., 2012. Genotoxic and mutagenic properties of *Bauhinia platypetala* extract, a traditional Brazilian medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology.* 144, 474-482.

Satyanarayana, P., Kumar, K. A., Singh, S. K., Rao, G. N., 2001. A new phorbol diester from *Aleurites moluccana*. *Fitoterapia.* 72, 304-306.

Souto, S., Ferro-Bucher, J. S. N., 2006. The indiscriminate use of weight control diets and the development of eating disorders. *Rev. Nutr.* 19, 693-704.

Tomczak e Reicher, 2013. Estudos Fitoquímicos Adicionais com as folhas e casca de *Aleurites Moluccana* (Euphorbiaceae). Monografia para obtenção do título de farmacêutico pela Universidade do Itajaí (SC), Centro de Ciência da Saúde.

Varricchio, M.C.B., Sales, F., Silva, S., Kuster, R.M., Pyrrho, A.S., Castelo Branco, M.L.T., 2008. Efeitos toxicológicos crônicos do látex bruto de *E. Tirucalli* (aveloz) sobre peso de fígado e baço conforme uso tradicional: Um estudo preliminar. BioFar - Revista de Biologia e Farmácia. 2, 6-11.

Wargovich, M.J., Woods, C., Hollis, D.M., Zander, M.E., 2001. Herbals, cancer prevention and Health. J. Nutri. 131, 3034-3036.

Yun, J.W., 2010. Possible anti-obesity therapeutics from nature. A review. Phytochem.71, 1625–1641.