

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DE
TANINOS DE**

***Mimosa arenosa* (Willd.) Poir. (MIMOSACEAE)**

GREGÓRIO FERNANDES GONÇALVES

JOÃO PESSOA - PB

2011

GREGÓRIO FERNANDES GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DE
TANINOS DE**

***Mimosa arenosa* (Willd.) Poir. (MIMOSACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

ORIENTADORAS: Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa

Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

JOÃO PESSOA - PB

2011

GREGÓRIO FERNANDES GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DE
TANINOS DE**

***Mimosa arenosa* (Willd.) Poir. (MIMOSACEAE)**

Banca Examinadora

Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa
Orientadora

Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Orientadora II

Profa. Dra. Tatiane Santi Gadelha
Examinadora externa

Profa. Dra. Edeltrudes Oliveira Lima
Examinadora interna

À minha linda família e esposa.

“Não há saber mais nem saber menos, há saberes diferentes.”

Paulo Freire

Agradeço a DEUS por ter me dado forças para alcançar e realizar mais essa caminhada em minha vida.

Agradeço a todos os meus familiares, em especial a meus pais e irmãos pelo apoio e pelo incentivo.

Agradeço a minha esposa Juliana Tavares Sousa Gonçalves por ter me agüentado neste últimos dois meses, mais também pelo amor, carinho, incentivo e companheirismo, te amo.

Agradeço as minhas orientadoras, Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa e Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, pela orientação, ensinamentos, amizade, confiança, paciência e dedicação, em fazer com que este trabalho pudesse ser realizado.

Agradeço a professora Dra. Maria do Socorro Vieira por ter cedido gentilmente o material utilizado na realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos pelos ensinamentos e pelo acolhimento.

Aos meus amigos de mestrado, pelo acolhimento e por todos os bons momentos que podemos desfrutar juntos.

Ao meu amigo Prof^o. Ideltônio Barbosa Feitosa, por todas as dicas, orientações, esclarecimentos e empregos compartilhados.

Aos professores Tatiane Santi-Gadelha e Carlos Alberto de Almeida Gadelha pela receptividade e também por fazer do BIOGER um belo ambiente de trabalho.

Aos meus amigos da turma do “resto” Antonio Carlos, Rafael Batista, Arnaldo Vieira e Eugênio Pachelli pelo momentos de descontração e amizade.

A todos os que compõem o Laboratório de Bioquímica, Genética e Radiobiologia (BIOGER), Joana Leite, Maria Clerya, Maria Emilia, Rodrigo, Vinicius, Sâmia, Arthur, Gustavo, Elba, Luciana, Amanda e todos que chegaram recentemente pelos ótimos momentos de descontração e companheirismo.

A Viviane Araújo pela companhia, debates, discussões e ensinamentos que compartilhamos, mas principalmente pela amizade.

A seu Bosco e dona Severina por todos os bons momentos compartilhados e pelos inúmeros e bons cafés preparados desde sempre.

As minhas amigas, Vivyanne Falção, Catiana Oliveira, Suellen Maria, Isis Carla pela companhia e pelas boas e agradáveis conversas e brincadeiras.

Aos meus grandes amigos e irmãos Steno Lacerda e Charlane Kelly por todo o companheirismo, amizade, e incentivos dados durante todos os anos que estamos juntos.

Ao meu grande amigo e irmão Tiago Marques pela amizade e acima de tudo, por tudo que ele e sua família fizeram e fazem por mim nestes dez anos de convivência.

Ao meu grande amigo e primo Klersson Fernandes, pela amizade e por estar presente sempre nos bons e maus momentos.

Em fim, gostaria de agradecer à todos que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho.

RESUMO

Os produtos naturais representam uma rica fonte de compostos biologicamente ativos e são um exemplo de diversidade molecular, com reconhecido potencial na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos. O gênero *Mimosa* se distribui nos mais variados ambientes e nos diversos tipos de vegetação das regiões tropicais. No nordeste do Brasil pode ser encontrado nos estados da Bahia, Pernambuco e Paraíba. Muitas espécies de *Mimosa* são economicamente importantes, no entanto, poucos estudos biológicos de plantas desse gênero foram realizados até o momento, sendo comprovadas atividade antimicrobiana e alelopática. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades citotóxica e genotóxica de taninos da espécie *Mimosa arenosa* (Willd.) Poir. A concentração inibitória mínima (CIM) obtida para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 foi 1000µg, para *Bacillus subtilis* ATCC 0516 e *Escherichia coli* ATCC 2536 a CIM foi de 500µg, já para as linhagens de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 e *Escherichia coli* ATCC 10536 a quantidade necessária de taninos para inibir o crescimento dessas bactérias foi de 250µg. A atividade antibacteriana exercida pelos taninos de *M. arenosa* frente a todas as linhagens testadas foi bacteriostática. Na avaliação de citotoxicidade, em nenhuma das concentrações testadas, os taninos de *M. arenosa* causaram hemólise significativa dos eritrócitos em nenhum dos grupos sanguíneos testados. Entretanto, os taninos não conseguiram proteger as células eritrocitárias quando expostas a soluções hipotônicas de sal. Os taninos não apresentaram efeito oxidante em nenhuma das concentrações testadas, entretanto estes conseguiram reduzir a oxidação da hemoglobina quando expostas a um agente oxidante. Os taninos não foram capazes de induzir mutações, porém apresentaram efeito antimutagênico em linhagens de *S. typhimurium* e também não promoveram dano cromossômico estrutural e/ou numérico em eritrócitos de camundongo “in vivo”.

Palavras-chave: *Mimosa arenosa*, hemólise, estresse oxidativo, micronúcleo.

ABSTRACT

Natural products represent a rich source of biologically active compounds and are an example of molecular diversity, with recognized potential in the discovery and development of new drugs. The genus *Mimosa* is distributed in various environments and various types of vegetation in tropical regions. In northeast Brazil can be found in the state of Bahia, Pernambuco and Paraíba. Many species of *Mimosa* are economically important, however, few biological studies of plants of this kind were carried out so far, with proven antibacterial and allelopathic activity. Therefore, the objective of this study was to evaluate the cytotoxic and genotoxic activities of the species *M. arenosa* (Willd.) Poir. tannins. The minimum inhibitory concentration (MIC) obtained for *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 was 1000µg, for *Bacillus subtilis* ATCC 0516 and *Escherichia coli* ATCC 2536 MIC was 500µg, as to the strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25925 and *Escherichia coli* ATCC 10536 the amount of tannin required to inhibit the growth of these bacteria was 250µg. The antibacterial activity exerted by *Mimosa arenosa* tannins against all strains tested was bacteriostatic. In the evaluation of cytotoxicity in any of the tested concentrations of tannins *M. arenosa* no caused significant hemolysis of red cells in any of the blood groups tested. However, the tannins were unable to protect the erythrocyte cells when exposed to hypotonic salt solutions. The tannins were not affected in any of the oxidant concentrations tested but they have reduced the oxidation of hemoglobin when exposed to an oxidizing agent. The tannins were not able to induce mutations but showed antimutagenic effect in strains of *S. typhimurium*. Tannins did not induce structural chromosomal damage and/or numerical in erythrocytes of mouse.

Keywords: *Mimosa arenosa*, hemolysis, oxidative stress, micronucleus assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Mimosa arenosa</i> (Willd.) Poir. MIMOSACEAE.	5
Figura 2 - A	Teste de micronúcleo (Controle Negativo).	33
Figura 2 - B	Teste de micronúcleo (Taninos na concentração de 1000 mg/Kg).	33
Figura 2 - C	Teste de micronúcleo (Taninos na concentração de 2000 mg/Kg).	34
Figura 2 - D	Teste de micronúcleo (Controle Positivo).	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Quantidade de proteínas precipitadas pelos taninos de <i>M. arenosa</i> .	24
Gráfico 2	Efeito hemolítico de taninos de <i>Mimosa arenosa</i> em eritrócitos humanos tipo A (n = 3).	26
Gráfico 3	Efeito hemolítico de taninos de <i>M. arenosa</i> em eritrócitos humanos tipo B (n = 3).	27
Gráfico 4	Efeito hemolítico de taninos de <i>M. arenosa</i> em eritrócitos humanos tipo O (n = 3).	27
Gráfico 5	Efeito dos taninos de <i>M. arenosa</i> sobre eritrócitos humanos tipo O (n = 3). Anova “two-way”, seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$ (controle x taninos).	28
Gráfico 6	Efeito dos taninos de <i>M. arenosa</i> sobre eritrócitos humanos tipo A (n = 3). Anova “two-way”, seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$ (controle x taninos).	28
Gráfico 7	Efeito dos taninos de <i>M. arenosa</i> sobre eritrócitos humanos tipo B (n = 3). Anova “two-way”, seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$ (controle x taninos).	28
Gráfico 8	Efeito de taninos de <i>M. arenosa</i> na formação de MetHB em eritrócitos humanos (n=3). As colunas e barras representam a média \pm e.p.m. Teste “t”, $p < 0,05$ (PH x taninos).	29
Gráfico 9	Efeito de taninos de <i>Mimosa arenosa</i> na proteção da formação de MetHB em eritrócitos humanos (n=3). As colunas e barras representam a média \pm e.p.m. Teste “t”, $p < 0,05$ (PH x taninos).	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantidade de BSA precipitada pelos taninos de <i>M. arenosa</i> .	24
Tabela 2	Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos taninos de <i>M. arenosa</i> .	25
Tabela 3	Porcentagem de hemólise promovida pelos taninos (%) de <i>M. arenosa</i> em eritrócitos humanos.	26
Tabela 4	Quantidade de metahemoglobina (metHb) formada na presença e na ausência dos taninos de <i>M. arenosa</i> . Valores expressos como média \pm e.p.m.	29
Tabela 5	Quantidade de metahemoglobina (metHb) formada na presença e na ausência dos taninos de <i>M. arenosa</i> . Valores expressos como média \pm e.p.m.	30
Tabela 6	Efeito mutagênico dos taninos de <i>M. arenosa</i> frente às linhagens de <i>S. thiphymurium</i> TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102.	31
Tabela 7	Efeito anti-mutagênico dos taninos de <i>M. arenosa</i> frente às linhagens de <i>S. thiphymurium</i> TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102.	32
Tabela 8	Freqüência de eritrócitos micronucleados em eritrócitos de sangue periférico de camundongos Swiss machos e fêmeas.	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Produtos Naturais	1
1.2	Gênero Mimosa	3
1.2.1	<i>Mimosa arenosa</i> (Willd.)Poir.	5
1.3	Taninos	6
1.4	Citotoxicidade	8
1.5	Genotoxicidade	13
2	OBJETIVOS	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	Material botânico	16
3.2	Extração dos taninos de <i>Mimosa arenosa</i>	16
3.3	Preparação da amostra de taninos de <i>Mimosa arenosa</i>	16
3.4	Avaliação da amostra de taninos das cascas do caule de <i>Mimosa arenosa</i>	16
3.5	Linhagens bacterianas	17
3.6	Meios de cultura	18
3.7	Animais experimentais	18
3.8	Eritrócitos humanos	19
3.9	Avaliação do potencial citotóxico dos taninos de <i>Mimosa arenosa</i> frente a bactérias de importância clínica	19
3.10	Caracterização da atividade antibacteriana	19
3.11	Avaliação do potencial citotóxico dos taninos de <i>Mimosa arenosa</i> em eritrócitos humanos	20
3.12	Avaliação do efeito dos taninos de <i>Mimosa arenosa</i> sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos humanos	20
3.13	Avaliação do potencial oxidante e anti-oxidante dos taninos de <i>Mimosa arenosa</i> em eritrócitos humanos	21

3.14	Investigação do potencial mutagênico e anti-mutagênico dos taninos de <i>Mimosa arenosa</i> em células bacterianas através do teste de Ames	22
3.15	Investigação do potencial clastogênico e aneugênico dos taninos de <i>Mimosa arenosa</i> em eritrócitos de roedores <i>in vivo</i>	22
4	RESULTADOS	24
4.1	Avaliação da amostra de taninos das cascas do caule de <i>Mimosa arenosa</i>	24
4.2	Avaliação do efeito antibacteriano dos taninos de <i>Mimosa arenosa</i> frente a bactérias de importância clínica	25
4.3	Caracterização da atividade antibacteriana dos taninos de <i>Mimosa arenosa</i>	25
4.4	Avaliação do efeito hemolítico dos taninos de <i>Mimosa arenosa</i> frente a eritrócitos humanos	25
4.5	Avaliação do efeito dos taninos de <i>Mimosa arenosa</i> sobre a fragilidade osmótica em eritrócitos	27
4.6	Avaliação do potencial oxidante de taninos de <i>Mimosa arenosa</i> em eritrócitos humanos	29
4.7	Avaliação do potencial anti-oxidante de taninos de <i>Mimosa arenosa</i> em eritrócitos humanos	30
4.8	Investigação do potencial mutagênico dos taninos de <i>Mimosa arenosa</i> em células bacterianas através do Teste de Ames	31

4.9	Investigação do potencial anti-mutagênico dos taninos de <i>M. arenosa</i> em células bacterianas através do Teste de Ames	31
4.10	Investigação do potencial clastogênico e aneugênico dos taninos de <i>M. arenosa</i> através do teste do micronúcleo em eritrócitos de roedores <i>in vivo</i>	32
5	DISCUSSÃO	35
6	CONCLUSÕES	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

Os produtos naturais têm sido a fonte para a maioria dos ingredientes ativos nos medicamentos, cerca de 80% dos medicamentos produzidos até 1996 foram diretamente derivados de compostos naturais ou foram desenvolvidos a partir de um produto natural (SNEADER, 1996). Estes representam uma rica fonte de compostos biologicamente ativos e são um exemplo de diversidade molecular, com reconhecido potencial na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (CRAGG, 1997; NEWMAN, 2000).

Os produtos naturais biologicamente ativos podem ser de origem vegetal, animal e mineral, embora haja um predomínio de recursos vegetais (CAMPOS, 1967). Pesquisas mais recentes tem mostrado que produtos naturais isolados de organismos marinhos também possuem um grande potencial como fonte de novas drogas (FAULKNER, 2000).

O estudo dos produtos naturais é importante para detectar moléculas bioativas, uma vez que, sua diversidade estrutural é maior que a fornecida pela maioria das estratégias combinatórias baseadas em compostos heterocíclicos. Além disso, a maioria dos produtos naturais são moléculas relativamente pequenas (<1000 Da) que apresentam propriedades farmacocinéticas similares às drogas sintéticas, ou seja, podem ser absorvidas, metabolizadas e excretadas pelo organismo (HARVEY, 1995).

Embora tenham ocorrido mudanças nas estratégias de estudo dos produtos naturais tais como: seleção e coleta das amostras, técnicas de isolamento, elucidação das estruturas, avaliação biológica, semi-síntese, biossíntese, assim como na otimização do processamento (MONKS, 1997; VERRAL, 1996) a taxa de descoberta de novos produtos naturais tem diminuído (MISHRA, 2008). Alguns fatores que têm contribuído para este declínio são: I – dificuldade em avaliar as propriedades biológicas de produtos naturais por triagem de alto-rendimento, II - alto custo e métodos convencionais trabalhosos para identificar os compostos ativos em produtos naturais e III - falta de padronização e controle de qualidade para produtos naturais comercializados (KOEHN, 2005; LI, 2009).

Contudo, tem havido um recente ressurgimento no estudo de produtos naturais, especialmente por parte da indústria de suplementos dietéticos. A indústria farmacêutica começou a revitalizar programas de triagem de produtos naturais como fonte de novos compostos medicinais para identificar novos agentes terapêuticos (GHOSH; PLAYFORD, 2003), mas as pesquisas acadêmicas continuam sendo uma forte líder no setor de produtos naturais, especialmente com respeito a entidades químicas recém-descobertas (MCCURDY, 2005).

Produtos naturais bioativos frequentemente ocorrem como parte de uma família de moléculas relacionadas de forma que é possível isolar várias moléculas homólogas e obter informações de estrutura e de atividade (HARVEY, 1995). O uso de derivados do metabolismo secundário de plantas como drogas tem vindo a nós como um legado da medicina popular (NAGLE, 2004; NEWMAN, 2004), de forma que os estudos etnofarmacológicos e etnobotânicos tem identificado muitas espécies de plantas que demonstram atividades biológicas (DIEHL *et al.*, 2004; CANALES *et al.*, 2005).

Além da rica diversidade de estruturas químicas e atividades biológicas de metabólitos secundários naturais, o grande interesse em pesquisar produtos naturais pode ser atribuído a fatores como: necessidades terapêuticas não atendidas; utilização de produtos naturais bioativos como sondas bioquímicas e moleculares; desenvolvimento de técnicas novas e mais sensíveis para detectar produtos naturais biologicamente ativos, e/ou avanços para atender a demanda de fornecimento de produtos naturais complexos. Esse é um desafio que exige um trabalho de pesquisa multidisciplinar, que alia conhecimentos das áreas de química de produtos naturais, biologia celular e molecular, química analítica e sintética, bioquímica e farmacologia para explicar a grande diversidade de estruturas químicas e atividades biológicas (CLARK, 1996).

Um grande número destes produtos chega até nós a partir de estudos de remédios tradicionalmente empregados por várias culturas (HOLMSTEDT; BRUHN, 1983; ALVES; ROSA, 2005). Tais propriedades propiciaram o desenvolvimento de vários medicamentos, sejam estes obtidos por síntese, a partir do metabólito protótipo, por isolamento ou, algumas vezes, por biomonitoramento (SIMÕES *et al.*, 2003). O uso da medicina popular

possibilitou a descoberta de drogas modernas e importantes tais como: a digitoxina, a reserpina, a tubocurarina, a efedrina entre outras (ANYINAM, 1995).

A história da descoberta de drogas a partir de produtos naturais tem sido extraordinariamente bem sucedida (GULLO; HUGHES, 2005). Segundo Wilson (1995), cerca de 40% de todas as drogas prescritas são substâncias originalmente extraídas de plantas, animais, fungos e microorganismos. Nos últimos 25 anos, cerca de 30% dos novos fármacos aprovados são produtos naturais ou derivados destes e no que se refere aos fármacos anticancerígenos, esse número sobe para 42% (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Na área de doenças infecciosas, 70% das novas drogas se originaram de fontes naturais. Elas incluem numerosos antibacterianos derivados de estruturas β -lactâmicas ou macrolídeas e agentes anti-tumorais tais como: adramicina, taxol e vimblastina. Os agentes que diminuem o colesterol, como as estatinas, são as drogas mais vendidas atualmente, e são derivadas dos metabólitos compactina e mevinolina oriundos de fungos. A descoberta da ciclosporina revolucionou a terapia imunossupressora para o transplante de órgãos, e descobertas posteriores de produtos naturais levaram a drogas imunossupressoras adicionais como a rapamicina (GULLO; HUGHES, 2005).

Sendo assim as plantas representam uma grande fonte de produtos naturais biologicamente ativos, com uma grande diversidade química, o que resulta em diversas propriedades biológicas. Entretanto, pode-se constatar que apesar de possuírem várias substâncias de importância farmacológica, poucas espécies foram realmente estudadas. Estima-se que de cerca de 250.000 espécies de plantas no mundo, apenas 10% foram avaliadas em busca de alguma atividade biológica (BALUNAS; KINGHORN, 2005). Sendo um país de dimensões continentais, o Brasil tem um potencial enorme a ser explorado para a obtenção de produtos naturais, farmacêuticos, cosméticos, alimentícios, entre outros (FERRO *et al.*, 2006).

1.2 Gênero Mimosa

A primeira referência ao gênero *Mimosa* foi feita por Linnaeus (1753) no *Species Plantarum*. O gênero *Mimosa* L. (Fabaceae-Mimosoideae) compreende cerca de 530 espécies, sendo 461 nativas das Américas, 31 de Madagascar (maioria endêmica), 4 nativas do leste Africano e 4 do sudoeste da Ásia (BARNEBY, 1991; DU PUY *et al.*, 2002; SIMON, 2009).

Esse gênero se distribui nos mais variados ambientes e nos diversos tipos de vegetação das regiões tropicais, se concentram em regiões subtropicais da América, apresentando como importantes centros de diversidade o Brasil, o México, o Paraguai, o Uruguai e a Argentina (BARNEBY, 1991).

O Brasil concentra o maior número de espécies desse gênero, cerca de 340, das quais 189 estão no Cerrado e alguns representantes podem ser encontrados na Caatinga (LEWIS, 1987; BARNEBY, 1991; SIMON; PROENÇA, 2000; MENDONÇA *et al.*, 2008; DE QUEIROZ, 2009).

Para o Nordeste do Brasil merece destaque o trabalho de Barneby (1985), que descreveu a ocorrência do gênero no estado da Bahia onde estabeleceu 15 novas espécies, sete variedades e nove combinações novas. Ducke (1953) incluiu o gênero *Mimosa* entre as leguminosas que ocorrem nos estados de Pernambuco e Paraíba. Inicialmente foram registradas 65 espécies na Bahia e posteriormente foram estudadas as espécies do Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia (LEWIS, 1987 e 1995). Recentemente, Lewis (2006) registrou 104 táxons de *Mimosa*, na lista de plantas do Nordeste do Brasil.

Muitas espécies de *Mimosa* são economicamente importantes, tais como, *M. scabrella* Benth., uma espécie de árvore pioneira na floresta araucária do sudeste do Brasil que é cultivada para sombrear plantações de café, sua madeira é usada na construção e carpintaria assim como fonte de celulose e como combustível (BARNEBY, 1991; CARAMORI *et al.*, 1996). Uma outra espécie, a *M. tenuiflora* (Wild) Poir. é utilizada na indústria de cosméticos e na tradicional medicina popular (CAMARGO-RICALDE *et al.*, 2001; LORENZI, 2000a; RIVERA-ARCE *et al.*, 2007). Muitas espécies de *Mimosa*, devido a sua capacidade e habilidade em fixar nitrogênio, são também usadas para enriquecer o solo e recuperar terras degradadas (CAMARGO-RICALDE, 2005; REIS JR, 2010).

Poucos estudos biológicos de plantas do gênero *Mimosa* foram realizados até o momento, sendo comprovados apenas sua atividade alelopática (PIÑA-RODRIGUES, 2001) e antimicrobiana (MACEDO-COSTA, 2009; PADILHA, 2010). Contudo, algumas espécies tem sido utilizadas na medicina popular para o tratamento de bronquite, tosse, febre, dor de cabeça, úlceras e em cultos indígenas e afro-brasileiras como enteógeno (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007; AGRA *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2008).

1.2.1 *Mimosa arenosa* (Willd.)Poir.

Mimosa arenosa é uma planta que pertence à família Mimosaceae e possui vários sinônimos, entre eles: *Acacia arenosa* Willd.; *Acacia malacocentra* Mart.; *Mimosa caudero* L.; *Mimosa leiocarpa* DC.; *Mimosa malacocentra* (Mart.) Benth. e *Mimosa xantholasia* Benth. É conhecida popularmente como jurema vermelha (Figura 1).

Pode ser reconhecida pelos ramos tomentosos, foliólulos membranáceos, flores curtamente pediceladas e frutos glabros. Apresenta afinidades com *M. ophthalmocentra*, com a qual compartilha o hábito arbustivo, a presença de acúleos, as inflorescências espiciformes, o mesmo número de estames, os filetes brancos e o fruto plano-compresso (SILVA, 2008).



Figura 1 - *Mimosa arenosa*

Fonte:<http://herbaria.plants.ox.ac.uk/VFH/image/index.php?item=4914&photo=4546>).

1.3 Taninos

Taninos são biopolímeros polifenólicos abundantes em plantas, obtidos da madeira e/ou casca de muitas folhosas e da casca de algumas coníferas (GONÇALVES, 2001), constituindo de 10-25% da massa foliar das espécies lenhosas (KRAUS, 2003a). Também podem ser encontrados na casca, caule, floema, sementes, frutos, vagens, e folhas de plantas dicotiledoneas (ZUCKER, 1983; HEMINGWAY, 1989).

Os taninos são fenóis comuns considerados atóxicos em quantidades e condições normais, com exceção dos fenóis poliméricos. Possuem a habilidade de complexar e precipitar proteínas (SALUNKHE *et al.*, 1990) e outras macromoléculas em soluções aquosas (SALMINEN, 2011). Vários trabalhos demonstraram que a capacidade de precipitar proteínas e sua reatividade química ocorrem devido as características estruturais que os taninos apresentam (KUMAR; HORIGOME, 1986; PORTER; WOODRUFFE, 1984; HAGERMAN *et al.*, 1998; KRAUS *et al.*, 2003a).

Além disso, os taninos são conhecidos por se ligarem a metais e formarem complexos com o ferro (III) e sais, e têm massas moleculares entre 500 a 3000 g . mol⁻¹(SALMINEN, 2011), possuem habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcalóides (MELLO, 2011). A massa molecular e as estruturas químicas dos taninos condensados são fatores primários que determinam a influência desses grupos na nutrição animal e na produção de CH₄ em ruminantes ((SPENCER *et al.*, 1988; OSBORNE; MCNEILL, 2001; LIANG; KHAMSEEKHIEW, 2006).

Os taninos produzidos pelas plantas são divididos em duas grandes classes: taninos condensados e taninos hidrolisáveis. Taninos hidrolisáveis são caracterizados com base em ésteres fenólicos de um açúcar central, enquanto os condensados compreendem ligações de unidades flavonóides carbono-carbono (KRAUS, 2004). As gimnospermas sintetizam apenas taninos condensados, mas as angiospermas dicotiledôneas podem produzir tanto taninos condensados quanto hidrolisáveis. Algumas famílias de dicotiledôneas ricas em taninos são as leguminosae, anacardiaceae, combretaceae, rhizoporaceae, mirtacea, polinaceae (VALENTIM, 2006).

Celzard (2011), considera que apesar da abundância de taninos condensados no citoplasma das células vegetais, a maior concentração de tais compostos é geralmente encontrada dentro de cascas de árvores, tais como, os pinheiros, carvalhos e mimosas.

Os taninos podem ser extraídos dos vegetais por diferentes solventes tais como água, acetona, etanol ou por soluções aquosas com alguns sais como sulfito de sódio, carbonato de sódio, entre outros, porém não é economicamente viável a utilização de reagentes no processo de extração, visto que a extração em água é bastante eficiente e de baixo custo (MARINHO, 2004).

Os taninos condensados por possuírem grande poder de ligação podem condensar com o formaldeído, produzindo um polímero de estrutura tridimensional, reticulado e com alto peso molecular chamado de resina (GONÇALVES, 2001). Eles também podem substituir o fenol em uma série de formulações, tais como as de espumas rígidas atualmente comercializadas para diversos fins: embalagem, transporte, amortecimento, isolamento, uso na construção de materiais, automóveis, aviões e estruturas marítimas, assim como em aplicações eletrônicas (TONDI, 2009).

Taninos são produzidos comercialmente em grande quantidade e utilizados nas indústrias de couro, química e de alimentos. Eles são estáveis, baratos, abundante e com propriedades constantes, que são raras qualidades em um recurso natural (CELZARD, 2011). Várias atividades biológicas e farmacológicas relacionadas aos efeitos dos taninos e a sua variedade de estruturas químicas, incluindo os de pequeno tamanho molecular, foram encontradas. Apesar de sua pequena molécula, o tanino principal do chá verde exibe atividades de ligação com proteínas e outras substâncias e atividade antioxidante significativa (OKUDA, 1997; YOSHIDA, 2009) além de efeitos antitumorais (YOSHIZAWA *et al.*, 1987; YOSHIZAWA *et al.*, 1992).

Os taninos são bons inibidores enzimáticos, usados como antídotos contra alcalóides e metais pesados, anulam a absorção de substâncias irritantes, apresentam ações terapêuticas, como hemostático no sangramento nasal e uterino, também diminuem as secreções e infecções, tem excelente atividade como cicatrizante e são utilizados em lesões tais como: queimaduras

e fermentos (MITIDIERO, 2002). Apresentam ainda propriedades anti-inflamatória, anti-fúngica e antioxidante (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

Outras pesquisas sobre atividade biológica dos taninos evidenciaram importante ação contra determinados microrganismos (SCALBERT, 1991; TOLEDO, 2002; LOPES *et al.* 2003; SANTOS; MELLO, 2004; PEREIRA, 2010), como agentes carcinogênicos e causadores de toxicidade hepática (CHUNG, 1998). Segundo Loguercio *et al.* (2005) existe: I) os taninos inibem enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexam com os substratos dessas enzimas; II) os taninos agem sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo, III) se complexam com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano.

Os potenciais anticarcinogênicos e antimutagênico dos taninos podem estar relacionados a suas propriedades antioxidantes importantes na prevenção de danos oxidativos celulares, incluindo a peroxidação lipídica (HASLAM, 1998). Demirezer *et al.* (2001) e Velázquez *et al.* (2003) demonstraram a atividade antioxidante de extratos e de taninos isolados do vinho tinto. Deve-se ter cuidado com o uso de taninos, pois estes podem provocar irritação da mucosa gástrica e alguns possuem efeito carcinogênico (MITIDIERO, 2002).

1.4 Citotoxicidade

Além de pequenas moléculas da química medicinal, os produtos naturais ainda são as principais fontes inovadoras de agentes terapêuticos para várias patologias, incluindo doenças infecciosas (CLARDY; WALSH, 2004). As infecções bacterianas são responsáveis por uma grande proporção dos problemas de saúde, especialmente nos países em desenvolvimento (DAVIS, 1994), devido à indisponibilidade relativa de medicamentos e à generalizada resistência às drogas (OKEKE *et al.*, 2005).

As bactérias apresentam a capacidade genética de adquirir e transmitir resistência às drogas que são utilizadas como agentes terapêuticos. Essa resistência tem aumentado devido ao uso indiscriminado de agentes antimicrobianos comerciais comumente utilizados no tratamento das doenças

infeciosas. A ocorrência de pacientes imunodeprimidos assim como o surgimento de novas linhagens bacterianas com múltipla resistência pode levar ao aparecimento de novas infecções hospitalares que resultem em alta mortalidade (COHEN, 1992).

Dessa forma, com o surgimento contínuo de novas doenças e o desenvolvimento da resistência a drogas em bactérias, vírus e células cancerosas, há uma necessidade contínua para o desenvolvimento de novos fármacos com novos mecanismos de ação (FLORENCE, 2008). As estratégias para minimizar este problema envolvem a utilização racional ou o controle na utilização dos antibióticos, um melhor entendimento do mecanismo genético de resistência, assim como a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos de origem natural ou sintética (NASCIMENTO *et al.*, 2000; ANVISA, 2010).

Essa situação tem levado os pesquisadores a buscar novas substâncias tóxicas para as bactérias, que funcionem como antimicrobianas, a partir de várias fontes, tais como as plantas medicinais. A triagem de extratos de plantas, assim como de compostos sintetizados no metabolismo secundário, para evidenciar a presença de novos compostos com atividade antimicrobiana é uma fonte potencial de medicamentos mais efetivos (KARAMAN *et al.*, 2003).

As bactérias Gram positivas e Gram negativas apresentam diferenças na estrutura da parede celular. A parede das bactérias Gram positivas apresenta várias camadas de um polissacarídeo denominado peptidoglicano que forma uma rede através de ligações cruzadas entre seus aminoácidos além de pequenas quantidades de ácido teicóico. As bactérias Gram negativas apresentam uma única camada de peptidoglicano e uma membrana externa complexa composta de lipopolissacarídeos, proteínas e lipoproteínas. Essas diferenças estruturais levam a modificações na permeabilidade o que acarreta variação na sensibilidade a substâncias exógenas. Normalmente as bactérias Gram positivas são mais sensíveis aos antimicrobianos do que as Gram negativas embora alguns antimicrobianos atuem apenas em bactérias Gram negativas (MADIGAN; MARTINKO, 2004).

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram positiva pertencente à família Baccillaceae, as células têm forma de bacilos grandes, geralmente móveis, formando esporos que lhes conferem a capacidade de sobreviver em

condições desfavoráveis tais como: altas temperaturas, baixa umidade e ausência de nutrientes. É um saprófita comum do solo e da água, porém algumas espécies, acidentalmente provocam infecções (TRABULSI, 2004).

Staphylococcus aureus pertence à família Staphylococcaceae, se apresentam como cocos Gram positivos que formam grupos com aspecto de cachos de uvas com cor amarelada, devido a produção de carotenóides. Normalmente, está associado com infecções da pele e do trato respiratório inferior. *S. aureus* tem uma grande importância clínica uma vez que é a principal causa de infecções hospitalares adquiridas nos berçários, em cirurgias e em procedimentos médicos invasivos. Algumas linhagens têm se mostrado muito resistentes a vários antibióticos (HOLT *et al.* 1994).

Pseudomonas aeruginosa pertence à família Pseudomonadaceae caracteriza-se como bastonete Gram negativo reto ou ligeiramente curvo, aeróbio estrito, podendo ser observado como células isoladas, aos pares, ou em cadeias curtas, revelando mobilidade através de flagelo polar. *P. aeruginosa* se comporta como um patógeno oportunista iniciando infecções em indivíduos com baixa resistência e freqüentemente está associada com infecções do trato respiratório, urinário e lesões na pele resultantes de queimaduras graves ou outros traumatismos. Esta bactéria, naturalmente resistente a muitos dos antibióticos amplamente utilizados, é comumente encontrada no ambiente hospitalar e pode infectar facilmente os pacientes que estão recebendo tratamento para outras doenças (MADIGAN; MARTINKO, 2004).

Escherichia coli é um bacilo Gram negativo pertencente à família das Enterobacteriaceae, aeróbias ou aeróbias facultativas (HOLT *et al.*, 1994). *E. coli* é o membro mais bem conhecido da microbiota normal do intestino humano, mas também é um patógeno gastrointestinal versátil que pode estar envolvido na diarreia infantil, ocasionalmente ocorrendo em proporções epidêmicas em berçários ou enfermarias obstétricas. *E. coli* também pode causar infecções no trato urinário de pessoas mais velhas ou naquelas cuja resistência está diminuída devido a cirurgias ou exposição à radiação ionizante. As linhagens enteropatogênicas de *E. coli* estão freqüentemente envolvidas nas infecções semelhantes à disenteria e febres generalizadas (TORTORA, 2005).

Embora os produtos naturais sejam amplamente considerados de menor risco em comparação com as drogas sintéticas, eles não são completamente livres da possibilidade de toxicidade ou outros efeitos adversos (DE SMET, 2004).

Para estudo de citotoxicidade os eritrócitos ou células vermelhas do sangue são utilizados em muitos estudos relacionados à composição e ao comportamento de membrana, contribuindo com informações para estimar o comportamento de outras membranas celulares, devido, principalmente, a sua disponibilidade e acessibilidade. Além disso, qualquer alteração da membrana dos eritrócitos, seja em sua composição ou estabilidade, serve de ferramenta diagnóstica para uma série de doenças e para estudos de comportamentos celulares mediante ganho de idade, exercícios físicos, dieta, etanol e praguicidas (MARIGLIANO *et al.*, 1999; MAZZANTI *et al.*, 2002; GOUVÊA; SILVA, 2006; SRINIVASAN; KEMPAIAH, 2006; BATISTA *et al.*, 2007; FIRMINO, 2007).

O eritrócito é um tipo de célula que contém alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, oxigênio molecular e íons ferro no estado ligado (NIKI *et al.*, 1991). Por esta razão, espera-se que eles sejam altamente vulneráveis a reações que envolvem radicais livres e podem ser muito suscetíveis a peroxidação dos lipídios de membrana e hemólise (REDDY *et al.*, 2007). Dessa forma, constituem um poderoso sistema que pode ser utilizado como um modelo experimental *in vitro* para investigar os efeitos tóxicos e protetores de uma grande variedade de substâncias ou situações associadas com estresse oxidativo. Entretanto, as células possuem um eficiente sistema antioxidante no citoplasma que as tornam excepcionalmente resistentes à peroxidação quando os radicais são produzidos dentro da célula. A ocorrência de hemólise pode ser diretamente correlacionada com o efeito tóxico das substâncias testadas (BRANDÃO *et al.*, 2005).

Os eritrócitos têm sido utilizados como modelo para avaliar o efeito protetor ou tóxico de uma grande variedade de substâncias permitindo obter informação sobre os efeitos destas sobre a membrana celular. A ocorrência de hemólise após a exposição ao produto teste pode ser diretamente correlacionada com a sua citotoxicidade e utilizada como o primeiro passo na triagem toxicológica *in vitro* (SCHIAR *et al.*, 2007).

O metabolismo normal leva a produção contínua de espécies reativas de oxigênio (ROS) que desempenham diferentes funções *in vivo*, particularmente na produção de energia, na fagocitose, na regulação do crescimento celular e na sinalização entre as células (ROTH, 1997). Entretanto, a produção aumentada dessas moléculas altamente reativas, se não forem rapidamente sequestradas, pode provocar a oxidação de biomoléculas (proteínas, aminoácidos, lipídios e DNA) que levam a danos celulares e a morte (IGNARO *et al.*, 1999). Vários trabalhos demonstram que as ROS estão envolvidas na asma, na inflamação, na artrite, na neurodegeneração, na doença de Parkinson, na síndrome de Down e talvez na demência (PERRY *et al.*, 2000).

Há um interesse crescente em antioxidantes naturais oriundos especificamente de vegetais, uma vez que vários dados epidemiológicos sugerem o seu efeito protetor frente a uma lista crescente de doenças (CAO *et al.*, 1996; LONG; HALLIWELL, 2001; LEONARD *et al.*, 2002).

A capacidade antioxidante não enzimática do sangue está contida predominantemente nos eritrócitos circulantes. A principal função do sangue é transportar os gases respiratórios, O₂ e CO₂, entre os tecidos e os pulmões através da hemoglobina. Os eritrócitos contêm enzimas responsáveis pela produção de energia para manter a hemoglobina como oxihemoglobina, a forma reduzida e funcional da proteína (SIEMS; SOMMERBURG; GRUNE, 2000). Entretanto, o íon ferro da hemoglobina está continuamente exposto a altas concentrações de oxigênio, o que resulta na sua lenta oxidação a metahemoglobina (metHb) ou ferrihemoglobina, que é incapaz de se ligar ou transportar oxigênio. Em condições normais o nível de metHb nos eritrócitos é mantida abaixo de 1% da hemoglobina total (MANSOURI; LURIE, 1993).

A formação de metHb *in vivo* pode ser reproduzida *in vitro* pela exposição de uma suspensão de eritrócitos a um agente oxidante e a quantidade de metHb formada está diretamente relacionada com a extensão do stress oxidativo causado pelo agente. Da mesma forma, a exposição de eritrócitos a agentes antioxidantes presentes em misturas complexas, tais como os extratos vegetais, podem evitar a formação de metHb. A efetividade do extrato em inibir a formação de metHb na presença de um agente oxidante pode ser utilizada como a medida da sua atividade antioxidante (CLARO *et al.*, 2005; ARBOS *et al.* 2008).

Para se obter informações sobre a composição e a estrutura das membranas eritrocitárias, assim como averiguar os efeitos de substâncias na sua integridade, geralmente os pesquisadores usam várias abordagens bioquímicas, como o SDS-PAGE (WAGNER *et al.*, 2002; ROSSI *et al.*, 2006), impedância elétrica (IVANOV *et al.*, 2007), aplicação de enzimas específicas (NASUTI *et al.*, 2003), calorimetria (WAGNER *et al.*, 2002), além de técnicas morfológicas, dentre as quais se incluem a microscopia óptica e as microscopias eletrônicas (MURRAY; GRANNER, 2002). Outro teste bastante utilizado e eficiente na avaliação da estabilidade das membranas, assim como na avaliação de efeitos toxicológicos é a fragilidade osmótica eritrocitária – FOE (RODRIGUES, 2009).

O volume de eritrócitos no sangue parece ser regulado por uma ação direta da bomba sódio/potássio ATPase que controla a concentração de soluto dentro da célula, regulando as forças osmóticas que pode fazer uma célula inchar ou encolher (ALBERTS *et al.*, 2002). A resistência das hemácias a hemólise caracteriza sua fragilidade osmótica eritrocitária (FOE). Ou seja, a fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) expressa a habilidade das membranas manterem sua integridade estrutural quando expostas a um estresse osmótico (ALDRICH, 2006).

Diferentes técnicas têm demonstrado que algumas drogas terapêuticas podem modificar a estrutura e a morfologia das membranas dessas células (HUBNER *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005). Entretanto, a FOE é constantemente usada no diagnóstico de hemoglobinopatias, principalmente esferocitoses, na avaliação do efeito de drogas sobre a hematopoiese (SIRICHOTIYAKUL *et al.*, 2004) e para identificar alterações de membrana em portadores de câncer cervical e de apnéia obstrutiva do sono (OZTÜRK *et al.*, 2003).

1.5 Genotoxicidade

No início dos anos 80 os órgãos de saúde pública e as agências ambientais, em vários países industrializados, acrescentaram a mutagenicidade à lista das propriedades tóxicas a serem avaliadas antes que agentes químicos, aditivos de alimentos e medicamentos fossem introduzidos

no mercado (RIBEIRO *et al.*, 2003). No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – MS estabeleceu a “Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-clínica de Fitoterápicos” que inclui os estudos de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* utilizando bactérias e células de roedores e de mamíferos (BRASIL, 2004).

A genética toxicológica avalia os efeitos genotóxicos em potencial, uma vez que estes são considerados pré-requisitos importantes para o desenvolvimento de efeitos adversos à saúde, como o câncer. Adicionalmente, a indução de mutações em células germinativas pode resultar no aumento das freqüências de doenças genéticas, ou, ainda introdução de novas doenças genéticas no conjunto gênico humano (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

A toxicidade genética não é uma medida de carcinogenicidade, mas é freqüentemente usada como um indicador para o câncer, uma vez que os testes de mutagenicidade medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (FEARON; VOGELSTEIN, 1990), havendo alta associação entre respostas positivas em testes de toxicidade genética e carcinogenicidade, tanto em roedores como no homem (MCCANN *et al.*, 1975; PURCHASE *et al.*, 1978).

Estudos realizados em vários laboratórios evidenciaram a relação entre substâncias mutagênicas que também apresentam potencial carcinogênico. Esta correlação está entre 50 e 90% e depende da estrutura dos agentes testados, dos testes empregados para a detecção dos efeitos dos agentes e da presença de um sistema de ativação metabólica de mamíferos (McCANN *et al.*, 1975; WHITE; RASMUSSEN, 1996; WEISBURGER, 1999; MORTELMANS; ZEIGER, 2000; ZEIGER; MARGOLIN, 2000; BRAMBILLA; MARTELLI, 2004).

Como resultado dessas considerações, os testes em toxicidade genética são utilizados, rotineiramente, para uma avaliação do espectro toxicológico de compostos químicos e medicamentos. Vários testes estão disponíveis para avaliação do perigo genético. Esses modelos são freqüentemente categorizados pelos indicadores biológicos que avaliam, entre outros fatores: mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA. A associação íntima desses indicadores biológicos, bem caracterizados e facilmente quantificados, com os mecanismos conhecidos de ativação de protooncogenes ou perda de

genes supressores de tumor, tem fortalecido a importância dos testes de genotoxicidade (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

A inexistência na literatura científica de dados relativo à citotoxicidade e a genotoxicidade de *Mimosa arenosa* (Willd.) Poir. e diante das premissas aqui apresentadas, avaliamos o potencial citotóxico e genotóxico de taninos obtidos das cascas do caule desta espécie frente a células procarióticas e eucarióticas.

2 OBJETIVOS

Geral

Investigar a citotoxicidade e genotoxicidade de taninos da casca do caule de *Mimosa arenosa* (Willd.) Poir. frente a células procarióticas e eucarióticas para que possam ser utilizados, com segurança, como fonte potencial de drogas terapêuticas ou como ferramentas farmacológicas.

Específicos

- ✓ Avaliar a atividade antibacteriana do tanino de *M. arenosa* frente a linhagens de microrganismos de importância clínica, por meio da CIM;
- ✓ Avaliar a atividade citotóxica do tanino de *M. arenosa* em eritrócitos humanos dos tipos A, B e O;
- ✓ Avaliar a fragilidade osmótica eritrocitária (causada por tanino de *M. Arenosa*) em eritrócitos humanos dos tipos A, B e O;
- ✓ Avaliar a atividade oxidante e antioxidante (do tanino de *M. Arenosa*) em eritrócitos humanos;
- ✓ Investigar o potencial mutagênico (do tanino de *M. Arenosa*) através do teste de Ames;
- ✓ Avaliar o potencial clastogênico e aneugênico (do tanino de *M. Arenosa*) através do teste de micronúcleo em eritrócitos de camundongos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material botânico

Foram utilizadas as cascas do caule de *Mimosa arenosa* (Willd.) Poir. (MIMOSACEAE) previamente identificadas, provenientes da Fazenda Lameirão, propriedade da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), localizada no município de Santa Terezinha - PB.

As cascas do caule de *Mimosa arenosa* foram coletadas em um período chuvoso no ano de 2004.

3.2 Extração dos taninos de *M. arenosa*

As cascas do caule foram cortadas em fragmentos menores, homogeneizadas, secas em estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas, moídas em uma forrageira e peneiradas (malha 2x2 mm). O pó resultante foi extraído com água fervente por 45 minutos. O extrato produzido foi liofilizado e mantido a 22°C e ao abrigo da luz até o momento das análises. A partir de 25g da casca forma obtidos 18,11 % de taninos condensados. A obtenção dos taninos foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Produtos Florestais (LTPF) da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural (UFCG/CSTR), Patos - PB.

3.3 Preparação da amostra de taninos de *M. arenosa*

Os taninos foram solubilizados em água destilada (10 mg/mL) e utilizados em seguida.

3.4 Avaliação da amostra de taninos das cascas do caule de *M. arenosa*

Alíquotas de uma solução de taninos (5 mg) foram misturadas com albumina de soro bovino (BSA) (5mg) nas proporções de 1:1, 1:2 e 1:4, incubadas com agitação (100 rpm) por 30 minutos e centrifugadas a 5000 rpm

por 15 minutos. A presença dos taninos foi confirmada através da visualização da albumina precipitada. A quantificação da albumina precipitada em cada amostra foi realizada pelo método de Bradford (1976) onde após a centrifugação 100 µL do sobrenadante foi diluído em 1 mL de NaCl 0,15 M. Desta nova solução foram retirados 100 µL e foram adicionados 2,5 mL de reagente de Bradford (Comassie Blue G-250 em etanol 95%, H₂PO₄ 85%). Após 2 minutos a quantidade de proteína precipitada pelos taninos foi quantificada em espectrofotômetro a 595 nm. Os dados obtidos foram comparados com uma curva padrão de precipitação de BSA.

3.5 Linhagens Bacterianas

As linhagens bacterianas, oriundas da CCT – Coleção de Culturas Tropicais e ATCC – American Type Culture Collection, utilizadas foram:

- *Bacillus subtilis* CCT 0516
- *Escherichia coli* ATCC 2536
- *Escherichia coli* ATCC 10536
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8027
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25925

As linhagens de Salmonella, oriundas do Laboratório de Mutagênese Ambiental DBCG/CBC/UFRN, utilizadas foram:

- *Salmonella typhimurium* TA 97 → his D6610, rfa, Δ uvrB, bio⁻, pKM101 (Ap^R)
- *Salmonella typhimurium* TA 98 → his D3052, rfa, Δ uvrB, bio⁻, pKM101 (Ap^R)
- *Salmonella typhimurium* TA 100 → his G46, rfa, Δ uvrB, bio⁻, pKM101 (Ap^R)

- *Salmonella typhimurium* TA 102 → his G428, rfa, pKM101 (Ap^R), pAQ1 (Tc^R)

3.6 Meios de Cultura

- Luria Bertani (LB): extrato de levedura (DIFCO) 10 g, triptona (DIFCO) 5 g, NaCl (VETEC) 10 g para 1 L.
- Nutriente Broth (NB) (DIFCO) 8 g para 1 L.
- Meio Mínimo Ágar: 20 mL meio Vogel-Bonner (50X), 50 mL glicose 10% v/v, 15 g ágar para 1L.
- Meio Vogel-Bonner (50x): 10 g MgSO₄.H₂O, 100 g ácido cítrico monohidratado, 500 g K₂HPO₄, 175 g Na₂NH₂PO₄.4H₂O para 1 L.
- Agar de superfície: 6 g NaCl, 100 mL histidina/biotina (0,5 mM), 6 g ágar para 100 mL.

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza P.A. Os meios de cultura foram preparados com água destilada esterilizados por autoclavação a 121 °C durante 15 minutos.

3.7 Animais experimentais

Os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFPB (Certidão/CEPA n° 0506/11).

Os animais experimentais foram obtidos do Biotério “Prof. Thomas George” – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF) – UFPB.

Antes dos experimentos, camundongos albinos (*Mus musculus*), linhagem Swiss, machos e fêmeas, pesando entre 25-38 g, foram mantidos em condições controle de temperatura (21 ± 1 °C) e iluminação (6 às 18 horas) e sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada de ração tipo *pellets* (Purina) e água *ad libitum*.

Os animais foram sacrificados com xilasina (5 mg/Kg) de acordo com as normas vigentes para evitar ansiedade ou medo (stress) (ANDRADE *et al.*,

2006) e em seguida foram retiradas alíquotas de sangue da extremidade da cauda.

3.8 Eritrócitos humanos

Os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFPB (Certidão/CEP/CCS nº 0201/11).

Os eritrócitos humanos (A, B, O) foram oriundos de bolsas contendo concentrado de eritrócitos que não poderia mais ser utilizado para transfusão, obtido na Unidade Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB. A manipulação e o descarte dos eritrócitos foi realizado de acordo com as Normas de Segurança seguidas pela referida Unidade.

3.9 Avaliação do potencial citotóxico dos taninos de *M. arenosa* frente a bactérias de importância clínica

O potencial citotóxico para bactérias foi avaliado através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição. Para isso, diluições seriadas a metade de uma solução dos taninos de *M. arenosa* (1 - 1024µg) foram adicionadas a uma suspensão (1×10^7 UFC/mL) de *B. subtilis* CCT 0516, *E. coli* ATCC 2536, *E. coli* ATCC 10536, *P. aeruginosa* ATCC 8027, *P. aeruginosa* ATCC 25619, *S. aureus* ATCC 6538 e *S. aureus* ATCC 25925 em meio LB e em seguida incubadas a 37 °C por 24h. Foi considerada como CIM a menor concentração da solução de taninos de *M. arenosa* que inibiu completamente o crescimento bacteriano (DAVIENNE; RADDI, 2002). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram expressos como a média mais ou menos o erro padrão da média.

3.10 Caracterização da atividade antibacteriana

Para determinar se a atividade antibacteriana era bacteriostática ou bactericida, uma alíquota da amostra que não apresentou crescimento foi plaqueada em NB Ágar na ausência dos taninos de *Mimosa arenosa* e em

seguida incubadas a 37 °C por 24h. A atividade dos taninos será considerada bacteriostática quando decorrido este tempo evidenciarmos crescimento e bactericida, quando este não ocorrer (MADIGAN; MARTINKO, 2004). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram expressos como a média mais ou menos o erro padrão da média.

3.11 Avaliação do potencial citotóxico dos taninos de *M. arenosa* em eritrócitos humanos

Uma amostra de sangue humano foi misturado com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e o sedimento da última centrifugação foi ressuspenso em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5%. As amostras da solução de taninos de *M. arenosa* em diferentes concentrações (0.1, 1, 10, 100 e 1000µg) foram adicionadas à 2 mL da suspensão de eritrócitos para um volume final de 2,5 mL. A suspensão de eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0 % de hemólise) e a suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% como controle positivo (100 % de hemólise). As amostras foram incubadas por 1 hora à 22 ± 2 °C sob agitação lenta e constante a 100 rpm. Decorrido este tempo foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL *et al.*, 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem.

3.12 Avaliação do efeito dos taninos de *M. arenosa* sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos humanos

A avaliação da fragilidade osmótica dos eritrócitos humanos foi realizada com uma suspensão de eritrócitos a 0,5%. A solução de taninos de *Mimosa arenosa* na concentrações de 1000µg foi incubada em tubos contendo 2 mL de uma suspensão de eritrócitos por 1h a 22 ± 2 °C. Decorrido este tempo, as preparações foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Os eritrócitos foram então ressuspenso em soluções hipotônicas de cloreto de sódio (0,12; 0,24; 0,36; 0,48; 0,60; 0,72; 0,84 e

0.96%) e agitadas a 100 rpm, por uma hora a 22 ± 2 °C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria (DU 640 BECKMAN) em comprimento de onda de 540 nm (DACIE; LEWIS, 2001). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem.

3.13 Avaliação do potencial oxidante e anti-oxidante dos taninos de *M. arenosa* em eritrócitos humanos

Para investigar o potencial oxidante dos taninos de *Mimosa arenosa*, uma suspensão de eritrócitos a 30% foi preparada em PBS (11,35g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 24,36g Na_2HPO_4 e 7,18g NaCl para 1 L; pH 7,4) suplementado com glicose (200 mg/dL), pH 7,6. Em seguida, as amostras da solução de taninos nas várias concentrações (10, 100 e 1000 μg) foram adicionadas a 2 mL da suspensão de eritrócitos e incubados por um período de 1 hora, sob agitação lenta e constante (100 rpm) a 25 °C. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a porcentagem de metahemoglobina (metHb) em relação a hemoglobina (Hb) total foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 630 nm e 540 nm, respectivamente. A porcentagem de metHb formada foi comparada com os valores obtidos para a fenilhidrazina (PH), um comprovado agente oxidante (WEFFORT-SANTOS *et al.*, 2008). Para investigar o potencial anti-oxidante, após o período de incubação de 1h foi adicionado um 1 mmol/L do agente oxidante fenilhidrazina. As suspensões foram aeradas e mantidas sob agitação lenta e constante (100 rpm) por mais 20 minutos a 25°C. Decorrido este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos, diluídas em tampão fosfato (9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 5,7g KH_2PO_4 para 1 L) e a porcentagem de metHb em relação a Hb total foi quantificada por espectrofotometria a 630 nm e 540 nm. Os valores de metHb entre 1,9 e 2,0% foram considerados normais enquanto que valores acima de 4% foram considerados elevados (CAMARGO *et al.*, 2007). A porcentagem de metHb formada foi comparada com os valores obtidos para a vitamina C (20 mmol/L), um comprovado agente anti-oxidante (WEFFORT-SANTOS *et al.*, 2008). Todos

os experimentos foram realizados em triplicata e foram expressos como a média mais ou menos o erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo Teste de Student ($P > 0,05$).

3.14 Investigação do potencial mutagênico e anti-mutagênico dos taninos de *M. arenosa* em células bacterianas através do teste de Ames

Suspensões em meio Agar nutriente de linhagens mutantes de *S. typhimurium* TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102, em fase estacionária, deficientes na síntese do aminoácido histidina (His^-) foram incubadas nas concentrações de 100 μ g, 500 μ g e 1000 μ g da solução de taninos, a uma temperatura de 37°C. Após 30 min as suspensões foram plaqueadas em meio agar Mínimo, incubadas a 37°C por 48 h. As colônias mutantes (His^+) que restauraram sua capacidade de síntese de histidina (revertentes) foram contadas. Foram plaqueadas suspensões de *S. typhimurium* como controle negativo e suspensões de *S. typhimurium* incubadas na presença de 0,5 μ g/placa de 4-nitroquinolina-1-óxido como controle positivo. Para investigar o potencial anti-mutagênico, suspensões de *S. typhimurium* TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102 foram submetidas a varias concentrações do produto (100 μ g, 500 μ g e 1000 μ g) a 37°C por 30 min. Em seguida as amostras foram incubadas na presença de 4-nitroquinolina-1-óxido por mais 30 minutos, plaqueadas em meio ágar mínimo e mantidas a 37°C por 48 h.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como razão de mutagenicidade (número de revertentes por placa) (AMES *et al.*, 1975; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

3.15 Investigação do potencial clastogênico e aneugênico dos taninos de *Mimosa arenosa* em eritrócitos de roedores *in vivo*

Todos os experimentos foram realizados no período de 14 às 17 horas. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a Resolução Nº 90 – 16/04/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2004). Grupos de três machos e três fêmeas receberam, por via oral,

doses de 1000 e 2000 µg da solução de taninos de *Mimosa arenosa*. Um grupo controle (negativo) recebeu apenas o dispersante da amostra e o outro grupo controle (positivo) recebeu o agente mutagênico ciclofosfamida numa dose de 50 mg por quilo de peso do animal (SIGMA). Vinte e quatro horas após a administração das substâncias, os animais foram sacrificados e o sangue foi colhido para o preparo das lâminas. As lâminas foram analisadas para observação da presença ou não de micronúcleos nos eritrócitos em cada animal. Foram contados cerca de 2000 eritrócitos por animal. As lâminas foram coradas com corante panótico e observadas ao microscópio óptico (ZEISS) no aumento de 1000x para a contagem dos micronúcleos (HAYASHI *et al.*, 1994). Os resultados foram expressos como a média mais ou menos erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo Teste de Student ($P > 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da amostra de taninos das cascas do caule de *Mimosa arenosa*

Os taninos de *M. arenosa* foram capazes de promover a precipitação da proteína albumina de soro bovino (BSA) utilizada como padrão. A quantidade de proteína precipitada foi dependente da quantidade de tanino utilizada e chegou a 65 % da amostra de BSA (Tabela 1, Gráfico 1).

Tabela 1 – Quantidade de proteínas precipitadas pelos taninos de *M. arenosa*.

Proporção Utilizada	BSA (mg)	Taninos (mg)	Proteínas precipitadas	
			mg	%
1:1	5	5	2,38	47,6
1:2	5	10	3,07	61,4
1:4	5	20	3,25	65,0

BSA = Albumina de Soro Bovino

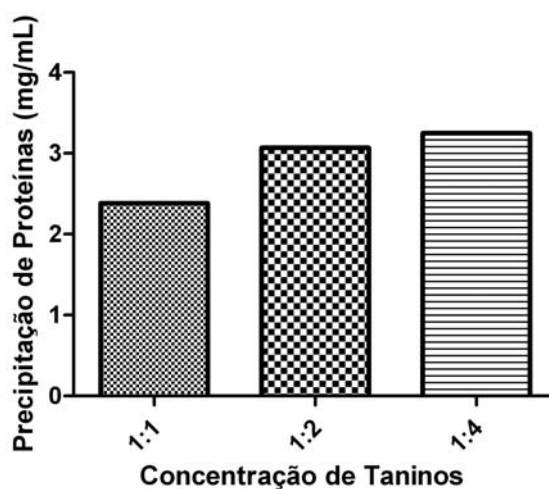


Gráfico 1 – Quantidade de proteínas precipitadas pelos taninos de *M. arenosa*.

4.2 Avaliação do efeito antibacteriano dos taninos de *Mimosa arenosa* frente a bactérias de importância clínica

Os taninos de *M. arenosa* inibiram o crescimento de todas as linhagens bacterianas testadas, Gram positivas e Gram negativas testadas. O gênero *Staphylococcus* foi o mais sensível, enquanto *Pseudomonas* o mais resistente a ação antibacterina dos taninos.

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos taninos de *M. arenosa*.

LINHAGEM BACTERIANA	CIM
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 0516	500 µg
<i>Escherichia coli</i> ATCC 2536	500 µg
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	250 µg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 8027	1000 µg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25619	1000 µg
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	250 µg
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925	250 µg

4.3 Caracterização da atividade antibacteriana dos taninos de *Mimosa arenosa*

Após a inibição do crescimento na presença da concentração inibitória mínima dos taninos as linhagens de *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* foram capazes de retomar o crescimento na ausência destes. Dessa forma, a atividade antibacteriana exercida pelos taninos de *M. arenosa* frente a todas as linhagens testadas foi bacteriostática.

4.4 Avaliação do efeito hemolítico dos taninos de *Mimosa arenosa* frente a eritrócitos humanos

Os taninos de *M. arenosa* foram capazes de induzir hemólise em eritrócitos humanos pertencentes aos três tipos sanguíneos do sistema ABO, entretanto em porcentagens muito baixas (Tabela 3). O efeito hemolítico não se apresentou dependente de concentração e os eritrócitos do tipo O se

mostraram mais susceptíveis a tal efeito (Gráficos 2, 3 e 4). Os resultados foram expressos como média aritmética de três avaliações.

Tabela 3 - Porcentagem de hemólise promovida pelos taninos de *M. arenosa* em eritrócitos humanos.

Tipo Sanguíneo	Taninos de <i>M. arenosa</i> (μg)				
	0,1	1	10	100	1000
O	1,75	1,50	1,62	1,90	1,90
B	0,03	0,03	0,03	0,03	0,09
A	0,66	0,60	0,60	0,64	2,00

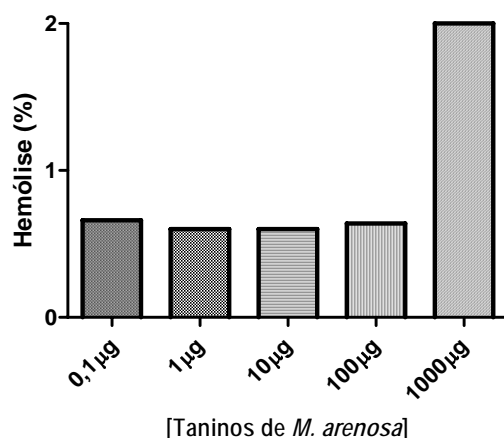


Gráfico 2 – Efeito hemolítico de taninos de *Mimosa arenosa* em eritrócitos humanos tipo A (n = 3).

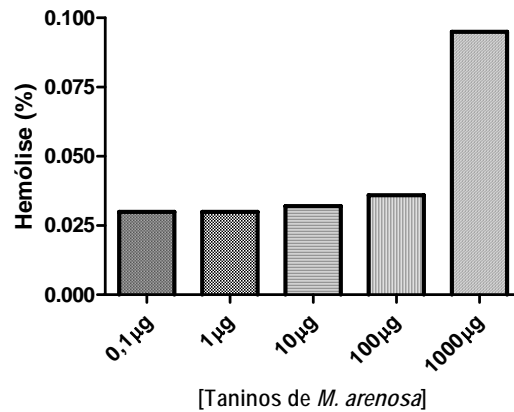


Gráfico 3 – Efeito hemolítico de taninos de *M. arenosa* em eritrócitos humanos tipo B (n = 3).

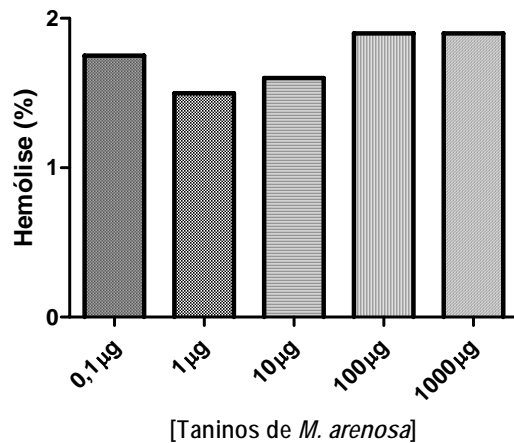


Gráfico 4 – Efeito hemolítico de taninos de *M. arenosa* em eritrócitos humanos tipo O (n = 3).

4.5 Avaliação do efeito dos taninos de *Mimosa arenosa* sobre a fragilidade osmótica em eritrócitos

Os gráficos 5, 6 e 7 mostram os efeitos dos taninos sobre a fragilidade osmótica eritrocitária de *M. arenosa* e este não modificaram a fragilidade osmótica da membrana dos eritrócitos humanos dos três tipos sanguíneos (A, B e O) e portanto não reduziram significativamente a taxa de hemólise.

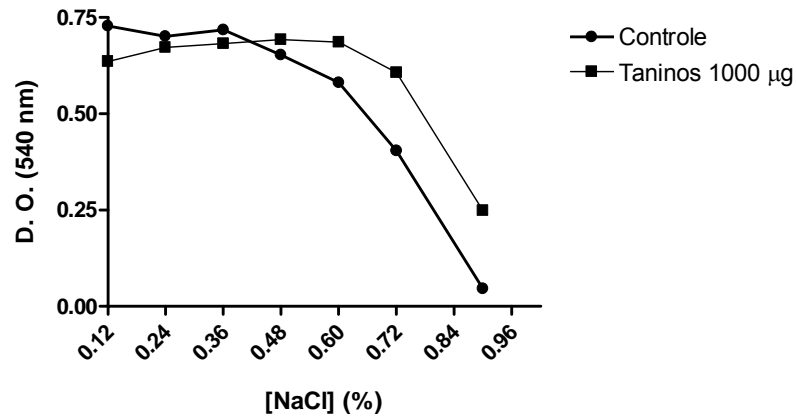


Gráfico 5 – Efeito dos taninos de *M. arenosa* sobre eritrócitos humanos tipo O (n = 3). Anova “two-way”, seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$ (controle x taninos).

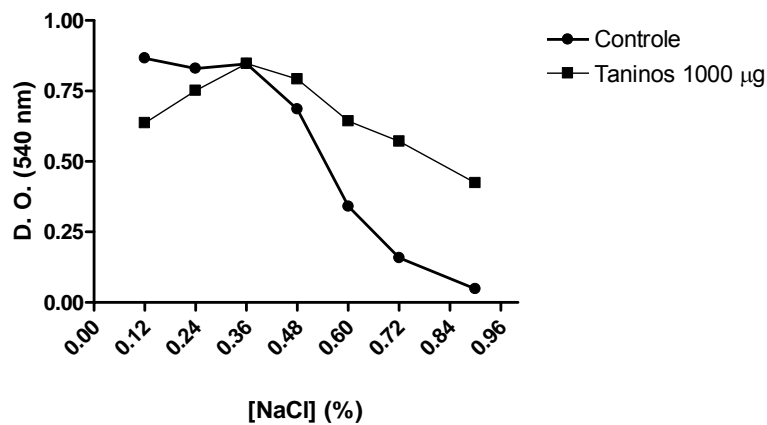


Gráfico 6 – Efeito dos taninos de *M. arenosa* sobre eritrócitos humanos tipo A (n = 3). Anova “two-way”, seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$ (controle x taninos).

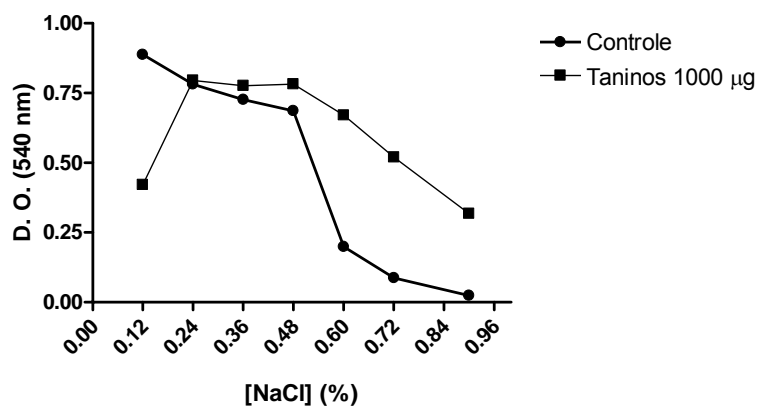


Gráfico 7 – Efeito dos taninos de *M. arenosa* sobre eritrócitos humanos tipo B (n = 3). Anova “two-way”, seguido do teste de Bonferroni, $p < 0,05$ (controle x taninos).

4.6 Avaliação do potencial oxidante de taninos de *Mimosa arenosa* em eritrócitos humanos

A quantidade de metahemoglobina formada na ausência e na presença dos taninos de *M. arenosa* em todas as concentrações testadas não apresentou diferença significativa. Entretanto esse efeito foi significativamente menor quando comparado com o efeito da fenilhidrazina, um comprovado agente oxidante (Tabela 4, Gráfico 8).

Tabela 4 - Quantidade de metahemoglobina (MetHb) formada na presença e na ausência dos taninos de *M. arenosa*. Valores expressos como média \pm e.p.m.

Tratamento	MetHb (% Hb)
Hb + Phenilhidrazina	32,25 \pm 0,25
Hb + Taninos 0,1 μ g	0,69 \pm 0,48
Hb + Taninos 1 μ g	0,74 \pm 0,27
Hb + Taninos 10 μ g	1,06 \pm 0,64
Hb + Taninos 100 μ g	1,22 \pm 0,86
Hb + Taninos 1000 μ g	2,22 \pm 1,37
Hb	2,55 \pm 0,05

Hb=hemoglobina, PH=fenilhidrazina

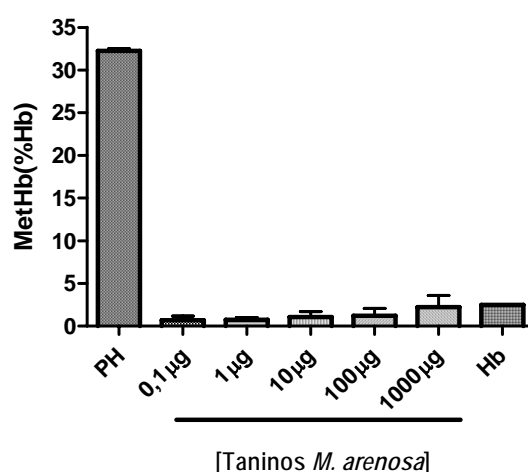


Gráfico 8 – Efeito de taninos de *M. arenosa* na formação de MetHB em eritrócitos humanos (n=3). As colunas e barras representam a média \pm e.p.m. Teste “t”, $p < 0,05$ (PH x taninos).

4.7 Avaliação do potencial anti-oxidante de taninos de *Mimosa arenosa* em eritrócitos humanos

Quando os eritrócitos foram pré-incubados com os taninos e expostos em seguida a fenilhidrazina (PH) observou-se que a quantidade de MetHb formada foi significativamente menor que o efeito da vitamina C um comprovado agente anti-oxidante. Este efeito não se apresentou dependente de concentração (Tabela 5, Gráfico 9).

Tabela 5 - Quantidade de metahemoglobina (MetHb) formada na presença e na ausência dos taninos de *M. arenosa*. Valores expressos como média \pm e.p.m.

Tratamento	metHb (% Hb)
Hb + vit. C + Phenilhidrazina	52,65 \pm 0,05
Hb + Taninos 0,1 μ g + PH	35,65 \pm 2,85
Hb + Taninos 1 μ g + PH	39,15 \pm 2,55
Hb + Taninos 10 μ g + PH	33,80 \pm 7,80
Hb + Taninos 100 μ g + PH	34,75 \pm 1,25
Hb + Taninos 1000 μ g + PH	36,00 \pm 1,80
Hb	2,55 \pm 0,05

Hb=hemoglobina, PH=fenilhidrazina

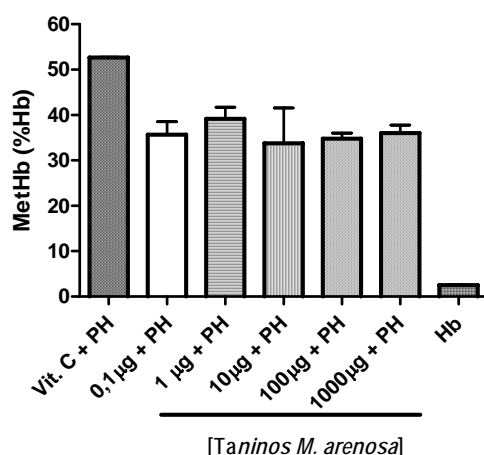


Gráfico 9 – Efeito de taninos de *Mimosa arenosa* na proteção da formação de MetHB em eritrócitos humanos (n=3). As colunas e barras representam a média \pm e.p.m. Teste “t”, $p < 0,05$ (PH x taninos).

4.8 Investigação do potencial mutagênico dos taninos de *Mimosa arenosa* em células bacterianas através do Teste de Ames

Os taninos de *M. arenosa* não interferiram no crescimento do “background” bacteriano, portanto não foram tóxicos para as linhagens de *S. thyphimurium* utilizadas no teste. Os taninos na concentração de 500 µg não foram capazes de induzir mutações uma vez que a razão de mutagenicidade (RM) não foi maior que o limite de revertentes espontâneos esperados. Entretanto na concentração de 1000 µg observou-se um aumento no número de revertentes para as quatro linhagens de *S. thyphimurium*: TA 100 e TA 102 (RM X 2), TA 97 (RM X 4) e TA 98 (RM X 7). Os resultados foram expressos como média da contagem de revertentes em duas placas (razão de mutagenicidade) (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeito mutagênico dos taninos de *M. arenosa* frente às linhagens de *S. thiphymurium* TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102.

Revertentes	RM (TA 97)	RM (TA 98)	RM (TA 100)	RM (TA 102)
Espontâneos	90 - 180	25 - 75	75 - 225	240 - 320
Induzidos (Taninos 500 µg)	81	19	76	31
Induzidos (Taninos 1000 µg)	713	514	555	753

RM = Razão de mutagenicidade

4.9 Investigação do potencial anti-mutagênico dos taninos de *M. arenosa* em células bacterianas através do Teste de Ames

A pré-incubação com os taninos de *M. arenosa* reduziram o número de revertentes induzidos pela NQNO nas linhagens de *S. thyphimurium* TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102 nas duas concentrações testadas. Os resultados foram expressos como média da contagem de revertentes em duas placas (razão de mutagenicidade) (Tabela 7).

Tabela 7 – Efeito anti-mutagênico dos taninos de *M. arenosa* frente às linhagens de *S. thiphymurium* TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102.

Substâncias testadas	RM (TA 97)	RM (TA 98)	RM (TA 100)	RM (TA 102)
NQNO	316	320	932	348
Taninos 500 µg + NQNO	70	29	219	53
Taninos 1000 µg + NQNO	62	44	306	59

NQNO = 4-nitroquinolina-1-óxido (0,5 µg/placa), RM = razão de mutagenicidade

4.10 Investigação do potencial clastogênico e aneugênico dos taninos de *M. arenosa* através do teste do micronúcleo em eritrócitos de roedores *in vivo*

A presença de micronúcleos em eritrócitos de camundongos no controle positivo não foi influenciada pelo sexo, então os dados foram agrupados para determinar a média de micronúcleos, para calcular o erro padrão da média e para avaliar as diferenças entre os grupos.

Os taninos de *M. arenosa* nas concentrações de 1000 e 2000mg/Kg e nas condições testadas não induziram um aumento significativo na frequência de micronúcleos em relação ao controle negativo (Tabela 8 e Figura 2Ae 2B).

Tabela 8 – Frequência de eritrócitos micronucleados em eritrócitos de sangue periférico de camundongos Swiss machos e fêmeas.

Substâncias testadas	Eritrócitos micronucleados (%) (média ± e.p.m.)
Água	12,0 ± 5,67
Ciclofosfamida (50 mg/Kg)	43,5 ± 14,43
Taninos de <i>M. arenosa</i> (1000 mg/Kg)	9,5 ± 4,00*
Taninos de <i>M. arenosa</i> (2000 mg/Kg)	9,2 ± 3,83*

Água (controle negativo), Ciclofosfamida (controle positivo)

***Não são significativamente diferentes do controle negativo ($P < 0,05$)**

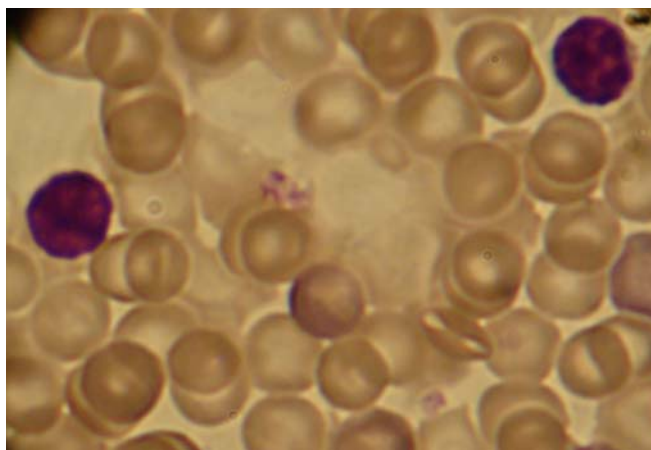


Figura 2 – A: Teste de micronúcleo (Controle Negativo).

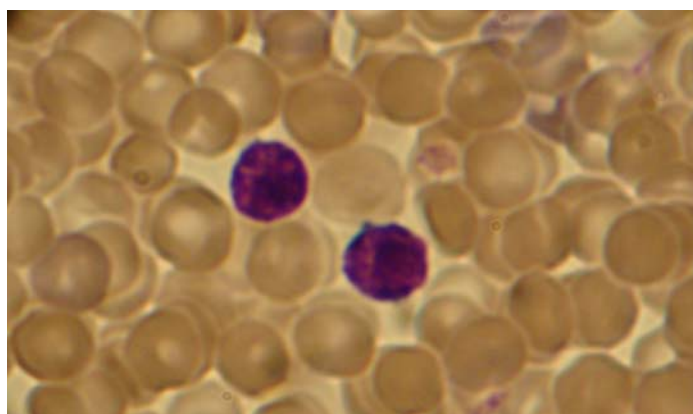


Figura 2 – B: Teste de micronúcleo (Taninos na concentração de 1000 mg/Kg).

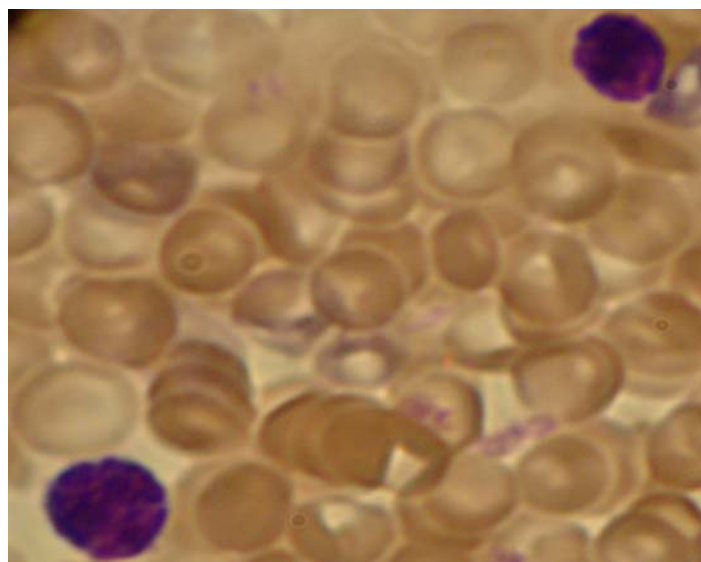


Figura 2 – C: Teste de micronúcleo (Taninos na concentração de 2000 mg/Kg).

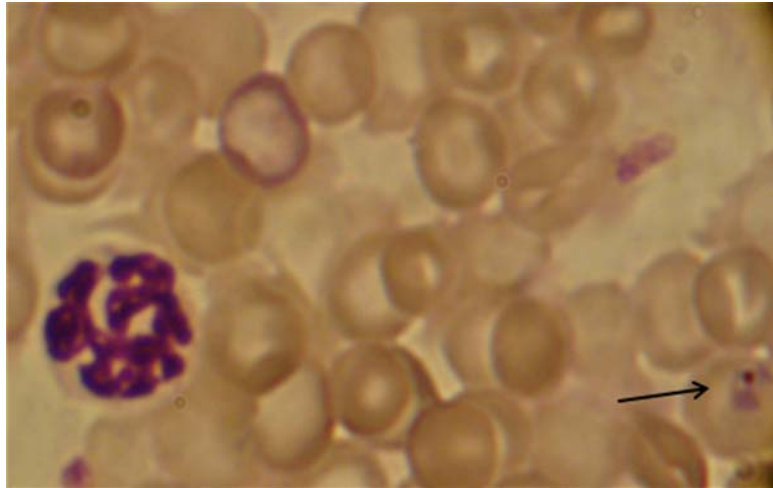


Figura 2 – D: Teste de micronúcleo (Controle Positivo).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram investigados pela primeira vez o potencial citotóxico e genotóxico dos taninos de *Mimosa arenosa* (Milld.) Poir. frente a células procarióticas e eucarióticas. A citotoxicidade foi avaliada através dos efeitos antibacterianos, hemolíticos e oxidantes e a genotoxicidade através dos efeitos mutagênicos, clastogênicos e aneugênicos. Os resultados mais relevantes deste estudo foram a atividade bacteriostática frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, baixa atividade hemolítica frente a eritrócitos humanos do sistema ABO, ausência de efeito oxidante e efeito anti-oxidante superior ao da vitamina C. Podemos ressaltar a ocorrência de efeitos mutagênicos apenas na mais alta concentração testada e ausência de efeitos clastogênicos e aneugênicos.

Os taninos de *M. arenosa* apresentaram efeito bacteriostático para as linhagens Gram positivas e Gram negativas com concentração inibitória mínima que variou entre 250µg, 500µg e 1000µg. Este resultado é relevante uma vez que bactérias Gram positivas são normalmente mais sensíveis a antibióticos do que as bactérias Gram negativas (MADIGAN; 2004). Isso se deve ao fato de que a membrana externa das bactérias Gram negativas é uma barreira que dificulta a entrada de várias moléculas de antibióticos e o espaço periplasmático contém enzimas que são capazes de degradar moléculas vindas de fora da célula (HOLETZ *et al.*, 2002). Além disso o antibiótico que atua sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, denominados de amplo espectro, têm uma maior aplicação médica do que aqueles que atuam apenas sobre um grupo de microrganismos.

Não existe consenso sobre o nível de inibição aceitável para os produtos naturais quando comparados com antibióticos que são utilizados na clínica médica, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos dos antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibição superiores. Aligianis *et al.* (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de CIM que considera como: inibição forte - CIM até 500 µg/mL, inibição moderada – CIM entre 600 e 1500 µg/mL e inibição fraca – CIM acima de 1600 µg/mL.

Padilha (2010) testando o extrato etanólico de *Mimosa arenosa* e *Mimosa tenuiflora* obteve valores da CIM na ordem de 0,18 mg/mL para linhagens de *Staphylococcus aureus* de origem hospitalar e ATCC 25923. Outro trabalho que utiliza taninos de *Mimosa arenosa* é o de Macedo-Costa (2009), que observou sua eficácia antimicrobiana frente às linhagens de *Streptococcus mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. oralis*, *Lactobacillus casei*, *Candida guilliermondi*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *Staphylococcus epidermidis*, onde os taninos de *Mimosa arenosa* produziram halos de 18 a 26 mm e apresentaram desempenho médio significativamente superior à clorexidina 0,12% (detergente catiônico com atividade antimicrobiana de largo espectro).

Politi (2011) ao analisar a ação de taninos isolados de *Endopleura uchi* contra linhagens de *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Shigella sonnei* (isolado clínico) e *Candida albicans* (ATCC 64548) não observou nenhuma inibição significativa do crescimento bacteriano, exceto uma pequena atividade dos extratos contra *S. aureus*. Entretanto, a autora observa que a partir do princípio que taninos formam complexos com as proteínas (HAGERMAN, A.E. 1978; HASLAM, E. 1996) é possível que esteja ocorrendo precipitação local, que impede os taninos de se difundirem no meio de cultura, com isso, mascarando sua atividade real, apesar da presença de Tween 80.

Quando se considera a utilização de outros fitoconstituintes e/ou outras espécies do gênero *Mimosa*, se observa que estes tem apresentado significativa atividade antimicrobiana, é o caso de flavonóides obtidos de *Mimosa pudica* que inibiram o crescimento de bactérias patogênicas Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* - halo inibição de 18.1 ± 0.15 e Gram-negativas como *Escherichia coli* MTCC 2961- halo inibição de 14.9 ± 0.11 , *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 4676 – halo de 11.0 ± 0.15 e *Salmonella typhi* MTCC 733 – halo de 14.1 ± 0.20 (DOSS A *et al.*, 2011).

Estes dados para flavonóides corroboram com os de Rosado-Vallado (2000) que identificou a ação antimicrobiana de *Mimosa pigra* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6338, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Candida albicans* ATCC 10231. A atividade

antibacteriana dos flavonóides ocorre provavelmente devido à sua capacidade de formar complexos solúveis com proteínas extracelulares e com a parede celular bacteriana (TSUCHIYA *et al.*, 1996).

Bezerra (2009) estudou o extrato etanólico de *M. tenuiflora* e observou halos de inibição que variaram de 6 a 25 mm frente a linhagens de *Staphylococcus aureus*. Das amostras testadas, as diluições de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32 apresentaram halos superiores ao halo mínimo de 12 mm estabelecido por Silva *et al.* (2003) para *S. aureus*, enquanto que as diluições 1:64; 1:128; 1:256; 1:512 apresentaram percentual de atividade de 92%, 72%, 28% e 0% respectivamente. Em estudos realizados por Pereira *et al.* (2009a), os extratos etanólicos de *M. tenuiflora* foram eficazes no tratamento de búfalas com diagnóstico de mastite clínica e subclínica, causada por cepas de *S. aureus* coagulase positiva e negativa.

Para o extrato hidroalcoólico de *M. tenuiflora*, Gonçalves *et al.* (2005) demonstraram que houve atividade sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa*, obtendo resultados que confirmam a sensibilidade destes microrganismos ao extrato da planta. Em 2006, o mesmo autor demonstrou a excelente atividade antimicrobiana do extrato de *M. tenuiflora* contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp coagulase negativa e outros microrganismos, formando halos de inibição de 23 e 12 mm respectivamente. A atividade antimicrobiana do extrato de *Mimosa tenuiflora* pode estar vinculada a presença de taninos e flavonóides como descrito por Meckes-Lozoya *et al.* (1990).

Genest (2008) demonstrou que os extratos metanólico e diclorometano de *M. pudica* apresentaram considerável atividade bacteriostática contra as cepas bacterianas de *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* resistentes à ampicilina, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (intervalo da CIM = 0,625-2,50 mg/mL).

Segundo Loguercio *et al.* (2005) o mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos explica-se por três hipóteses: i) os taninos inibem enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexam com os substratos dessas enzimas; ii) os taninos atuam sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo, iii) os taninos se complexam com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano.

Não há na literatura relatos de trabalhos que tenham avaliado a citotoxicidade de *Mimosa arenosa* nem de outras espécies desse gênero, assim como fitoconstituintes isolados dela, sendo este um trabalho pioneiro na determinação da citotoxicidade utilizando células sanguíneas.

Meckes-Lozoya *et al.* (1990b) relataram a atividade hemolítica do extrato bruto da casca do caule de *Mimosa tenuiflora*. Neste caso, a atividade hemolítica foi atribuída as saponinas triterpênicas presentes no extrato que induziram a ruptura da membrana dos eritrócitos (BANERJI *et al.*, 1981). Estudos realizados em 1992 detectaram um efeito hemolítico em baixas concentrações do extrato metanólico de *M. tenuiflora* que continha alcalóides e um efeito hemaglutinante em doses elevadas (HEINRICH *et al.*, 1992).

A avaliação do potencial citotóxico dos taninos de *Mimosa arenosa* demonstrou que estes não possuem a capacidade de causar danos na membrana eritrocitária de três tipos sanguíneos do sistema ABO, que levam ao rompimento e conseqüente morte da célula (Tabela 2, Gráficos 2, 3 e 4). Isto é de extrema importância visto que os eritrócitos desempenham papel fundamental no transporte de gases (O₂ e CO₂) e no controle da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no organismo.

A integridade da membrana celular depende do tônus celular e de substâncias que podem interferir na matriz da membrana (MOUSINHO *et al.*, 2008). Várias substâncias podem modificar esse equilíbrio e se torna importante avaliar este potencial quando uma substância é candidata a aplicações farmacológicas.

A fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) avalia a influência qualitativa de substâncias sobre os eritrócitos (MOUSINHO *et al.*, 2008) e expressa à habilidade das membranas manterem sua integridade estrutural quando expostas a um estresse osmótico (ALDRICH, 2006).

A osmolaridade com que a célula sofre lise esta relacionada a fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores intrínsecos destacam-se a razão área/volume, forma e tamanho celular, espécie e propriedades inerentes às membranas. Segundo Maede (1980), em pacientes humanos a FOE é influenciada pela quantidade de colesterol presente na membrana citoplasmática, este fator torna os eritrócitos mais resistentes à medida que aumenta o nível de colesterol sanguíneo. Eritrócitos nucleados são mais

resistentes que eritrócitos não-nucleados. Os eritrócitos maiores são proporcionalmente mais resistentes que eritrócitos menores (RODRIGUES, 2009).

Alguns autores têm descrito que algumas drogas assim como alguns fitoconstituintes são capazes de induzir alterações na forma e fisiologia dos eritrócitos (AMMUS; YUNIS, 1989; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Os taninos de *Mimosa arenosa* não apresentaram efeito sobre a fragilidade osmótica da membrana e portanto não modificaram as propriedades fisiológicas dos eritrócitos humanos (Gráficos 5, 6 e 7).

Na última década, uma vasta gama de técnicas analíticas tem sido desenvolvidas para medir a atividade antioxidante de extratos vegetais e plantas (BRANDWILLIAMS, 1995; PRIETO, 1999). A procura por antioxidantes de fontes naturais tem recebido muita atenção e vários esforços têm sido investidos para identificar compostos que possam agir como antioxidantes satisfatórios para substituir os sintéticos (WONG; LEONG; KOH, 2006).

Alguns estudos (EINBOND *et al.*, 2004; BANERJEE *et al.*, 2005; CHOI *et al.*, 2006) relatam que muitas atividades biológicas, tais como a antioxidante e antimicrobiana, são devidas ao teor de fenóis totais, como taninos e flavonóides.

Nesse estudo foi identificado que os taninos de *Mimosa arenosa* não causam oxidação da hemoglobina após sua exposição por lise das membranas eritrocitárias (Tabela 4, Gráfico 8), isto é um dado importante tendo em vista que, a oxidação da hemoglobina leva a formação de radicais livres que podem causar danos as demais células e sistemas do organismo humano (SIEMS, 2000).

Os eritrócitos podem ser considerados como sequestradores de radicais livres, pois eles podem fornecer proteção antioxidante não só para si mas também para outros tecidos e órgãos do corpo (MENDIRATTA, 1998; SIEMS, 2000). Apesar de possuir uma forma muito eficaz e poderoso sistema antioxidante, o ferro ferroso da hemoglobina é exposto continuamente a altas concentrações de oxigênio levando à sua oxidação lenta para metahemoglobina (MetHb, também conhecido como ferrihemoglobina). Ao contrário de sua forma reduzida, MetHb é incapaz de ligar ou transportar

oxigênio. Em condições normais, o nível de MetHb em eritrócitos é mantida com menos de 1% do total de hemoglobina.

Os eritrócitos humanos constituem um poderoso sistema que pode ser utilizado como um modelo experimental *in vitro* para investigar o potencial antioxidante de extratos vegetais a partir da quantificação da metHb formada (CLARO *et al.*, 2005; ARBOS *et al.* 2008). Deve-se ter em mente, entretanto, que atividades antioxidantes observadas em eritrócitos não necessariamente refletem as atividades antioxidantes do organismo como um todo. Além disso, existem variações genéticas entre os indivíduos que resultam em expressão gênica alterada levando a efeitos variados e potencialmente indesejados na atividade antioxidante (ARBOS *et al.* 2008).

Os taninos de *M. arenosa* protegeram os eritrócitos da ação oxidativa da fenilhidrazina, um reconhecido agente oxidante, em todas as concentrações testadas e de forma mais eficiente que a vitamina C, um comprovado agente antioxidante (Tabela 5, Gráfico 9). Este resultado corrobora outros dados da literatura que afirmam que taninos possuem atividade antioxidante. Entretanto a maioria dos trabalhos relatam a presença de taninos associados a outros metabólitos secundários fenólicos, como os flavonóides. Substâncias fenólicas são reconhecidamente detentoras de atividade antioxidante, atuando como seqüestradores de radicais livres e como quelantes de metais (PESSUTO, 2009).

Zambelli (2006) utilizou o método seqüestrador de radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) para observar a atividade antioxidante de taninos totais de *Syzygium malaccense*. O DPPH é um radical livre que pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável. Com isso, a autora identificou que os taninos presentes nas frações acetato de etila, metanólica e no extrato bruto de *Syzygium malaccense* possuíam atividade antioxidante.

Em seu trabalho, Souza (2007) analisou a atividade antioxidante de taninos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae) nas frações etanólica, acetona-água e clorofórmio frente ao DPPH. Desta forma, a determinação da capacidade de seqüestro de radicais livres indicou que os extratos polares têm potencial maior do que o extrato obtido com clorofórmio, para captar os radicais DPPH. Esta atividade

antioxidante apresentada pelos extratos polares parece ser devida à constituição e teor de compostos fenólicos da classe dos taninos presentes na casca de *S. adstringens*.

Pessuto (2009) avaliou o potencial antioxidante de extratos e de taninos condensados isolados das folhas de *M. ilicifolia* pelo método de DPPH e observou que a fração acetato de etila apresenta capacidade antioxidante, significativa, em comparação aos extrato bruto e fração aquosa, devido, possivelmente, ao conteúdo em substâncias polifenólicas. A capacidade antioxidante relativa ou total da fração acetato de etila foi estatisticamente comparável à vitamina C, um reconhecido agente antioxidante, o que denota o potencial desta fração, provavelmente pela presença dos taninos condensados.

Estes resultados foram confirmados por outros investigadores. Okamura *et al.* (1993) demonstraram que taninos presentes em *Eucalyptus sp.* têm potencial atividade antioxidante. Bors *et al.* (2000) demonstraram a atividade antioxidante de proantocianidinas e taninos hidrolisáveis presentes no vinho tinto e no chá verde.

A avaliação da toxicidade e genotoxicidade de produtos naturais é um passo fundamental para que as indústrias farmacêuticas liberem no mercado um novo agente terapêutico (MARSIGLIA, 2011).

A identificação de substâncias capazes de induzir mutações é de grande interesse uma vez que elas podem comprometer a linhagem de células germinativas levando a problemas de fertilidade e a mutações nas futuras gerações. As mutações podem ocorrer como mutações gênicas onde uma única base é modificada (transição/transversão) ou uma ou algumas poucas bases são inseridas ou deletadas (modificação na estrutura de leitura), como grandes deleções ou rearranjos de DNA, como quebras e/ou rearranjos cromossômicos e ainda como ganho ou perda de cromossomos inteiros. As mutações gênicas são quantificadas em bactérias e em outros sistemas celulares quando elas promovem uma modificação nas exigências para a sua multiplicação (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Os taninos são descritos na literatura como antimutagênicos (DAUER *et al.*, 2003), antioxidantes (HASLAM, 1996) e antitumorais (SALEEM *et al.*, 2002), entre outros. No entanto, eles também apresentam potencial pró-oxidante (LABIENIEC *et al.*, 2003). Na presença de certos íons metálicos, os

taninos são pró-oxidantes, citotóxicos e genotóxicos. A atividade genotóxica de taninos em células de mamíferos é causada por quebras fita-simples (LABIENIEC; GABRYELAK, 2003).

O teste de mutagenicidade ou teste de Ames foi especificamente desenvolvido para detectar mutagênese induzida quimicamente e é amplamente utilizado para identificar substâncias que podem produzir alterações genéticas que levam a mutações gênicas. Um composto é considerado mutagênico quando o aumento na dose está diretamente relacionado com o aumento no número de colônias mutantes em uma ou mais linhagens de *Salmonella thyphimurium* dependentes de histidina (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

O teste de Ames é mundialmente utilizado como um método de triagem para determinar o potencial mutagênico de novos compostos químicos e drogas uma vez que existe uma alta associação entre respostas positivas em testes de toxicidade genética e carcinogenicidade, tanto em roedores como no homem (MCCANN *et al.*, 1975; PURCHASE *et al.*, 1978; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Estudos realizados por Ferreira & Vargas (1999) com plantas utilizadas na medicina popular no sul do Brasil, indicaram que no ensaio com *S. thyphimurium* os extratos de *Myrciaria tenella* Berg. (Myrtaceae), *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae), *Tripodanthus acutifolius* Tiegh. (Loranthaceae) e *Cassia corymbosa* Benth. (Leguminosae), apresentaram atividade mutagênica, provavelmente devido à presença de flavonóides, taninos e antraquinonas nos extratos.

Horn e Vargas (2003) analisaram o efeito mutagênico e antimutagênico do extrato aquoso de duas plantas utilizadas na medicina popular brasileira (*Maytenus ilicifolia* e *Peltastes peltatus*) com grande quantidade de flavonóides e taninos em sua constituição, nas concentrações de 25, 75, 125, 250, 375 e 500 mg/placa. Foi observado que as infusões de *M.ilicifolia* e *P.peltatus* apresentaram um efeito mutagênico sinérgico na presença de 4NQO, aumentando a atividade mutagênica em ambos os frameshift e a substituição de pares de bases nos ensaios de mutagenicidade, além de produzir citotoxicidade. O efeito sinérgico foi maior na linhagem TA100, em ambas as espécies, sendo demonstrado em várias concentrações.

Della Torre (2011) investigou a mutagenicidade do extrato hidroalcoólico de *Plathymania reticulata* Benth (LEGUMINOSEAE) frente às linhagens de *Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100 e TA102. Espécies desta família são conhecidas por apresentarem altas taxas de flavonóides e taninos em sua constituição. O extrato hidroalcoólico foi mutagênico para a linhagem TA98, o que segundo o autor pode ser um dado clinicamente relevante, pois um dos usos populares desta espécie é em casos de diarreia ou disenterias (POTT, 2004). O extrato de *P. reticulata* também mostrou sinais de mutagenicidade para TA97 e TA102.

Os taninos de *M. arenosa* não foram tóxicos para as linhagens de *S. typhimurium*, principalmente na concentração de 500 µg onde estes não foram capazes de induzir mutações. Entretanto na concentração de 1000 µg foi observado um acentuado aumento no número de colônias revertentes indicando que os taninos apresentam potencial para induzir mutações gênicas por transição, transversão, ou modificação na estrutura de leitura (Tabela 6).

A pré-incubação com os taninos de *M. arenosa* reduziram o número de revertentes induzidos pela NQNO, um comprovado agente mutagênico, indicando que estes possuem atividade anti-mutagênica (Tabela 7).

O teste de micronúcleo em células da medula óssea de roedores tem sido amplamente empregado e aceito pelas agências reguladoras e comunidade científica como parte da avaliação de segurança de um produto (CHOY, 2001; MATEUCA *et al.*, 2006, VALADARES *et al.*, 2007). O teste de micronúcleo é um método utilizado para avaliar a capacidade de substâncias para induzir danos cromossômicos nas células em diferentes estágios de divisão na medula óssea (FENECH, 1997).

As células micronucleadas formadas na medula óssea na presença de agentes clastogênicos podem ser detectadas no sangue periférico de camundongos. O teste de micronúcleo em sangue periférico apresenta várias vantagens, tais como: facilidade na preparação da amostra com pequena quantidade de sangue, facilidade na contagem, avaliação em vários intervalos utilizando o mesmo animal, avaliação de efeitos cumulativos e detecção rápida (VIKRAM *et al.*, 2007)

Os taninos de *M. arenosa* não induziram aumento na frequência de micronúcleos em eritrócitos de camundongo e portanto não são capazes de induzir dano cromossômico estrutural e/ou numérico (Tabela 8, Figura 2).

6 CONCLUSÕES

Na investigação citotóxica e genotóxica dos taninos das cascas do caule de *Mimosa arenosa* (Willd.) Poir. em células procarióticas e eucarióticas, pode-se concluir que:

- ✓ Os taninos de *M. arenosa* inibiram o crescimento das linhagens bacterianas de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, agindo portanto sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas sendo o seu efeito bacteriostático.
- ✓ O gênero *Staphylococcus* foi o mais sensível e *Pseudomonas* o mais resistente a ação antibacterina dos taninos.
- ✓ Os taninos de *M. arenosa* não induziram hemólise e portanto não causaram danos a membrana celular dos eritrócitos humanos dos três tipos sanguíneos testados.
- ✓ Os taninos de *M. arenosa* não induziram a formação de metahemoglobina e portanto não apresentaram efeito oxidante em nenhuma das concentrações testadas. Por outro lado, apresentaram efeito anti-oxidante e maior que o efeito da vitamina C.
- ✓ Os taninos de *M. arenosa* não apresentaram efeito sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos humanos e portanto não modificaram as propriedades fisiológicas da membrana celular.
- ✓ Os taninos de *M. arenosa* na concentração de 1000 µg aumentaram o Índice de Mutagenicidade em todas as linhagens de *S. thiphymurium* testadas, portanto apresentaram potencial mutagênico.
- ✓ Os taninos de *M. arenosa* apresentaram potencial anti-mutagênico desde que foram capazes de reduzir o número de revertentes nas

linhagens TA 97, TA 98, TA 100 e TA102 de *S. thiphymurium* induzidos pela 4-nitroquinolina-1-óxido.

- ✓ Os taninos de *M. arenosa* nas concentrações de 1000 e 2000 mg/Kg e nas condições testadas não induziram danos cromossômicos estrutural e/ou numérico em eritrócitos de camundongo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn**, 18, 472-508, 2008.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. *Molecular Biology of The Cell*. New York & London: Garland Publishing Inc. 2002.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS-NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **J Ethnopharmacol**, 114, 325-354, 2007.

ALDRICH, K.; SAUNDERS, D. K. Comparison of erythrocyte osmotic fragility among ectotherms and endotherms at three temperatures. **Journal of Thermal Biology**, 26, 179 – 182, 2006.

ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species, **J. Agric. Food Chem.** v. 49, p.4168-4170, 2001.

ALVES, R. R. N.; ROSA, I. L. Why study the use of animal products in traditional medicines? **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.** v.1; n.5, p. 1-5, 2005.

AMES, B.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research**, 31, 347-364, 1975.

AMMUS, S.; YUNIS, A. Drug-induced red cell dyscrasias. **Blood Rev**, 3, 71-82, 1989.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. In: **Animais de laboratório: criação e experimentação**, Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 255-262, 2006.

ANYINAM, C. Ecology and ethnomedicine: exploring links between current environmental crises and indigenous medical practices. **Social Science Medicine**, v.40, n. 3, p. 321-329, 1995.

ARBOS, K. A.; CLARO, L. M.; BORGES, L.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, M. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. **Nutrition Research**, v. 28, p. 457-463, 2008.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**. v. 78, p. 431-441, 2005.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N. B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chem**, 90, 727-33, 2005.

BANERJI, R.; PRAKASH, D.; MISRA, G.; NIGAM, S. K. Cardiovascular and hemolytic activity of Saponins. **Indians Drugs**, 52, 121-124, 1981.

BARNEBY, C. R. The genus *Mimosa* (Mimosoideae) in Bahia, Brazil: new taxa and nomenclatural adjustments. **Brittonia**. 37, 125-153, 1985.

BARNEBY, C. R. *Sensitivae Censitae*. A description of the genus *Mimosa* L. (Mimosaceae) in the New World. New York Botanical Garden, 65, 1-835, 1991.

BATISTA, M. T. A.; RODRIGUES, H. G.; FONSECA, L. C.; BONETTI, A. M.; PENHA-SILVA, N.; NERES, A. C.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Estudo dos efeitos do pesticida da classe glicina substituída sobre eritrócitos humanos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 3 (supl.)(2), 22-24, 2007.

BEZERRA, D. A. C.; PEREIRA, A. V.; LÔBO, K. M. S.; RODRIGUES, O. G.; ATHAYDE, A. C. R.; MOTA, R. A. *et al.* Atividade biológica da jurema-preta

(*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn**, 19(4), 2009.

BORS, W.; MICHEL, C.; STETTMALER, K. Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters. **Arch. Biochem. Biophys**, New York, v.374, n.2, p.347-355, 2000.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 248-254, 1976.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Failure of the standard battery of short-term tests in detecting some rodent and human genotoxic carcinogens. **Toxicology**, n. 196, p. 1-19, 2004.

BRANDÃO, R.; LARA, F.S.; PAGLIOSA, L.B.; SOARES, F.A.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C. W.; FARINA, M. Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. **Drug Chem Toxicol**, v. 28, p. 397-407, 2005.

BRANDWILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Sci Technol**, 28, 25-30. 1995.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE Nº 90, de 16 de março de 2004. Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br> Acesso em: 18 dez. 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada Nº 20, de 05 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação.

BRUNETON, J. *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*, Ed. Acribia, SA: Espanha, 1991.

CAMARGO-RICALDE, S. L.; GREYER, R.; MARTÍNEZ-BERNAL, A.; GARCÍA-GARCÍA, V.; BARRIOS DEL ROSAL, S. Especies útiles del género *Mimosa* (Fabaceae Mimosoideae) en México. **Bol Soc Botán Mex**, 68, 33–44, 2001.

CAMARGO-RICALDE, S. L.; DHILLION, S. S. The cultural and ecological roles of mimosa species in the Tehuacan-Cuicatlan Valley, Mexico. *Econ Bot* 59:390–394. 2005.

CAMARGO, T. M., ALVES, M. I. F., OLIVEIRA, S. J., OSHIMA-FRANCO, Y. Estudo comparativo entre duas técnicas de dosagem de metemoglobina (MHb). **RBAC**, v.39, p. 95-98, 2007.

CAMPOS, E. Medicina popular do nordeste: superstições, crendices e mezinhas. **Coleção razão e além de casos de coisas desse nosso estranho universo**. Rio de Janeiro, edições O Cruzeiro, Vol. 4, 3ª ed, 1967.

CANALES, M.; HERNANDEZ, T.; CABALLERO, J.; VIVAR, A. R.; AVILA, G.; DURAN, A.; LIRA, R. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlan, Puebla, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 97, 429–439, 2005.

CAO, G.; BOOTH, S. L.; BOOTH, S. L.; PRIOR, R. L. Food-borne nitrates and nitrites as a cause of methemoglobinemia. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 27, p. 189-192, 1996.

CARAMORI, P. H.; ANDROCIOLO FILHO, A.; LEAL, A. C. Coffee shade with *Mimosa scabrella* Benth. for frost protection in southern Brazil. **Agrof Syst**, 33, 205–214, 1996.

CARNEIRO, G.; RIBEIRO FILHO, F. F.; TOGEIRO, S. M.; TUFIK, S.; ZANELLA, M. T. Interações entre síndrome da apnéia obstrutiva do sono e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 51 (7), 1035-1040b, 2007.

CAVALCANTI, T. C.; GREGORINI, C. G.; GUIMARÃES, F.; RETTORI, O.; VIEIRA-MATOS, A. N. Changes in red blood cell osmotic fragility induced by total plasma and plasma fractions obtained from rats bearing progressive and regressive variants of the Walker 256 tumor. *Braz J Med Biol Res*, 36, 887-895, 2003.

CELZARD, A.; FIERRO, V.; AMARAL-LABAT, G.; PIZZI, A.; TORERO, J. Flammability assessment of tannin-based cellular materials. **Polymer Degradation and Stability**, 96, 477-482, 2011.

CHOI, Y. M.; NOH, D. O.; CHO, S. Y.; SUH, H. J.; KIM, K. M.; KIM, J. M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*, 39, 756-61, 2006.

CHOY, W. N. Regulatory genetic toxicology tests. In, Choy, W. N (ed) Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. New York: Marcel Dekker, p. 93–113, 2001.

CHUNG, K.; WEI, C.; JOHNSON, M. G. *Trends Food Sci. Technol*, 9, 168, 1998.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, 432, 829–837, 2004.

CLARK, A. M. Natural products as a resource for new drugs. **Pharmaceutical Research**. v. 13, n. 8, p. 1133-1144, 1996.

CLARO, L. M.; LEONART, M. S.; COMAR, S. R. NASCIMENTO, A. J. Effect of vitamins C e E on oxidative process in human erythrocytes. **Cell Biochem. Funct.** V. 24, p. 531-535, 2005.

COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. **Science**, v. 257, p. 1050-1055, 1992.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug Discovery and development. **J Nat Prod**, 60, 52-60, 1997.

DACIE, J.; LEWIS, S. M. **Practical Haematology**. London: Churchill Livingstone. 2001.

DAUER, A.; HENSEL, A.; LHOSTE, E.; KNASMÜLLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V. Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. In metabolically competent, human hepatoma cells (HEP G2) using single cell gel electrophoresis. **Phytochemistry**, 63, 199–207, 2003.

DAVIS, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science**, v. 264, p. 375-382, 1994.

DELLA TORRE, A.; ALBUQUERQUE, L. B. L.; FARRAPO, N. M.; OSHIMA-FRANCO, Y.; SANTOS, M. G.; TAVARES, R. V. S.; RODAS, A. C. D.; DAL BELO, C. A.; CARDOSO, C. R. P.; VARANDA, E. A.; GROPPA, F. C.; LOPES, O. S. Mutagenicity induced by the hydroalcoholic extract of the medicinal plant *Plathymenia reticulata* Benth. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis**, v 17, 2, 2011.

DEMIREZER, Ö. L.; UZ-KURUÜZÜM, A.; BERGERE, I.; SCHIEWE, H. J.; ZEECK, A. The structures of antioxidant and citotoxic agents from natural source: anthraquinones and tannins from roots of *Rumex patientia*. **Phytochemistry**, New York, v.58, p.1213-1217, 2001.

DE QUEIROZ, L. P. Leguminosas da Caatinga. Feira de Santana, Brazil: UEFS, RBG-Kew, APNE, PPBio. SIMON, M. F (2009) Systematics and evolution of Mimosa L. (Leguminosae) and the assembly of a Neotropical plant diversity hotspot. PhD Thesis, Oxford University, London. 2009.

DE SMET, P. A. G. M. Health risks of herbal remedies: an update. **Clin. Pharmacol. Ther**, 76: 1–17, 2004.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 33, p. 166-168, 2002.

DIEHL, M. S.; ATINDEHOU, K. K.; TERE, H.; BETSCHART, B. Prospect for antihelminthic plants in the Ivory Coast using ethnobotanical criteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 277–284, 2004.

DOSS, A *et al.* Antimicrobial effects of the Flavonoid fractions of *Mimosa pudica* L. Leaves. **Journal of Pharmacy Research**, 4(5), 1438-1439, 2011.

DUCKE, A. As leguminosas de Pernambuco e Paraíba. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 51, 417-461, 1953.

DU PUY, D. J.; LABAT, J. N.; RABEVOHITRA, R.; VILLIERS, J. F.; BOSSER, J.; MOAT, J. The Leguminosae of Madagascar. **Royal Botanic Gardens, Kew**. 2002.

EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X. D.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chem**, 84, 23-8, 2004.

FAULKNER, D. J. **Marine pharmacology**. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 77, 135–45, 2000.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, p. 759-767, 1990.

FERREIRA, I. C. D. F.; VARGAS, V. M. F. Mutagenicity of medicinal plant extracts in Salmonella/microsome assay. **Phytother. Res**, 13 (5), 397–400, 1999.

FERRO, A. F. P.; BONACELLI, M. B. M; ASSAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: o uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão & Produção**. v. 13, n. 3, p.489-501, 2006.

FIRMINO, C. B. Influência da idade de doadoras humanas sobre a estabilidade de seus eritrócitos. **Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia**, Brasil, 89pp, 2007.

FLORENCE, F.; MARCEL, J.; MARIO, D.; MARC, D. Marine natural products as targeted modulators of the transcription factor NF-kB. **Biochemical Pharmacology**, 75, 603-617, 2008.

GENEST, S.; KERR, C.; SHAH, A.; RAHMAN, M. M.; SAIF-E-NASER, G. M.; NIGAM, P *et al.* Comparative bioactivity studies on two *Mimosa* species. **Blacpma**, 7, 38-43, 2008.

GERHARDT, P. editor-in-chief; MURRAY, R.G.E.; WOOD, W.A.; KRIEG, N.R. **Methods for general and molecular bacteriology**, Washington, American Society for Microbiology, p. 791,1994.

GHOSH, S.; PLAYFORD, R. J. Bioactive natural compounds for the treatment of gastrointestinal disorders. **Clinical Science**. v.104, p. 547-556, 2003.

GONÇALVES, C. A.; LELIS, R. C. C. Teores de taninos da casca e da madeira de cinco leguminosas arbóreas. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n.1, p.167 - 173, 2001.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq Inst Biol**, 72, 353-358, 2005.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Efeitos antimicrobianos de algumas árvores medicinais nativas nas conjuntivites infecciosas. **Biologico**, 68, 134-139, 2006.

GOUVÊA-E-SILVA, L. F. Caracterização da estabilização de eritrócitos por etanol. **Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil**, 53pp, 2006.

GULLO, V.; HUGHES, D. E. Exploiting new approaches for natural product drug discovery in the biotechnology industry. **Drug Discovery Today**. v. 2, n. 3, p. 2005.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **J. Agric. Food Chem**, 26, 809–812, 1978.

HAGERMAN, A. E.; RICE, M. E.; RITCHARD, N. T. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin¹⁶ (4–8) catechin (procyanidin). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 2590–2595, 1998.

HARVEY, A. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? **TIPS**, v. 20, p. 196-198, 1995.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **J. Nat. Prod**, 59, 205–215, 1996.

HASLAM, E. *Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action*. Cambridge: **Cambridge University Press**, p.307-315, 1998.

HAYASHI, M.; TICE, R. R.; MACGREGOR, J. T.; ANDERSON, D.; BLAKEY, D. H.; KIRSCH-VOLDERS, M. OLESON, F. B. JR; PACCHIEROTTI, F.; ROMAGNA, F.; SHIMADA, H.; SUTOU, S.; VANNIER, B. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mut. Res**, v. 312, p. 293-304, 1994.

HEINRICH, M.; KUHNT, M.; WRIGHT, C. W.; RIMPLER, H.; PHILLIPSON, J. D.; SCHANDELMAIER, A.; WARGURST, D. C. Parasitological and Microbiological Evaluation of Mixe Indian Medicinal Plants (Mexico). **J Ethnopharmacol**, 36, 81-85, 1992.

HEMINGWAY, R. W.; KARCHESY, J. J. Proceeding of the first north American tannin conference. New York: **Plenum Press**. 1989.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 97, 1027-1031, 2002.

HOLMSTEDT, B.; BRUHN, J. G. Ethnopharmacology – a challenge. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 8; n. 3, p. 251-256, 1983.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HORN, R. C.; VARGAS, V. M. F. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the Salmonella/microsome assay. **Mutagenesis**, 18 (2), 113–118, 2003.

HUBNER, Y.; HOETTGES, K. F.; KASS, G. E.; OGIN, S. L.; HUGHES, M. P. Parallel measurements of drug actions on erythrocytes by dielectrophoresis, using a three-dimensional electrode design. **IEE Proc Nanobiotechnol**, 152, 150-154, 2005.

IGNARO, L. J.; CIRINO, G. CASINI, A.; NAPOLI, C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: in overview. **J. of Cardiovascular Pharmacology**, v. 34, p.879-886, 1999.

IVANOV, I.; TOLEKOVA, A.; CHAKAAROVA, P. Erythrocyte membrane defects in hemolytic anemias found through derivative thermal analysis of electric impedance. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 70, 641-648, 2007.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. v. 28, n.3, p.519-528, 2005.

KARAMAN, I.; SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖGÜTÇÜ, H.; SENGUL, M.; ADIGÜZEL A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **J. Ethnopharmacology**, v.2837, p. 1-5, 2003.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. **Nat Rev Drug Discov**, 4, 206-220, 2005.

KRAUS, T. E. C.; YU, Z.; PRESTON, C. M.; DAHLGREN, R. A.; ZASOSKI, R. J. Z. Linking chemical reactivity and protein precipitation to structural characteristics of foliar tannins. **Journal of Chemical Ecology**, 29, 703–730, 2003a.

KRAUS, T. E. C.; ZASOSKI, R. J.; DAHLGREN, R. A.; HORWATH, W. R.; PRESTON, C. M. Carbon and nitrogen dynamics in a forest soil amended with purified tannins from different plant species. **Soil Biology & Biochemistry**, 36, 309–321, 2004.

KUMAR, R.; HORIZOME, R. Fractionation, characterization, and protein-precipitating capacity of the condensed tannins from *Robinia pseudo acacia* L. leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 34, 487–489, 1986.

LABIENIEC, M.; GABRYELAK, T. Effects of tannins on Chinese hamster cell line b14. **Mutat. Res.** 539, 127–135, 2003.

LEONARD, S. S.; CUTLER, D.; DING, M.; VALLYATHAN, V.; CASTRANOVA, V.; SHI, X. Antioxidant properties of fruit and vegetable juices: more to the story than ascorbic acid. **Ann. Clin. Lab. Sci.** v. 32, p. 193-200, 2002.

LEWIS, G. P. Legumes of Bahia. **Royal Botanic Gardens**, Kew, 369p. 1987.

LEWIS, G. P. Leguminosae *In*: Flora of the Pico das Almas Chapada Diamantina- Bahia, Brazil. **Royal Botanic Gardens**, Kew. Pp. 368-394, 1995.

LEWIS, G. P. Leguminosae subfamília Mimosoideae. *In*: BARBOSA, M. R. V.; SOTHERS, C.; MAYO, S.; GAMARRA-ROJAS, C. F. L.; MESQUITA, A. C. *Checklist* das plantas do Nordeste brasileiro: angiospermas e gymnospermas. Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília. Pp. 86-90, 2006.

LI, J. W.; VEDERAS, J. C. **Science**, 325, 161-165, 2009.

LIANG, J. B.; KHAMSEKHIEW, B. Binding affinity of condensed tannins for protein complexes of selected *Leucaena* species. *In*: Proceedings of the XIIth AAAP **Animal Science Congress**. September 18–22, BEXCO, Busan, Korea, p. 269, 2006.

LINNAEUS, C. *Mimosa*. *In*: Species plantarum. Impensis Laurentii Salvii. Pp. 516-523, 1753.

LOGUERCIO A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v.35, n.2, 2005.

LONG, L. H.; HALLIWELL, B. Oxidation and Generation of Hydrogen Peroxide by Thiol Compounds in Commonly Used Cell Culture Media. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, vol. 286, pp. 991–994, 2001.

LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Estudo físico-químico, químico e biológico de extratos de cascas de *Stryphnodendron*

polyphyllum Mart., Leguminosae. **Rev. Bras. Farmacogn**, Maringá, v.13, supl.2, p.24–27, 2003.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa. 2000a.

MACEDO-COSTA, M. R.; PEREIRA, M. S. V. *et al.* Ação antimicrobiana de Taninos isolados de *Mimosa tenuiflora* e *Mimosa arenosa* sobre microrganismos bucais. **Braz Oral Res**, 23(Suppl.1), 319-52, 2009.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J. The Bacteria. In: **Brock – Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prantice Hall. 718-814, 2004.

MAEDE, Y. Studies on feline haemobartonellosis. VI. Changes of erythrocyte lipids concentration and their relation to osmotic fragility. **Japanese Journal of Veterinary Science**, 42 (3), 281-288, 1980.

MAKINDE, M. O.; BOBADE, P. A. Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites. **Research in Veterinary Science**, 57 (3), 343-348, 1994.

MANSOURI, A.; LURIE, A. A. Concise review : methemoglobinemia. **Am J. Hematol.** v. 42, p. 7-12, 1993.

MARIGLIANO, V.; TARZIA, A.; MODESTI, D.; MASELLA, R.; CANTAFORA, A.; BAUCO, C.; SALVATI, A. M.; SCUTERI, A.; CAPRARI, P. Aging and red blood cell membrane: a study of centenarians. **Experimental Gerontology**, 34 (1), 47-57, 1999.

MARINHO, I. V. Avaliação do potencial tanífero das cascas do angico vermelho *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *colubrina* (Vell.) Brenan e do cajueiro *Anacardium occidentale* Linn. em diferentes reagentes. 2004. 36f. **Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Campina Grande**, Patos, 2004.

MARSIGLIA, J. D. C.; LOSS, A. C. C.; STANGE, V. S.; BELCAVELLO, L.; LUZ, A. C.; BATITUCCI, M. C. P. Avaliação dos efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Solanum cordifolium* Dunal e *Solanum torvum* Sw. **Natureza on line**, 9 (1), 30-34, 2011.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P. V. Chromosomal changes, induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, 88, 515-531, 2006.

MAZZANTI, L.; FRANCESCHI, C.; NANETTI, L.; SALVOLINI, E.; STAFFOLANI, R.; MORETTI, N.; RABINI, R. A. Reduced susceptibility to peroxidation of erythrocyte plasma membranes from centenarians. **Experimental Gerontology**, 37, 657-663, 2002.

MCCANN, J.; CHOI, E.; YAMASAKI, E.; AMES, B. N. Detection of carcinogens and mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol.72, n. 12, p. 5135-5139, 1975.

MCCURDY, C. R.; SCULLY, S. S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sciences**, 78, 476– 484, 2005.

MECKES-LOZOYA, M.; LOZOYA, X.; MARLES, R. J.; SOUCY BREAU, C.; SEN, A.; ARNASON, J. T. N,N-Dimethyltryptamine alkaloid in *Mimosa tenuiflora* Bark (Tepescohuite). **Arch Inv Med**, 2, 175-177, 1990.

MECKES-LOZOYA, M.; LOZOYA, X.; GONZALEZ, J. Propriedades farmacológicas in vitro de algunos extractos de *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite). **Archivos de Investigacion Medica**, 21, 163-169, 1990b.

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. Em **Farmacognosia: da planta ao medicamento**; Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed., 2001.

MENDIRATTA, S.; QU, Z. C.; MAY, J. M. Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood. **Free Radic Biol Med**, 24, 789-97, 1998.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA-JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C.W. Flora vascular do bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora**, Vol 2. Brasília, Brazil: Embrapa, Embrapa Cerrados / Embrapa Informação Tecnológica, 421–1279, 2008.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Res**, 15, 127- 130, 2001.

MITIDIERO, A. M. A. Potencial do uso de homeopatia, bioterápicos e fitoterapia como opção na bovinocultura leiteira: avaliação dos aspectos sanitários e de produção. 132f. **(Dissertação - mestrados em Agroecossistemas) Universidade Federal de Santa Catarina**. Florianópolis, SC , Brasil, 2002.

MISHRA, K. P.; GANJU, L.; SAIRAM, M.; BANERJEE, P. K.; SAWHNEY, R. C. A review of high throughput technology for the screening of natural products. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 62, 94-98, 2008.

MONKS, A.; SCUDIERO, D. A.; JOHNSON, G. S.; PAULL, K. D.; SAUSVILLE, E. A. The NCI anti-cancer drug screen: a smart screen to identify effectors of novel targets. **Anticancer Drug Des**, 12, 533-41, 1997.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mut. Res.** v. 455, p. 29-60, 2000.

MOUSINHO, K.C.; CORREIA, M. B. L.; SILVA, J. O.; MAGNATA, S. S. L. P.; SOUZA, I. A.; CATANHO, M. T. J. A. Effect of the extract of *Ricinus communis*

L. on the osmotic fragility, labeling of red blood cells with technetium-99m and morphology of the cells. **Braz. arch. biol. technol.** v. 51, p. 1139-1146, 2008.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K. MEMBRANAS: ESTRUTURA, MONTAGEM E FUNÇÃO. IN: GRANNER, D. K.; MAYES, P. A. & RODWELL, V. W. (Eds). **Harper: Bioquímica.** 9ª ed. Atheneu Editora, São Paulo, Brasil, p.505-533, 2002.

NAGLE, D. G.; ZHOU, Y. D.; MORA, F. D.; MOHAMMED, K. A.; KIM, Y. P. Mechanism targeted discovery of antitumor marine natural products. **Curr Med Chem**, 11, 1725–56, 2004.

NASCIMENTO, G. F. G.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NASUTI, C.; CANTALAMESSA, F.; FALCIONI, G.; GABBIANELLI, R. Different effects of type I and type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. **Toxicology**, 191 (2), 233-244, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat Prod Rep**, 17, 215-34, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **J Nat Prod**, 67,1216–38, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**. v. 70, p. 461-477, 2007.

NIKI, E.; YAMAMOTO, Y.; KOMURO, E.; SATO, K. Membrane damage due to lipid oxidation. **Am J Clin Nutr**, v. 53, p. S201-S205, 1991.

NUNES, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F. F. M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa*

paraibana Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 18 (Supl.), 718-723, 2008.

OKAMURA, H.; MIMURA, A.; NIWANO, M.; YOKAHARA, Y. Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalypto rostrata*. **Phytochemistry**, New York, v.33, n.3, p.557-561, 1993.

OKEKE, I. N.; LAXMANINARAYAN, R.; BHUTTA, Z. A.; DUSE, A. G.; JENKINS, P.; O'BRIEN, T. F.; PABLOS-MENDEZ, A.; KLUGMAN, K. P. Antimicrobial resistance in developing countries. Part 1: recent trends and current status. **Lancet Infectious Diseases**, 5, 481–493, 2005.

OKUDA, T. Structure-activity relationship of antioxidant and antitumor polyphenols. In **Food Factors for Cancer Prevention**; Ohigashi, H., Osawa, T., Terao, J., Watanabe, S., Yoshikawa, T., Eds.; Springer-Verlag: Vienna, Austria, pp. 280-285, 1997.

OLIVEIRA, J. F.; BRITO, L. C.; FRYDMAN, J. N. G.; SANTOS-FILHO, S. D.; BERNARDO-FILHO, M. An aqueous extract of *Pfaffia* sp. does not alter the labeling of blood constituents with technetium-99m and the morphology of the red blood cells. **Rev Bras Farmacogn**, 15, 126-132, 2005.

OSBORNE, N. J. T.; MCNEILL, D. M. Characterisation of Leucaena condensed tannins by size and protein precipitation capacity. **J. Sci. Food Agric**, 81, 1113–1119, 2001.

OZTÜRK, L.; MANSOUR, B.; YÜKSEL, M.; GÖKHAN, N. Lipid peroxidation and osmotic fragility of red blood cells in sleep-apnea patients. **Clinica Chimica Acta**, 332, 83-88, 2003.

PADILHA, I. Q. M.; PEREIRA, A. V.; RODRIGUES, O. G.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, M. S. V. Antimicrobial activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. from Northeast Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 20(1), 45-47, 2010.

PEREIRA, A. V.; LÔBO, K. M. S.; BEZERRA, D. A. C.; RODRIGUES, O. G.; ATHAYDE, A. C. R.; MOTA, R. A.; DE LIMA, E. Q.; DE MEDEIROS, E. S. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de juremapreta e neem sobre amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de mastite em búfalas. **Arq Inst Biol**, 76, 341-346, 2009a.

PEREIRA, A. V. Estudo da ação dos extratos de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke sobre cepas microbianas de mastite em búfalas. **(Dissertação de Mestrado – UFCG)**. 2010.

PERK, K.; FREI, Y. F.; HERZ, A. Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. **American Journal Veterinary Research**, 25, 1241-1248, 1964.

PERRY, G.; PERRY, A. K.; RAINA, A.; NUNOMURA, T.; WATAYA, L. M. How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v.28, p.831-834, 2000.

PESSUTO, M. B.; COSTA, I. C.; SOUZA, A. B.; NICOLI, F. M.; MELLO, J. C. P. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 2, 412-416, 2009.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; LOPES, B. M. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) **Sandw. Floresta e Ambiente**, v. 8, n.1, p.130 - 136, 2001.

POLITI, F. A. S.; MELLO, J. C. P.; MIGLIATO, K. F.; NEPOMUCENO, A. L. A.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R. Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activities and Determination of the Total Tannin Content of Bark Extracts *Endopleura uchi*. **Int. J. Mol. Sci.**, 12, 2757-2768, 2011.

PORTER, L. J.; WOODRUFFE, J. Haemanalysis: the relative astringency of proanthocyanidin polymers. **Phytochemistry**, 23, 1255–1256, 1984.

POTT, A.; POTT, V. J.; BUENO SOBRINHO, A. A. Plantas úteis à sobrevivência no Pantanal. IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal [Internet]. Corumbá: BR; [updated Mar 11; cited 2004 Novemb 23]. Available from: www.cpap.embrapa.br/agencia/simpan/sumario/.../ArnildoPott.PDF.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal Biochem**, 269, 337-41, 1999.

PROKSCH, P.; EDRADA, R. A.; EBEL, R. Drugs from the seas – current status and microbiological implications. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 59, p. 125-134, 2002.

PURCHASE, I.F.H.; LONGSTAFF, E.; ASHBY, J.; STYLES, J.A.; ANDERSON, D.; LEVEVRE, P.A.; WESTWOOD, F.R. An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. **Brit. J. of Cancer**, v. 37, p. 873-959, 1978.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, 35, 305-309, 1997.

REDDY, C. S. S. S.; SUBRAMANYAM, M. V. V.; VANI, R.; DEVI, S. A. In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: Effect of antioxidant supplements. **Toxicology in Vitro**, 21, 1355–1364, 2007.

REIS JR, F. B *et al.* Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. **New Phytologist**, 186, 934–946, 2010.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: **Mutagênese Ambiental**, Editora da ULBRA. Rio Grande do Sul, p. 21-27, 2003.

RIVERA-ARCE, E.; CHÁVEZ-SOTO, M. A.; HERRERA-ARELLANO, A.; ARZATE, S.; AGUERO, J.; FERIA-ROMERO, I. A.; CRUZ-GUZMÁN, A.; LOZOYA, X. Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extract in venous leg ulceration treatment. **J Ethnopharmac**, 109, 523–528, 2007.

RODRIGUES, H. G.; BATISTA, M. T. A.; FONSECA, L. C.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. **Revista Biotemas**, 22 (1), 2009.

ROSADO-VALLADO, M.; BRITO-LOEZA, W.; MENA-REJON, G. J.; QUINTERO-MARMOL, E.; FLORES-GUIDO, J. S. Antimicrobial activity of Fabaceae species used in Yucatan traditional medicine. **Fitoterapia**, 71, 570-573, 2000.

ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; DALLE-DONNE, I. Membrane skeletal protein S-glutathionylation and hemolysis in human red blood cells. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, 37, 180-187, 2006.

ROTH, E. Oxygen free radicals and their clinical implications. **Acta Chir. Hung.** V.36, p. 302-305, 1997.

SALEEM, A.; HUSHEEM, M.; HARKONEN, P.; PIHLAJA, K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* Retz. *Fruit. J. Ethnopharmacol.* 81, 327–336, 2002.

SALMINEN, J. P.; KARONEN, M. Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. **Functional Ecology**, 25, 325–338, 2011.

SALUNKHE, D. K.; CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S. Dietary tannins: Consequences and remedies. Boca Raton. **CRC Press**, p.1-310,1990.

SANCHES, A. C. C. *Estudo farmacognóstico das cascas de Stryphnodendron obovatum Benth., atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante*

dos seus extratos [Dissertação] Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. 2004.

SANCHES, A. C. C.; LOPES, G. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Antioxidant and antifungal activity of extracts and condensed tannins. from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences***, vol. 41, n. 1, 2005.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. TANINOS. IN: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC. p.615-656, 2004.

SANTOS, N. C.; MARTINS-SILVA, J.; SALDANHA, C. Gramicidin D and dithiothreitol effects on erythrocyte exovesiculation. **Cell Biochem Biophys**, 43, 419-430, 2005.

SCALBERT, A. **Phytochemistry** 30, 3875, 1991.

SCHIAR, V. P. P.; SANTOS, D. B.; LUDTKE, D. S.; VARGAS, F.; PAIXÃO, M. W.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, B. T. Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 139-145, 2007.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins – a review. **Animal Feed and Technology**, 91, 21- 40, 2001.

SHIVA SHANKAR REDDY, C. S.; SUBRAMANYAM, M. V.; VANI, R.; ASHA DEVI, S. In vitro 524 models of oxidative stress in rat erythrocytes: effect of antioxidant 525 supplements. **Toxicol. In Vitro**, 21, 1355–1364, 2007.

SIEMS, W. G.; SOMMERBURG, O.; GRUNE, T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. **Clin Nephrol**, 53, S9-S17, 2000.

SILVA, J. S.; SALES, M. F. O gênero *Mimosa* (Leguminosae Mimosoideae) na Microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco. **Rodriguésia**, 59 (3), 435-448, 2008.

SILVA, M. A. R. Influência do extrato da romã (*Punica granatum* Linn.) sobre plasmídeos nos processos de cura e transmissibilidade genética de *Staphylococcus aureus* de origem bovina. **49° Congresso Brasileiro de Genética**, Gramado, RS. 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2003.

SIMON, M. F.; PROENÇA, C. Phytogeographic patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado biome of Brazil: an indicator genus of high-altitude centers of endemism? **Biological Conservation**. 96, 279-296. 2000.

SIMON, M. F. Systematics and evolution of *Mimosa* L. (Leguminosae) and the assembly of a Neotropical plant diversity hotspot. **PhD Thesis, Oxford University**, London. 2009.

SNEADER, W. *Drug Prototypes and their Exploitation*. Chichester, UK: Wiley; 1996.

SIRICHOTIYAKUL, S.; TANTIPALAKON, C.; SANGUANSERMSRI, T.; WANAPIRAK, C.; TONGSONG, T. Erythrocyte osmotic fragility test for screening of alpha-thalassemia-1 and beta-thalassemia trait in pregnancy. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, 86, 347-350, 2004.

SOUZA, T. M.; SEVERI, J. A; SILVA, V. Y. A; SANTOS, E.; PIETRO, R. C. L. R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoideae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, v. 28, n.2, p.221-226, 2007.

SOUZA, R. S. O.; ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; AMORIM, E. L. C. Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [willd] Poir): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. **Braz Arch Biol Technol** 51, 937-947, 2008.

SPENCER, C. M.; YA, C.; MARTIN, R.; GAFFNEY, S. H.; GOULDING, P. N.; MAGNOLATO, D.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. Polyphenol complexation – some thoughts and observations. **Phytochemistry**, 27, 2397–2409, 1988.

SRINIVASAN, K.; KEMPAIAH, R. K. Beneficial influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on erythrocyte integrity in high-fat fed rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 17, 471-478, 2006.

TOLEDO, C. E. M. Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae]. Araraquara, 92f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** Universidade Estadual Paulista. 2002.

TONDI, G.; ZHAO, W.; PIZZI, A.; DU, G.; FIERRO, V.; CELZARD, A. Tannin - based rigid foams: a survey of chemical and physical properties. **Bioresour Technol**, 100 (21), 5162-9, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia, Porto Alegre, Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia, Rio de Janeiro, Atheneu, 2004.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; IINUMA, M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Ethnopharmacol**, 50, 27–34, 1996.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 43, 631-638, 2007.

VALENTIM, A. P. T. Atividade antimicrobiana, estudo fitoquímico e identificação de constituintes apolares do alburno de *Hymenaea stignocarpa* Mart. Ex Hayne (jatobá). 109f. **(Dissertação – Mestrado em Biotecnologia de produtos Bioativos)**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2006.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; BUSCHIAZZO, P. M.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, Milan, v.74, p.91-97, 2003.

VERRAL, M. Downstream processing of natural products. **Chichester**: John Wiley & Sons. 1996.

VIKRAM, A.; RAMARAO, P.; JENA, G. Prior bleeding enhances the sensitivity of peripheral blood and bone marrow micronucleus tests in rats. **Mutagenesis**, v. 22, p. 287-291, 2007.

WAGNER, C. T.; MARTOWICZ, M. L.; LIVESEY, S. A.; CONNOR, J. Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation. **Cryobiology**, 45, 153-166, 2002.

WEISBURGER, J. H. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. **Mut. Res.** v. 437, p. 105-112, 1999.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B. SOS-chromotest results in a broader context empirical relationships between genotoxic potency, mutagenic potency and carcinogenic potency. **Environ. Mol. Mutagen**, v. 27, n. 4, p. 270-305, 1996.

WILSON, E. O. Wildlife: legion of the doomed. **Time**, October, p. 77-79, 1995.

WONG, L. P.; KOH, S. P. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 99, pp. 775–783, 2006.

YOSHIDA, T.; MORI, K.; HATANO, T.; OKUMURA, T.; UEHARA, I.; KOMAGOE, K.; FUJITA, Y.; OKUDA, T. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 1919-1921, 1989.

YOSHIDA, T.; HATANO, T.; ITO, H.; OKUDA, T. Structure diversity and antimicrobial activities of ellagitannins. In *Chemistry and Biology of Ellagitannins*, Quideau, S., Ed.; World Scientific: Singapore. pp. 55-93, 2009.

YOSHIZAWA, S.; HORIUCHI, T.; FUJIKI, H.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T.; SUGIMURA, T. Antitumor promoting activity of (-)-Epigallocatechin gallate, the main constituent of “Tannin” in green tea. *Phytother. Res.*, 1, 44, 1987.

YOSHIZAWA, S.; HORIUCHI, T.; SUGANUMA, M.; NISHIWAKI, S.; YATSUNAMI, J.; OKABE, S.; OKUDA, T.; MUTO, Y.; FRENKEL, K.; TROL, W.; FUJIKI, H. Penta-O-galloyl- β -D-glucose and (-)-Epigallocatechin gallate, cancer preventive agents. In *ACS Symposium Series 507. Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II: Antioxidants and Cancer Prevention*; Huang, M.T., Ho, C.T., Lee, C.Y., Eds.; America Chemical Society: Washington DC, USA, p. 316, 1992.

ZAMBELLI, A. R.; AGUIAR, L. A.; CUNHA, A. P.; VIEIRA, M. G. S.; CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M. Avaliação do potencial antioxidante e análise do teor de taninos totais de *Syzygium malaccense*. A. Ciências Exatas e da Terra - 4. Química - 4. **Química de Produtos Naturais**. Anais da 58^a Reunião Anual da SBPC - Florianópolis, SC - Julho/2006.

ZEIGER, E.; MARGOLIN, B.H. The proportions of mutagens among chemicals in commerce. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* v. 32, p. 219-225, 2000.

ZHANG, X.; INUKAI, T.; HIROSE, K.; AKAHANE, K.; NEMOTO, A.; TAKAHASHI, K.; SATO, H.; KAGAMI, K.; GOI, K.; SUGITA, K.; NAKAZAWA, S. Induction of impaired membrane phospholipid asymmetry in mature erythrocytes after chemotherapy. *Int J Hematol*, 82, 132-136, 2005.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Simões, C. M. O.; Guerra, M. P. *et al.* (Orgs.) 5 ed., revisada, ampliada, primeira reimpressão – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC. 2004.

ZUCKER, W.V. Tannins: does structure determined function? An ecological perspective. *Am Nat*, 121,335–65, 1983.