



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Trabalho de Conclusão de Curso



**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DAS PARTES AÉREAS DE *ZORNIA*
BRASILIENSIS VOG. (FABACEAE)**

Tatianne Mota Batista

Orientanda

Marianna Vieira Sobral

Orientadora

João Pessoa – PB

Fevereiro – 2013

Tatianne Mota Batista

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
DAS PARTES AÉREAS DE *ZORNIA BRASILIENSIS* VOG. (FABACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de **Farmácia** do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para conclusão do curso de Farmácia (Generalista).

Marianna Vieira Sobral

Orientadora

João Pessoa - PB

2013

Tatianne Mota Batista

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
DAS PARTES AÉREAS DE *ZORNIA BRASILIENSIS* VOG. (FABACEAE)**

APROVADA EM / /2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Marianna Vieira Sobral

Doutora em Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
(Orientadora)

Prof. Ms. João Carlos Lima Rodrigues Pita

Mestre em Farmacologia
(Examinador Externo – Faculdade Maurício de Nassau/ João Pessoa-PB)

Prof. Msa. Daiene Martins Lunguinho

Mestre em Farmacologia
(Examinador Externo – FACENE/ João Pessoa-PB)

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
DAS PARTES AÉREAS DE *ZORNIA BRASILIENSIS* VOG. (FABACEAE)**

Tatianne Mota Batista¹, Monalisa Taveira Brito¹, Josean Fachine Tavares¹, Marcelo Sobral da Silva¹, Marianna Vieira Sobral¹.

¹ Laboratório de Ensaios Toxicológicos, Universidade Federal da Paraíba, Caixa Postal 5009, João Pessoa, Paraíba 58051-970, Brasil.

(fone: 83-3216-7003; fax: 83-3216-7570 ; e-mail: mariannavbs@gmail.com)

Resumo: *Zornia brasiliensis* (Fabaceae), popularmente conhecida como "urinária", "urinana" e "carrapicho", é usada pela população como diurético. Como não há relatos na literatura sobre sua possível toxicidade, a avaliação de seu perfil toxicológico é essencial para sua utilização segura pela população, bem como para subsidiar a produção de um medicamento fitoterápico. Diante disto, o presente estudo foi realizado para avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Z. brasiliensis* (EHZB). O valor de CH₅₀ obtido no ensaio de hemólise foi 1.954 (1.840 - 2.074) µg/mL, mostrando que o extrato apresenta baixa citotoxicidade frente eritrócitos de camundongos. Durante o ensaio de toxicidade aguda, não ocorreu morte nem alterações comportamentais nos animais tratados com 2.000 mg/kg do EHZB. Houve diminuição significativa no consumo de ração nos animais machos em comparação ao grupo controle, entretanto, não houve alteração significativa na evolução ponderal dos animais, os quais apresentaram a recuperação do peso ao final do tratamento. Nenhuma diferença significativa foi observada nos índices de coração, fígado, rins, baço e timo após tratamento agudo com EHZB. Ainda, o extrato não apresentou genotoxicidade no ensaio de micronúcleo em sangue periférico, no entanto apresentou genotoxicidade no ensaio de micronúcleo em medula óssea, resultado este que fornece indícios da melhor eficiência da medula óssea para detecção de células micronucleadas.

Palavras-chave: *Zornia brasiliensis*, Urinária, Toxicidade, Micronúcleo.

Sumário

Introdução.....	7
Material e Métodos	19
Material botânico.....	20
Animais	20
Avaliação da citotoxicidade do EHZB em eritrócitos de camundongos.....	20
Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda do EHZB.....	21
Avaliação da mutagenicidade do EHZB	23
Ensaio do micronúcleo em sangue periférico	23
Ensaio de micronúcleo em medula óssea	23
Análise estatística	24
Resultados e Discussão	25
Avaliação da citotoxicidade do EHZB em eritrócitos de camundongos.....	25
Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda do EHZB.....	26
Avaliação comportamental, evolução ponderal e consumo de água e ração	26
Avaliação do índice dos órgãos	27
Avaliação da mutagenicidade do EHZB	28
Ensaio do micronúcleo em sangue periférico	28
Ensaio do micronúcleo em medula óssea	29
Conclusões	31
Referências.....	32

Introdução

O uso de plantas medicinais na terapêutica é uma prática milenar, e está intimamente relacionado com a própria evolução do homem. Dados revelam a sua utilização já pelo homem de Neanderthal, que usava de suas propriedades mágico-simbólicas quando se deparava com algum tipo de malefício. Para utilizarem as plantas como medicamentos, os homens antigos valiam-se de suas próprias experiências empíricas de acerto e erro, e da observação do uso de plantas pelos animais, além da intervenção divina para determinadas doenças. Em suma, percebe-se que mitos, lendas e tradições apontam para o emprego amplo de plantas medicinais em todos os tempos, em todas as camadas sociais e quase em toda a humanidade (OLIVEIRA, 2006).

Desde os tempos imemoriais, o homem busca, na natureza, recursos que melhorem sua condição de vida para, assim, aumentar suas chances de sobrevivência pela melhoria de sua saúde. Em todas as épocas e culturas, ele aprendeu a tirar proveito dos recursos naturais locais. O uso da medicina tradicional e das plantas medicinais, em países em desenvolvimento, tem sido amplamente observado como base normativa para a manutenção da saúde (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA, 1996).

O uso dos produtos naturais iniciou-se há milhares de anos por populações de vários países com o intuito de tratar diversas enfermidades. Eram utilizados pela população como forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos. As plantas medicinais tem um importante papel na saúde mundial. Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, nas últimas décadas, elas continuam sendo utilizadas e, estima-se que, cerca de 25 a 30% de todas as drogas avaliadas como

agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR & MELLO, 2008).

No Brasil, o uso das plantas medicinais foi disseminado principalmente pela cultura indígena. É um país rico em diversidade cujo território possui seis principais biomas sendo designados como floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal, caatinga e pampa. Portanto, é uma rica fonte de produtos terapêuticos. No entanto, este potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas é pobremente explorado ou regulamentado, contrastando com o que ocorre em países como Alemanha, Estados Unidos e Canadá (CALIXTO, 2000; RATES, 2001; VEIGA-JUNIOR, 2008).

A utilização e comercialização de plantas medicinais têm sido estimuladas pela crescente demanda da indústria por novas fontes naturais de medicamentos e, por outro lado, devido aos efeitos colaterais causados pelos fármacos sintéticos que estimulam o aproveitamento de medicamentos de origem vegetal ou, em muitos casos, porque representam a única fonte de medicamentos, especialmente nos lugares mais isolados e distantes, e como resposta aos problemas imediatos de saúde (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

De acordo com as estimativas, mesmo em países desenvolvidos, grande parte da população faz uso de medicamentos da medicina tradicional, especialmente provenientes de plantas medicinais (WHO, 1999). Embora em países desenvolvidos, a população tenha um fácil acesso a medicamentos modernos, o uso de plantas medicinais manteve a sua popularidade devido a razões culturais. Por outro lado, nos países em desenvolvimento 65 – 80% da população depende exclusivamente das plantas medicinais para os cuidados básicos de saúde (AGRA, 2007).

Para grande parte da população, o uso de plantas medicinais é visto como uma integrativa histórica à utilização de medicamentos sintéticos, visto que os últimos são considerados mais caros e agressivos ao organismo. A disseminação do uso de plantas

medicinais, assim como a automedicação, deve-se principalmente ao baixo custo e fácil acesso à grande parcela da população (OMS, 2008).

Dentre as formas de uso das plantas como fonte terapêutica incluem-se os chás, os extratos brutos ou suas frações padronizadas em preparações farmacêuticas e os compostos isolados, usados diretamente como drogas ou precursores em processos de síntese. Independente do uso considerado, fatores como qualidade, segurança e eficácia são requisitos indispensáveis.

As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacológica) e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descoberta de novos medicamentos (MACIEL; PINTO; VEIGA-JÚNIOR, 2002).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (Resolução da Diretoria colegiada RDC n. 14/2010)

Nos países em desenvolvimento, bem como nos mais desenvolvidos, os apelos da mídia para o consumo de produtos à base de fontes naturais aumentam a cada dia. Os ervanários prometem saúde e vida longa, com base no argumento de que plantas usadas há milênios são seguras para a população (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Entretanto, isto não é verdade, pois para assegurar o uso destes produtos, deve-se submetê-los a testes de eficácia e segurança por métodos recomendados pela legislação, sendo as informações toxicológicas pré-clínicas obtidas com pesquisas em animais de laboratório previamente padronizadas (BRASIL, 2004). Além disso, é necessária a avaliação da relação risco/benefício do seu uso, por meio de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos.

Infelizmente, a maior parte dos fitoterápicos que são utilizados até a presente data por automedicação ou por prescrição médica não tem o seu perfil tóxico bem conhecido (CAPASSO et al., 2000; VEIGA-JUNIOR, 2008). Nesse contexto, a utilização inadequada de um produto, mesmo de baixa toxicidade, pode induzir problemas graves desde que existam outros fatores de risco tais como contra-indicações ou uso concomitante de outros medicamentos. Agravantes para a situação de risco do uso inadvertido da fitoterapia vêm a ser o fato de que existem relações entre a incidência de tumores em humanos provocados pelo uso de diversas substâncias genotóxicas e citotóxicas isoladas de vegetais considerados medicinais (AMES, 1983), e a existência comprovada de contaminantes e adulterantes em vários desses produtos comercializados de forma ainda não plenamente regular (SILVEIRA et al., 2008).

A importância da avaliação do potencial tóxico das plantas medicinais é relevante, pois grande parte dos consumidores de plantas medicinais acredita que as mesmas são seguras e não causam nenhum efeito tóxico, por serem naturais. No entanto, várias plantas medicinais utilizadas pela população podem produzir efeitos indesejáveis nos mais diversos sistemas, e, assim, serem perigosas para a saúde humana, podendo-se

citar a jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), ipeca (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich.) e arnica (*Arnica montana* L.), que podem causar irritação gastrointestinal; o mastruço (*Chenopodium ambrosioides* L.) e a trombetaireira (*Datura suaveolens* Humb. & Bopl ex Willd.), que podem lesionar o sistema nervoso central; o cambará (*Lantana câmara* L.), conhecido por sua hepatotoxicidade, a cáscara-sagrada (*Rhamnus purshiana* DC), que causa distúrbios gastrintestinais (como diarréia grave) e a arruda (*Ruta graveolens*), que pode provocar aborto, fortes hemorragias, irritação da mucosa bucal e inflamações epidérmicas. Em doses elevadas, até mesmo o jatobá (*Hymenaea courbail* L.), conhecido como expectorante e fortificante, pode desencadear reações alérgicas, e a sucubá (*Himathantus sucuuba* (Spruve) Woodson), usada no combate à amebíase, úlcera e gastrite, pode ser abortiva (VEIGA-JÚNIOR; PINTO e MACIEL, 2005).

Outros efeitos tóxicos de substâncias presentes em plantas dignos de nota são os efeitos hepatotóxicos de apiol, safrol, lignanas e alcaloides pirrolizidínicos; a ação tóxica renal que pode ser causada por espécies vegetais que contém terpenos e saponinas e alguns tipos de dermatites, causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e produtos naturais do tipo furanocumarinas. Componentes tóxicos ou antinutricionais, como o ácido oxálico, nitrato e ácido erúxico estão presentes em muitas plantas de consumo comercial (VEIGA-JÚNIOR; PINTO e MACIEL 2005).

Um dos efeitos tóxicos relatados recentemente foi ocasionado pelo uso de cápsulas de têucríio (*Teucrium chamaedrys* L. – Labiateae) que causou uma epidemia de hepatite na França. A origem do efeito tóxico foi atribuída a diterpenos do tipo neo-clerodano, transformados pelo citocromo P450 em metabólitos hepatotóxicos, que apresentavam uma subunidade epóxido. Anteriormente, o uso do têucríio era tido como seguro até que a comercialização do vegetal em cápsulas associado à camomila, prescrito para dietas de emagrecimento, desencadeou os casos de hepatite tóxica (LOEPER et al., 1994; VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Outro caso importante é o do confrei (*Symphytum officinale* L. - Boraginaceae). Esta planta é utilizada na medicina tradicional como cicatrizante devido à presença da alantoína, mas também possui alcaloides pirrolizidínicos, os quais são comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos. Após diversos casos de morte ocasionados por cirrose resultante de doença hepática veno-oclusiva, desencadeadas por estes alcaloides, o uso do confrei foi condenado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Os grupos das plantas medicinais e tóxicas ocasionalmente são tomados indistintamente, já que se tem o pressuposto de conterem princípios ativos, que dependendo da dose, podem ser benéficos ou tóxicos para o organismo. O grau de toxicidade, capaz de alterar o conjunto funcional orgânico, depende da dosagem e do indivíduo. Há substâncias altamente tóxicas que, em dosagens mínimas, entram na composição de vários remédios. E, há ainda, aquelas que só fazem efeito cumulativamente, mas a maioria entra em ação ao primeiro contato. Diversas substâncias isoladas de vegetais considerados medicinais possuem atividade citotóxica ou genotóxica e mostram relação com a incidência de tumores (SILVA et al., 2009b).

Algumas plantas medicinais podem causar riscos para mulheres grávidas, por estimular a motilidade uterina e provocar aborto, dentre elas: alho (*Allium sativum*), aloe (*Aloe ferox*), angélica (*Angelica archangelica*), arnica (*Arnica montana*), cânfora (*Cinnamomum canphora*), confrei (*Symphytum officinalis*), eucalipto (*Eucaliptus globulus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), gengibre (*Zengiber officinalis*) e sene (*Cassia angustifolia* e *Cassia acutifolia*) (VEIGA-JÚNIOR; PINTO e MACIEL, 2005).

Diante disto, torna-se imprescindível o estudo da avaliação do potencial tóxico das plantas medicinais através de pesquisas científicas pré-clínicas, utilizando testes toxicológicos e farmacológicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para subsidiar a realização de

ensaios clínicos e posterior produção de um medicamento fitoterápico, bem como para assegurar à população uma terapia segura.

A OMS reconhece a importância do uso tradicional, mas para a utilização de uma planta com finalidade terapêutica, em nível de saúde pública, é fundamental o estabelecimento de sua segurança, eficácia e garantia de qualidade das preparações (LAPA et al., 2003; WHO, 2002; RATES, 2001). O uso inadequado destes recursos terapêuticos pode originar efeitos adversos retardados e/ou assintomáticos, interações medicamentosas ainda não estudadas e dificilmente reconhecidas, além de retardar o diagnóstico e tratamento apropriado (CAÑIGUERAL; VILA, 2003; RATES, 2001).

No Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos anos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem elaborando normas para a regulamentação destes medicamentos, desde a Portaria nº 6 de 1995, que estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos, passando pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17 de 2000, a Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004, e a RDC nº 14 de 2010 atualmente em vigor, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. A Resolução atual determina que um dos critérios para a avaliação da segurança de uso e indicações terapêuticas é a apresentação da comprovação de segurança de uso (toxicologia pré-clínica, e clínica) e de eficácia terapêutica (farmacologia pré-clínica e clínica) do medicamento. Os ensaios clínicos deverão atender às exigências estipuladas pelo Conselho Nacional de Saúde - CNS através das Resoluções 196/96 e 251/97. Os ensaios de toxicologia pré-clínica deverão utilizar como parâmetros mínimos o GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS, que é normatizado pela Resolução Específica (RE) nº 90, de 16 de março de 2004.

Esse guia tem por objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica de acordo com a resolução vigente para registro e renovação de registro de fitoterápicos. De acordo com esse guia, devem ser realizados: ensaios para avaliação de toxicidade aguda, que avalia a toxicidade após exposição a uma dose única ou dose fracionada administrada no período de 24 horas; ensaios para avaliação de toxicidade de doses repetidas, que avalia a toxicidade após a exposição a doses repetidas; e estudo de genotoxicidade, que deve ser efetuado quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos. O ensaio toxicológico agudo permite conhecer o índice de letalidade, a forma de morte produzida pelo excesso do produto em teste e os órgãos alvo, além das alterações comportamentais e os sinais que precedem a morte (LARINI, 1999). Os ensaios agudos são obrigatórios para todo tipo de material em teste, independente do tempo de uso proposto para a espécie humana, pois evidenciam o risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não, e a forma de preveni-las (LARINI, 1999).

Diversos modelos experimentais são utilizados para avaliação da toxicidade *in vitro*, dentre estes, destaca-se o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos que é utilizado como método de triagem para toxicidade de substâncias estimando o dano, que podem induzir *in vivo*, nos eritrócitos (SCHREIER et al., 1997; APARICIO, 2005). Este estudo, utilizado na investigação toxicológica preliminar, parte do princípio que a membrana eritrocítica é uma estrutura delicada que pode ser significativamente alterada por interações com drogas (AKI;YAMAMOTO, 1991).

O estudo toxicológico pré-clínico de um produto é uma etapa inicial importante para seu uso seguro na saúde humana e ambiental, pois visa à caracterização dos efeitos tóxicos produzidos a partir de sua administração. Além disso, os estudos toxicológicos pré-clínicos têm o propósito de buscar informações para os pesquisadores clínicos sobre

as doses capazes de provocar efeitos tóxicos em animais de laboratório (ALMEIDA, 2006).

Dentre os métodos para investigação de genotoxicidade *in vivo*, o teste de micronúcleo em camundongos tem sido amplamente empregado e aceito pelas agências reguladoras e comunidade científica (MATEUCA et al., 2006).

Esse teste baseia-se na observação de células que sofrem quebra de cromátides, ou alterações na distribuição de suas cromátides, devido à ação de agentes genotóxicos. Durante a anáfase (fase da divisão celular em que há a segregação dos cromossomos), os fragmentos provenientes das quebras ou cromossomos inteiros, não acompanham a migração para os pólos da célula. Conseqüentemente, na telófase que é a fase em que os cromossomos se descondensam e ocorre formação de um novo invólucro nuclear em torno de cada conjunto de cromossomos, tais fragmentos cromatídicos não são incluídos nos núcleos das células filhas, formando um único ou múltiplos micronúcleos no citoplasma dessas células (COSTA E SILVA; NEPOMUCENO, 2010).

Assim, o MN representa tanto uma alteração cromossômica estrutural como uma alteração numérica (SALVADORI, 2003). Aumento da frequência de MN é indicativo de elevação das taxas de mutações, ou seja, é um parâmetro que representa o aumento da instabilidade genética nas células, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento de carcinomas (CARVALHO et al., 2002).

Durante a maturação das células da linhagem eritrocitária na medula óssea, o núcleo principal é expelido do eritrócito nucleado, enquanto os MN ficam retidos. Estes pequenos núcleos são analisados principalmente em eritrócitos policromáticos (PCEs, eritrócitos jovens).

O ensaio do micronúcleo tem sido amplamente usado para medir mutagenicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O teste *in vivo* é especialmente relevante porque permite obter maiores informações sobre as condições experimentais, tais como o metabolismo, a

farmacocinética e os processos de reparo do DNA. É usado primeiro para avaliar a habilidade da substância teste para induzir danos cromossômicos estruturais ou numéricos, ambos associados com o aparecimento e/ou progressão de tumores (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Os eventos que levam à formação do MN podem ser induzidos pelo estresse oxidativo, exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos, defeitos genéticos nos pontos de checagem do ciclo celular e/ou nos genes de reparo do DNA e também pela deficiência de nutrientes requeridos como co-fatores no metabolismo do DNA e na maquinaria da segregação cromossômica (BONASSI et al., 2007).

Assim, quando um produto em teste aumenta a frequência de eritrócitos micronucleados, há a indicação de que ele interfere na divisão nuclear dos eritroblastos da medula, quebrando cromossomos ou interferindo no fuso, levando ao aparecimento de fragmentos de cromatina ou cromossomos inteiros, que não se incorporaram ao núcleo das células-filhas, chamados micronúcleos (COSTA E SILVA; NEPOMUCENO, 2010).

O teste do micronúcleo é realizado de diversas maneiras, dependendo das perguntas que o investigador quer responder, o organismo de teste, o tipo de célula que é testado, e o modo de ação do produto químico. Os testes de micronúcleos podem ser em ratos ou camundongos, e os tecidos mais usados para avaliação da frequência de micronúcleos são medula óssea e sangue periférico.

Segundo Ribeiro, (2003) os micronúcleos são analisados em eritrócitos policromáticos de medula óssea de camundongos ou ratos. Os resultados positivos obtidos com o teste do micronúcleo fornecem fortes evidências de mutagenicidade/genotoxicidade sistêmica da substância avaliada. Sob condições experimentais apropriadas, os resultados negativos suportam a conclusão de que a substância teste não é clastogênica nem aneugênica.

Os eritrócitos policromáticos de sangue periférico de camundongos também podem ser utilizados no teste, uma vez que células micronucleadas não são eliminadas pelo baço, como ocorre nos ratos (OECD, 1997).

No ensaio do MN em medula óssea de roedores a avaliação do número de células micronucleadas é obtida através da contagem de 2000 PCE (Eritrócitos Policromáticos) e 2000 NCE (Eritrócitos Normocromáticos). Também é feita a avaliação da relação PCE/NCE num total de 500 eritrócitos (HEDDLE, 1981; TITENKO-HOLLAND et al., 1997). Diminuição na proporção de eritrócitos imaturos (PCE) reflete uma diminuição na relação PCE/NCE, dessa forma essa relação é um parâmetro de citotoxicidade ou depressão celular (SHAHRIM et al., 2006). Os MNs são tipicamente arredondados, com diâmetro de 1/20 a 1/5 do diâmetro do eritrócito e correspondem ao que se denomina, em hematologia, de Corpúsculos de Howell-Jolly. A taxa espontânea de eritrócitos policromáticos é baixa e consistente, cerca de três micronúcleos por 1000 células analisadas (RABELLO-GAY, 1991).

Vários estudos demonstram que o sangue periférico pode ser utilizado de forma eficaz na detecção de agentes genotóxicos (ABRAMSSON-ZETTERBERG et al., 1999; ASANAMI et al., 1995; DERTINGER et al., 2006; HAMADA et al., 2001; HAYASHI et al., 1992; HYNES et al., 2002; ROMAGNA; STANIFORTH, 1989; TOROUS et al., 2001, 2003; WAKATA et al., 1998). Assim, o teste do micronúcleo realizado com amostras de sangue periférico se torna mais vantajoso, uma vez que: dispensa o árduo trabalho de coleta de medula óssea dos animais, utiliza uma pequena quantidade de amostra de sangue para realização do ensaio, facilitando a integração do mesmo na rotina de estudos toxicológicos e/ou farmacológicos, sem a necessidade da realização de um ensaio em separado para avaliação de efeitos genotóxicos (ASANAMI et al., 1995; DERTINGER et al., 2006; HAMADA et al., 2001; MACGREGOR et al., 1995; WAKATA et al., 1998), e ainda permite uma contagem das células micronucleadas mais satisfatória, devido à

uniformidade das células do sangue periférico quando comparadas às da medula óssea (COSTA E SILVA; NEPOMUCENO, 2010; HOOFTMAN; RAAT, 1982;).

Embora a toxicidade genética não seja indicativa de carcinogenicidade, esta é frequentemente associada ao aparecimento do câncer, visto que, existe uma correlação positiva entre o aumento da frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e no homem (DE OLIVEIRA AZEVEDO et al., 2003; VALADARES et al., 2005; REZENDE et al., 2006).

O gênero *Zornia* J. F. Gmel. (Fabaceae) possui distribuição pantropical e contém 80 espécies, das quais cerca de 36 ocorrem no Brasil, sendo 15 exclusivas do país (CRUZ, 2009).

Dados da literatura demonstram que espécies do gênero *Zornia* apresentam uma variedade de atividades biológicas, dentre elas, atividade antimicrobiana para a espécie *Z. milneana* (OBI, et al., 2007), moluscicida para *Z. setosa subsp. obvata* (KLOOS, et al., 1987), espasmolítica em íleo de rata (ROJAS et al., 1999), atividade citotóxica (BELCAVELLO, et al., 2012), anticonvulsivante (GREETHA; SHILPA; MURUGAN, 2012) e potencial antioxidante (BRAHMACHARI, et al., 2009) para *Z. diphylla* Pers.

Em 2012 é que começaram a surgir publicações contendo estudo fitoquímico com espécies deste gênero, em particular com a espécie *Zornia diphylla*. Leuner et al. (2012) relataram a presença dos constituintes 7,4'-di-hidroxiisoflavona, 5,7,3'-triidroxiisoflavona, 7-hidroxi-4'-metoxiisoflavona e 7-b-D-Glicosil-5,7-di-hidroxi-4'-metoxi-isoflavona, nas partes aéreas desta espécie. Além deste estudo um artigo publicado por Ren e colaboradores na revista Chinese Pharmaceutical Journal em 2012 relatou a ocorrência dos constituintes 7,4'-dimetoxi-isoflavona, 7-hidroxi-4'metoxiflavona, 7-3'-di-hidroxi-4'metoxi-isoflavona, 7,8-di-hidroxi-4'metoxi-isoflavona e 7,4'di-hidroxiisoflavona como constituintes da espécie *Zornia diphylla*.

Zornia brasiliensis Vog., conhecida popularmente como “urinária”, “urinana” e “carrapicho”, é utilizada pela população como diurético (AGRA et al., 2007).

É pouco relatada na literatura, tanto do ponto de vista dos estudos fitoquímicos como de suas atividades biológicas. Estudos com a espécie relataram a atividade antioxidante e citotóxica em larvas de *Artemia salina* do extrato metanólico de suas partes aéreas (DAVID et al., 2007).

Estudos fitoquímicos recentes com *Zornia brasiliensis* levou ao isolamento de cinco substâncias, que foram identificadas por Espectroscopia no Infravermelho, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C uni e bidimensionais (HMQC, HMBC, COSY e NOESY). A espécie apresentou em sua constituição química três flavonas, 7-metoxiflavona, 5-hidroxi-7-metoxiflavona e 5,7-dimetoxiflavona; uma chalcona a 2',4'-dihidroxichalcona e um pterocarpano o 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano, sendo todas essas substâncias relatadas pela primeira vez no gênero *Zornia*. Neste estudo, foi observado que 7-metoxiflavona possui significativo efeito antinociceptivo (SILVA, 2013).

Por ser uma espécie utilizada pela população com fins medicinais, os ensaios para avaliação da toxicidade decorrente do uso agudo de *Zornia brasiliensis* são imprescindíveis.

Portanto, os objetivos do presente trabalho foi avaliar a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* (EHZB) em eritrócitos de camundongos Swiss; avaliar a toxicidade aguda do EHZB, com base na RE n. 90/04 (ANVISA), em camundongos; e avaliar a genotoxicidade *in vivo* do EHZB em sangue periférico e medula óssea de camundongos.

Material e Métodos

Material botânico

O material botânico utilizado nos experimentos foi o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* (EHZB), fornecido pelos Professores Doutores Marcelo Sobral da Silva e Josean Fachine Tavares, pesquisadores e colaboradores da fitoquímica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB).

Animais

Foram utilizados camundongos albinos *Swiss* (*Mus musculus*) pesando entre 28 e 32 g, com faixa etária próxima de 60 dias, obtidos do biotério Prof. Thomas George (ANVISA/CBiotec/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura de 21 ± 1 °C sob o ciclo dia/noite natural (12h claro e 12h escuro), com água e alimento (tipo pellets de ração da marca Purina®) *ad libitum* durante o experimento e sem uso de qualquer medicação. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB (CEPA), sob a certidão 0409/09.

Avaliação da citotoxicidade do EHZB em eritrócitos de camundongos

Os ensaios para avaliação da atividade hemolítica foram realizados segundo Huang et al. (2009), com algumas modificações. Os eritrócitos foram obtidos de sangue fresco de camundongos *Swiss* coletado do *sinus orbital*. A agulha foi heparinizada

(heparina sódica - Parinex® - Hipolabor) para prevenir coagulação. Para obter a suspensão de eritrócitos, 1 mL de sangue total foi solubilizado em 10 mL de solução tampão fosfato (PBS) e então centrifugado a 3.000 rpm durante 5 minutos. O plasma sobrenadante foi descartado e esse processo repetido mais duas vezes. Os eritrócitos foram finalmente ressuspensos em PBS, obtendo-se então a solução de eritrócitos a 0,5% que foi utilizada para o ensaio de hemólise. O extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* foi solubilizado em 1,5% de cremophor preparado em PBS, no dobro das concentrações desejadas. A cada 100 µL dessas soluções foi adicionado 100 µL da solução de eritrócitos, em quadruplicata. O controle positivo e negativo foram também utilizados, pela incubação de eritrócitos em uma solução de 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich®) em PBS (200 µL) e cremophor (1,5%) em PBS (200 µL), respectivamente. A placa foi mantida sob agitação suave em um agitador por 60 minutos. Após esse período, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante cuidadosamente removido. Após remoção foi adicionado, a cada poço, 200 µL de solução do Triton X-100 (0,1%) e a placa foi cuidadosamente agitada. A quantidade de hemólise causada pela solução do Triton X-100 (0,1%) foi determinada espectrofotometricamente a 415 nm. Determinou-se a percentagem de hemólise para cálculo da CH₅₀ (concentração que produz 50% de hemólise), utilizando a seguinte fórmula:

$$\% Hem = \left(\frac{A_{Tx} - A_{ext}}{A_{Tx}} \right) \times 100$$

Onde:

ATx = Absorbância do poço contendo controle positivo com Triton-X

AEx = Absorbância do poço contendo a concentração do EHVB

Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda do EHVB

No ensaio toxicológico agudo foram utilizados camundongos albinos Swiss, seis machos e seis fêmeas, por grupo (RE 90/2004). Os animais foram submetidos a dose única de 2000 mg/kg, via oral, e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (12% Tween-80 em salina).

Após a administração, os animais foram observados cuidadosamente para detecção de sinais tóxicos de caráter geral nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; após 4 horas; após 24 horas; e diariamente durante 14 dias. Durante estes intervalos de tempo, analisou-se a ocorrência de alterações no sistema nervoso central como hiperatividade, irritabilidade, agressividade, tremores, convulsões, catatonias, analgesia, anestesia, ptose, resposta ao toque diminuído, ambulação, capacidade de limpeza e ato de levantar. Do mesmo modo, foram avaliadas possíveis alterações no sistema nervoso autônomo como diarreia, constipação, defecação, micção, tônus muscular, entre outros. A observação desses parâmetros comportamentais foi realizada seguindo o protocolo descrito por Almeida e colaboradores (1999).

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos após o tratamento com o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis*, os animais foram pesados no início e no final do tratamento e diariamente foram avaliados os consumos de água e ração.

No 14º dia após a administração, os animais tratados e o grupo controle foram eutanasiados por deslocamento cervical, para remoção dos órgãos (coração, fígado, rins, baço e timo) para a determinação de seus índices. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula: Índice = peso do órgão (mg)/peso do animal (g).

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB (CEPA), sob a certidão 0409/09.

Avaliação da genotoxicidade do EHZB

Ensaio do micronúcleo em sangue periférico

Para o ensaio do micronúcleo em sangue periférico, grupos de seis camundongos Swiss machos foram tratados por via oral (gavagem) com a dose de 2000 mg/kg. Um grupo controle positivo (ciclofosfamida - 50 mg/kg – v.o.) e um grupo controle negativo (solução salina e tween 80 à 12%) foram incluídos. Após 24 horas os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg - Thiopentax®, Cristália) e amostras de sangue periférico foram coletadas pelo *sinus orbital*, para confecção das extensões sanguíneas. Após secagem, as lâminas foram coradas com coloração panótica (Newprov®) para posterior análise em microscópio óptico. Para cada animal, três extensões sanguíneas foram preparadas e um mínimo de 2000 eritrócitos contados para determinação da frequência de eritrócitos micronucleados (HAYASHI et al., 2007).

Ensaio de micronúcleo em medula óssea

Para o ensaio do micronúcleo em medula óssea, foram utilizados camundongos albinos Swiss, machos, que foram divididos em três grupos, que receberam tratamento por via oral (gavagem): 1. Controle negativo – tratado apenas com o veículo/solvente; 2. Controle positivo (Ciclofosfamida – 50 mg/kg); 3. EHZB na dose de 2000 mg/kg.

Após 24 h do tratamento os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, para coleta da medula óssea, o mais rapidamente possível. As células da medula foram coletadas dos fêmures, em 3 mL de soro bovino fetal (SBF), mantendo-se a integridade do osso. As epífises foram cortadas para expor o canal medular. Uma agulha

de seringa, previamente preenchida com o SBF, foi inserida na abertura do fêmur, injetando-se o soro de modo a empurrar a medula para dentro de um tubo de centrífuga. Este material foi ressuspenso por várias vezes, com auxílio de uma pipeta *Pasteur*, até a obtenção de uma suspensão homogênea. A suspensão foi centrifugada por 7 minutos, a 1000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspenso em 0,5 mL de SBF de onde foram feitos esfregaços em duas lâminas para cada animal. As preparações foram secas ao ar e após 24 h, para diferenciar eritrócito policromático (PCE) de eritrócito normocromático (NCE), foram coradas com a coloração de Leishmann.

As lâminas foram analisadas em aumento de 1000x (objetiva de imersão). Pelo menos 1.000 PCEs foram analisados por animal. Considerando que a frequência de células micronucleadas entre os NCEs não aumenta do modo como ocorre em PCEs, não é necessário analisar NCEs micronucleados.

O potencial clastogênico e/ou aneugênico do EHZB foi medido pela sua habilidade em aumentar a frequência de eritrócito policromáticos micronucleados (PCE-MN) em animais tratados, quando comparados ao controle negativo (RIBEIRO, 2003).

Análise estatística

Para o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos, foram realizados dois experimentos com quatro replicatas. O valor de CH_{50} (concentração que produzem 50% de hemólise) foi calculado através da expressão dos resultados como uma porcentagem dos controles, e foi determinado graficamente a partir das curvas concentração-resposta por regressão não linear com intervalo de confiança de 95%.

Os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* foram analisados empregando-se o teste análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido do teste de Tukey onde os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.), sendo os resultados

considerados significativos quando $p < 0,05$. Para o ensaio do micronúcleo em sangue periférico foi utilizado *test t student* com pós teste de Wilcoxon onde os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.), sendo os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

Os resultados obtidos nos ensaios de micronúcleo em medula óssea tiveram seus valores expressos em expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e analisados empregando-se o teste *t* não pareado (*Mann-Whitney*) para análise de duas colunas por vez (para não-paramétricas) e os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$

Resultados e Discussão

Avaliação da citotoxicidade do EHZB em eritrócitos de camundongos

A percentagem de hemólise aumentou de maneira dependente de concentração após o tratamento com o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis*. O valor de CH_{50} obtido nesse experimento foi 1.954 (1.840 - 2.074) $\mu\text{g/mL}$ (Gráf. 1).

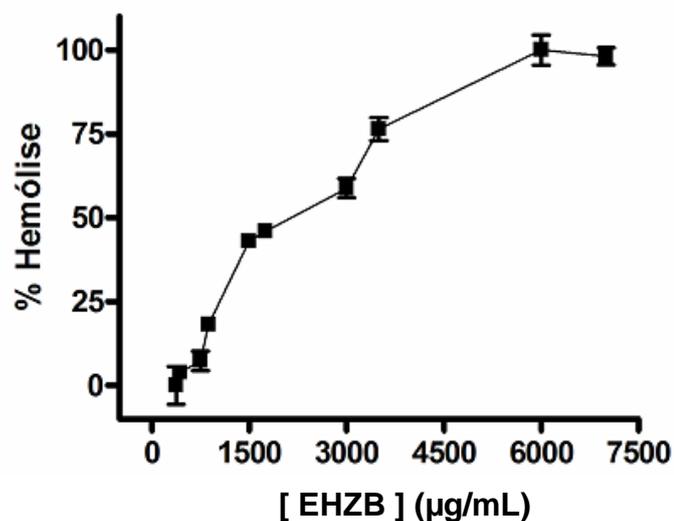


Gráfico 1 – Percentual de hemólise em eritrócitos de camundongos Swiss após tratamento com o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* ($\mu\text{g/mL}$). Cada ponto representa média \pm erro padrão da média de três experimentos em quatro replicatas, com intervalo de confiança de 95 %.

Efeitos citotóxicos de diferentes compostos podem estar relacionados com danos à membrana celular ou alterações em sua permeabilidade (HADNAGY; MARSETZ; IDEL, 2003).

A membrana eritrocitária é uma estrutura delicada que pode ser significativamente alterada por interações com medicamentos (AKI; YAMAMOTO, 1991). A partir deste fato, é possível inferir que a estabilidade mecânica da membrana dos eritrócitos é um indicador para avaliação da citotoxicidade de uma droga, fornecendo por meio de seus resultados indícios para uma possível toxicidade *in vivo* (AKI; YAMAMOTO, 1991; SHARMA; SHARMA, 2001; SILVA, 2007).

Os resultados mostram que, em eritrócitos de camundongos, o extrato provocou hemólise apenas em concentrações consideradas elevadas. Segundo dos Santos Júnior e colaboradores (2010), um produto natural em estudo, para não apresentar atividade hemolítica, deve apresentar CH_{50} maior que $1250 \mu\text{g/mL}$. Portanto, os dados obtidos sugerem que o referido extrato apresenta baixa citotoxicidade frente eritrócitos *in vivo*. Estes resultados fornecem uma perspectiva para estudos farmacológicos posteriores.

Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda do EHVB

Avaliação comportamental, evolução ponderal e consumo de água e ração

Após o tratamento agudo, via oral, com a dose de 2000 mg/kg em camundongos, não foi evidenciada nenhuma morte, nem alterações comportamentais nos animais avaliados.

Na Tabela 1 estão expressos os valores referentes ao consumo de água e ração, avaliados durante os 14 dias de observação, bem como a evolução ponderal dos animais.

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que não houve diferenças significantes no peso dos animais entre os grupos, nem no consumo de água e ração no grupo de fêmeas tratado em relação ao controle. Foi observado apenas redução significativa apenas no consumo de ração do grupo de machos tratados quando comparados ao grupo controle dos machos.

Tabela 1 – Consumo de água e ração e avaliação ponderal dos animais (n = 6) dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Água (mL)	Ração (g)	Peso Início (g)	Peso Final (g)
Controle macho	52,69 ± 4,55	42,13 ± 3,63	30,60 ± 0,45	35,45 ± 1,53
EHZB macho	46,54 ± 3,73	24,85 ± 2,17*	30,17 ± 1,01	33,80 ± 2,37
Controle fêmea	52,85 ± 4,29	42,29 ± 3,94	28,35 ± 0,23	32,03 ± 0,67
EHZB fêmea	60,77 ± 6,25	40,62 ± 4,92	28,38 ± 0,42	32,28 ± 0,28

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. * p < 0,05 comparado com grupo controle (12% Tween 80) por ANOVA seguido de Tukey.

Parâmetros metabólicos, como o consumo de água e alimentos, e avaliação ponderal, devem ser analisados nos estudos pré-clínicos para investigação da toxicidade de uma amostra em estudo sobre o sistema gastrointestinal. Entretanto, alteração em apenas um desses parâmetros não é suficiente para caracterizar toxicidade nesse sistema. Ainda, apesar de haver redução no consumo de alimentos, não houve alteração significativa na evolução ponderal dos animais, os quais apresentaram a recuperação do peso ao final do tratamento.

Avaliação do índice dos órgãos

Após a eutanásia dos animais, os órgãos foram removidos e pesados e analisados macroscopicamente. Não foram observados sinais de hemorragia nem necrose. Nenhuma alteração significativa no índice de coração, fígado, rins, baço e timo foram observadas entre os grupos em estudo, quando comparados ao grupo controle (Tab. 2).

Tabela 2– Efeitos do EHZB sobre o índice dos órgãos dos camundongos dos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Índice Coração	Índice Fígado	Índice Rins	Índice Baço	Índice Timo
Controle macho	3,79 ± 0,12	67,56 ± 32,25	13,58 ± 0,23	5,65 ± 0,85	1,81 ± 0,16
EHZB macho	2,79 ± 0,90	49,68 ± 15,80	9,77 ± 3,17	3,87 ± 1,35	1,45 ± 0,51
Controle fêmea	4,46 ± 0,15	68,93 ± 3,70	13,84 ± 0,96	5,31 ± 0,47	2,59 ± 0,19
EHZB fêmea	4,38 ± 0,12	69,91 ± 3,05	13,18 ± 41,70	5,42 ± 0,23	2,87 ± 0,29

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média.

Avaliação da genotoxicidade do EHZB

Ensaio do micronúcleo em sangue periférico

Para avaliar o possível efeito mutagênico *in vivo* EHZB foi realizado o ensaio do micronúcleo em sangue periférico, cujo resultado está apresentado na Tab. 3. O tratamento dos animais com a dose de 2000 mg/kg não induziu aumento na frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico quando comparados ao grupo controle (12% Tween-80). Esses resultados sugerem que EHZB não apresentou efeito mutagênico no modelo experimental avaliado.

Tabela 3 - Frequência de eritrócitos micronucleados em sangue periférico de camundongos tratados com EHZB e ciclofosfamida.

Grupos	Dose (mg/kg)	Nº de animais	Total de células	Células micronucleadas
Controle	-	6	2000	8,33 ± 0,99
Ciclofosfamida	50 mg/kg	6	2000	17,67 ± 1,39*
EHZB	2000 mg/kg	6	2000	7,83 ± 0,75

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de seis animais analisado pelo test t *Student* seguido do pós teste de Wilcoxon. * $p < 0,05$ comparado ao controle (12% Tween 80).

Ensaio do micronúcleo em medula óssea

Para avaliar o possível efeito genotóxico *in vivo* do EHZB foi realizado o ensaio do micronúcleo em medula óssea, cujo resultado é apresentado abaixo, na Tabela 4. O tratamento dos animais realizado com a dose de 2000 mg/kg do EHZB, escolhida de acordo com os resultados do ensaio de toxicidade aguda, induziu uma aumento na frequência de eritroblastos policromáticos micronucleados (PCE-MN) quando comparados ao grupo controle (12 % de Tween 80), assim como foi verificada diferença entre o grupo tratado e o grupo controle positivo (ciclofosfamida 50 mg/kg).

Tabela 4 – Frequência de eritroblastos policromáticos micronucleados (Mn-PCE) em medula óssea de camundongos tratados com diferentes doses do EHZB e ciclofosfamida.

Grupos	Dose (mg/kg)	Nº de animais	PCE-MN /1000 PCE (em %)	% PCE/NCE
12 % Tween 80	-	5	0,68 ± 0,11	70,17 ± 6,95
Ciclofosfamida	50	3	3,03 ± 0,39 ^a	68,08 ± 8,86
EHZB	2000	5	1,20 ± 0,14 ^{a,b}	84,95 ± 1,87 ^b

Dados apresentados como média ± erro padrão da média de 1000 PCE, sendo os grupos analisados aos pares por teste T de *Student* (*Mann-Whitney*). ^a $p < 0.05$ comparado ao controle (12 % Tween 80) e ^b $p < 0.05$ comparado à ciclofosfamida. ^c Percentual relativo ao número de NCE, contado espontaneamente, até a marca de 1000 PCE.

Em relação ao grupo tratado com EHZB, embora o número de animais por grupo tenha sido pequeno, o aumento na formação de micronúcleos foi significativamente superior do que ao controle sugerindo a formação de micronúcleos, ao contrário do que

foi apresentado à leitura do experimento de número de micronúcleos em sangue periférico.

É importante a informação de que em certos casos, algumas drogas, quando analisadas pelo ensaio de micronúcleo em sangue periférico e em medula óssea, podem apresentar valores distintos na quantificação, no sentido de haver uma maior contagem na medula óssea, o que foi verificado por Wakata e colaboradores (1998).

Analisando-se os índices % PCE/NCE, onde, por meio deste resultado, é possível obter uma informação acerca de possível efeito tóxico sobre as células da medula óssea provocado pela amostra em análise, é possível verificar a concordância com a literatura, onde a ciclofosfamida não apresenta toxicidade para estas células (RIBEIRO et al., 1993), dado confirmado pela ausência de diferença em relação ao grupo Tween 80 12%. Já o EHZB (2000 mg/kg) induziu aumento na porcentagem PCE/NCE. Este dado pode traduzir uma possível indução de proliferação de eritrócitos, que aumentaria o número de PCEs. Estudos posteriores, como a realização de ensaios hematológicos, seriam necessários para a uma melhor avaliação desse efeito.

Pode-se concluir, portanto, que há a necessidade de mais experimentos para confirmar o possível efeito genotóxico do EHZB, como a repetição do experimento de micronúcleo em medula óssea com um tempo maior (48 horas), que tem sido demonstrado na literatura como período ideal para a percepção de um número homogêneo de PCE-MN. Ainda, o uso de técnicas complementares, tais o ensaio de cometa, ajudaria nessa análise.

Pode-se inferir que a padronização da técnica, por este método de coloração das lâminas (Leishmann) precisa ser revisitado, utilizando-se técnicas mais modernas com reduzida capacidade de falsos positivos, tais como a coloração extemporânea por laranja de acridina.

Apesar de alguns trabalhos sugerirem que a medula óssea é a amostra ideal para a detecção de células micronucleadas, muitos outros mostram diversas vantagens da utilização do sangue periférico em espécies onde é comprovado que o baço não sequestra essas células do sangue de camundongos (ASANAMI et al., 1995; DERTINGER et al., 2006; HAMADA et al., 2001; MACGREGOR et al., 1995; WAKATA et al., 1998). Para validar o sangue periférico como amostra para o ensaio do micronúcleo em camundongos no Laboratório de Ensaios Toxicológicos/ UFPB para detecção de efeito mutagênico de produtos vegetais, foram realizados os dois ensaios (sangue periférico e medula óssea) em camundongos com a mesma dose do EHZB. No entanto, foi observado diferença nos resultados, o que demonstra a necessidade da realização de mais testes com outras amostras para que seja possível a análise estatística da possível correlação entre os dois testes.

Conclusões

A partir dos dados obtidos, é possível concluir que o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* mostrou baixa citotoxicidade em eritrócitos de camundongos, bem como baixa toxicidade aguda *in vivo*, após administração oral de 2000 mg/kg.

Além disso, o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* não apresentou atividade genotóxica *in vivo* no ensaio de micronúcleo em sangue periférico, no entanto apresentou atividade genotóxica *in vivo* no ensaio de micronúcleo em medula óssea, efeito este que precisa ser melhor estudado.

Portanto, é possível afirmar que o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* possui baixa toxicidade nos modelos experimentais avaliados,

fornecendo subsídios importantes relacionados à sua segurança para realização de estudos farmacológicos posteriores.

Referências

ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; GRAWE, J.; ZETTERBERG, G. The micronucleus test in rat erythrocytes from bone marrow, spleen and peripheral blood: The response to low doses of ionizing radiation, cyclophosphamide and vincristine determined by flow cytometry. **Mutation Research**, v. 423, n. 1-2, 113-124, 1999.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis. Flow microcalorimetric approaches. **Biochem. Pharmacol.**, v. 41, p. 133-138, 1991.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.

ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Guanabara Koogan, 357p, Rio de Janeiro, 2006.

AMES, B.N.; **Science** 1983, 221, 1256.

APARICIO, R. M. et al. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 1063-1067, 2005.

ASANAMI, S.; SHIMONO, K.; SAWAMOTO, O.; KURISU, K.; AND UEJIMA; M. The suitability of rat peripheral blood in subchronic studies for the micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 347, n. 2, p. 73-78, 1995.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, SEIZE, **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Ed. Ateneu. p. 59-67, 2003.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, P.;

BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.;

HAGMAR, L.; GORDANA, J.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FECECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral

- blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**. 28(3): 625-631, 2007.
- BRAHMACHARI, G.; GHOSH, S.; MONDAL, S.; JASH, S. K.; MANDAL, L. C.; MONDAL, A. Cyclic voltammetric studies with plant extracts of some traditionally used Indian medicinal plants to evaluate their antioxidant potential. *BioChemistry: An Indian Journal*, v. 3, n. 1, p. 32-35, 2009
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação do "Guia para a realização de estudos de toxicidade". *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de março de 2004.
- CAÑIGUERAL, S.; VILA, R. La fitoterapia racional. In: VANACLOCHA, B. V.; FOLCARÁ, S. C. *Fitoterapia. Vademécum de prescripción*. 4.ed. Barcelona: Masson, 2003, p.15-27.
- CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N.; **Fitoterapia**, 71, S58, 2000.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 179-89, 2000.
- CALIXTO J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **J. Ethnofarmacol** 100: 131-134, 2005.
- CARVALHO, M. B.; RAMIREZ, A.; GATTÁS, G. R. F.; GUEDES, A.L.; AMAR, A.; RAPOPORT, A.; NETO, J. C. B.; CURIONI, O. A. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Rev Assoc Méd Brás**. 48(8): 317-322, 2002.
- COSTA E SILVA, A.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, v. 1, p. 167-179, 2010.
- CRUZ, M. A. Pesquisadora do IB descobre três novas espécies de *Zornia*. **Jornal da Unicamp**, 446, p. 9, 2009.
- DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, H. N.; BRANCO, A.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R.; DE QUEIROZ, L. P.; GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of brazilian caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 215-218, 2007.
- DE OLIVEIRA AZEVEDO, M. et al. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília: Ed. Universidade de Brasília, 2003. ISBN 8523006850.
- DETINGER, S. D.; BISHOP, M. E.; MCNAMEE, J. P.; HAYASHI, M.; SUZUKI, T.; ASANO, N.; NAKAJIMA, M.; SAITO, J.; MOORE, M.; TOROUS, D. K.; MACGREGOR, J. T. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: i. intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring. **Toxicological Sciences**, v. 94, n. 1, p. 83-91, 2006.

- DOS SANTOS JÚNIOR, H. M. et al. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of natural medicines**, v. 64, n. 2, p. 231-238, 2010.
- GREETHA, K. M.; SHILPA, S.; MURUGAN, V. Anticonvulsant Activity of the Methanolic Extract of Whole Plant of *Zornia diphylla* (Linn) Pers. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n. 7, p. 3670-3672, 2012.
- HADNAGY, W.; MARSETZ, B.; IDEL, H. Hemolytic activity of crystalline silica – Separated erythrocytes versus whole blood. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 206, n. 2, p. 103-107, 2003.
- HAMADA, S.; SUTOU, S.; MORITA, T. et al. Evaluation of the Rodent Micronucleus Assay by a 28-Day Treatment Protocol: Summary of the 13th Collaborative Study by The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 37, p. 93-110, 2001.
- HAYASHI, M. et al. *In vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. **Mutation Research**, v. 627, p. 10-30, 2007.
- HAYASHI, M.; KODAMA, Y.; AWOGI, T.; SUZUKI, T.; ASITA, A. O.; SUFUNI, T. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C- and cyclophosphamide-treated rats. **Mutation Research**, v. 278, n. 2-3, p. 209-213, 1992.
- HEDDLE, J. A.; SALAMONE, M. F. The micronucleus assay in vivo. In: Proceedings of the international workshop on short - term tests for chemical carcinogens. (STICH, H.; SAN, R. H. C., eds). Springer - Verlag, New York, pp. 243 - 249. 1981.
- HYNES, G. M.; TOROUS, D. K.; TOMETSKO, C. R.; BURLINGSON, B.; GATEHOUSE, D. G. The single laser flow cytometric micronucleus test: A time course study using colchicines and urethane in rat and mouse peripheral blood and acetaldehyde in rat peripheral blood. **Mutagenesis**, v. 17, n. 1, p. 15-23, 2002.
- HOOFTMAN, R. N.; RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research Letters**, n. 104, n. 1-3, p. 147-152, 1981.
- HUANG, W.; XUE, A.; NIU, H.; JIA, Z.; WANG, J. Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Folium eucommiae* and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1147–1154, 2009.
- KLOOS, H.; THIONGO, F. W.; OUMA, J. H.; BUTTERWORTH, A. E. Preliminary evaluation of some wild and cultivated plants for snail control in Machakos District, Kenya. **The Journal of tropical medicine and hygiene** 90(4), 197-204, 1987.
- KISHI, M.; HORIGUCHI, Y.; WATANABE, S.; HAYASHI, M. Validation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine orange supravital staining with urethane. **Mutation Research**, v. 278, p. 205-208, 1992.
- KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. . **Mutation Research**, v. 455, p. 155-166, 2000.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; NOGUEIRA, T.C.M.L.; Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O.; SHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p.247-262, 2003.

LARINI, L. Avaliação toxicológica. In: LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Editora Manole, 1999.

LEUNER, O.; HAVLIK, J.; PROKUDINA, J. H. E.; NOVY, P.; KOKOSKA, L. Distribution of isoflavones and coumestrol in neglected tropical and subtropical legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 92, n. 15, 2012

LOEPER, J.; DESCATOIRE, V.; LETTERON, P.; MOULIS, C.; DEGOTT, C.;

SEMANÁRIO OFICIAL (1994). Município de João Pessoa 1994. Lei Ordinária nº 7630 de 15 de julho de 1994. Semanário Oficial nº 393/1994 publicado no DOU em 19 de julho de 1994.

MACGREGOR, J. T.; TUCKER, J. D.; EASTMOND, D. A.; WYROBEK, A. J. Integration of cytogenetic assays with toxicology studies. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 25, n. 4, p. 328-337, 1995.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDIER, I., KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v.88, p.515-531, 2006.

OBI, C. L.; RAMALIVHANA, J.; SAMIE, A.; IGUMBOR E. O. Prevalence, pathogenesis, antibiotic susceptibility profiles, and in-vitro activity of selected medicinal plants against *Aeromonas* isolates from stool samples of patients in the Venda region of South Africa. **Journal of health, population, and nutrition** (2007), 25(4), 428-35.

OECD (1997). **Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**. OECD Guideline for testing of chemicals No 474.

OLIVEIRA, M. J. R.; SIMÕES, M. J. S.; SASSI, C. R. R. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 8, n. 2, p. 39-41, 2006.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. Mutagênese Ambiental. Canoas: ULBRA, 2003. cap. 8, p.201-223.

SCHREIER, H. et al. Physicochemical properties and *in vitro* toxicity of cationic liposome cDNA complexes. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 72, p. 215-223, 1997.

SILVA, A. D. S. Flavonoides de *Zornia brasiliensis* e atividade antinociceptiva da 7-metoxiflavona. João Pessoa: UFPB, 2013. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

SILVA, S.A.S. et al. Estudo da atividade mutagênica das plantas, *Euphorbia milii* Des Moulins & *Ricinus communis* L. através do teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2^a, p. 418-422, 2009b.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, p. 618-626, 2008.

SHARMA, P. R. et al. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, p. 160–168, 2009.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese – Métodos e critérios de avaliação. Sociedade Brasileira de Genética, pp.83-85, 1991.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 11, p. 57-69, 2001.

REN, F. Z.; GAO, Y. Q.; CHENG, X. X.; LI, L. H.; CHEN, S. H.; ZHANG, Y. L. Study on Chemical Constituents of *Zornia diphylla*. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v. 03, 2012.

REZENDE, O. S. J.; PALHAES, L. B.; CUNHA, L. C. **Intoxicações por plantas tóxicas notificadas no CIT - Centro de Informação Toxicológica de Goiás no período de 2001 a 2005**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2006. 72p .

RIBEIRO, L. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L.; SALVADORI, D., et al (Ed.). **Mutagênese Ambiental**. . 1a. ed. Canoas: Editora da ULBRA, 2003.

ROJAS, A.; BAH, M.; ROJAS J.I.; SERRANO, V.; PACHECO, S.. Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Quéretaro (México) for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytomedicine**. 1999 Nov;6(5):367-71.

ROMAGNA, F.; STANIFORTH, C. D. The automated bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, v. 213, p. 91-104, 1989

TITENKO - HOLLAND, N. et al. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion - exposed workers. **Mutat Res**. 338:85 – 95, 1997.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, p. 464-471, 2008.

WAKATA, A.; MIYAMAE, Y.; SATO, S.; SUZUKI, T.; MORITA, T.; ASANO, N.; AWOGI, T.; KONDO, K.; HAYASHI, M. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: Summary of the 9th collaborative study by SGM/T/JEMS.MMS. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 32, n. 1, p. 84-100, 1998.

WHO, 199. **Monographs on selected medicinal plants**. Vol. 1.

