

# Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal

Cytotoxicity and DNA damages induced by the *Zornia diphylla* extract, a medicinal plant

Luciano Belcavello<sup>1\*</sup>, Márcia Regina H Cunha<sup>2</sup>, Marciene A Andrade<sup>3</sup> e Maria do Carmo P Batitucci<sup>1</sup>

1. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, CEP 29.040.090, Maruípe, Vitória, ES, Brasil. 2. Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil. 3. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém do Pará, PA, Brasil.

\*Autor para correspondência: [belcavello@gmail.com](mailto:belcavello@gmail.com)

**Resumo** No presente estudo investigou-se o potencial citotóxico, aneugênico e mutagênico, *in vivo*, do extrato hidroalcoólico de *Zornia diphylla* Pers (EHZD) sobre células meristemáticas de cebola (*Allium cepa* L.) e da medula óssea de ratos Wistar. A citotoxicidade foi avaliada por meio da germinação de sementes e exposição de células meristemáticas de *A. cepa* em quatro concentrações crescentes do EHZD (0,5, 1,0, 2,0 e 3,0mg/mL). Adicionalmente, foi realizado o ensaio de micronúcleo para investigar potenciais efeitos mutagênicos do EHZD sobre as células de medula óssea de ratos Wistar. Os animais (n=5/grupo) foram expostos a uma única dose diária (100mg/rato/dia), por via oral, durante 5 dias consecutivos e sacrificados para realização do estudo. Os resultados obtidos demonstraram que o EHZD possui potenciais efeitos citotóxico e mutagênico, de forma concentração-dependente, sobre as células meristemáticas de *A. cepa* e efeito mutagênico, para a dose de 100mg/dia, sobre a medula óssea de camundongos, *in vivo*. Outros estudos são necessários para expandir o conhecimento acerca da toxicologia e do potencial terapêutico do EHZD.

**Palavras-chaves:** *Zornia diphylla* Pers, mutagênese, *Allium cepa*, medula óssea, micronúcleo.

**Abstract** In the present study we have investigated the *in vivo* cytotoxic, aneugenic and mutagenic potential of crude hydroalcoholic extract of *Zornia diphylla* Pers (EHZD) on onion root meristem cells (*Allium cepa* L.) and Wistar rat bone marrow cells. The cytotoxicity was evaluated by germination of seeds and exposition of onion root meristem cells to four concentrations of EHZD (0,5, 1,0, 2,0 and 3,0mg/mL). Additionally, the micronucleus assay was performed to investigate the potential mutagenic effects of EHZD on normal Wistar rat bone marrow cells. Animals (n=5/group) were exposed to one single oral daily

dose (100mg/rat/day), for 5 days and sacrificed for the study. The results showed that the EHZD have concentration-dependent cytotoxic and mutagenic effect on *Allium cepa* root meristem cells and mutagenic effect, for the 100mg/day dose, on rat bone marrow cells. Other studies are necessary to better understand the toxicology and the therapeutic potential of EHZD.

**Keywords:** *Zornia diphylla* PERS, mutagenesis, *Allium cepa*, bone marrow, micronucleus.

## Introdução

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais são utilizados para a produção de um grande número de fármacos. As preparações fitoterápicas correspondem a 25% do receituário médico dos países desenvolvidos e 80% dos países em desenvolvimento (Cragg *et al.* 1997). Várias espécies já foram estudadas e seus princípios ativos validados como medicamento, como é o caso da vinca (*Catharanthus roseus*), planta da qual se obtém a vincristina e a vinblastina, substâncias altamente eficazes contra certos tipos de câncer (Thomson e Wallace 2002).

Apesar do amplo uso dos fitomedicamentos pela população, poucos estudos têm sido feitos para avaliar a eficácia terapêutica e a toxicidade potencial das preparações fitoterápicas. Existem inúmeras publicações sobre os fitomedicamentos e fitoterápicos, principalmente dirigidas ao público leigo, porém poucas como trabalhos científicos controlados rigorosamente (Lima 2006). O uso de preparações a base de plantas, ao contrário do senso comum, que as classifica como sendo naturais e isentas de reações adversas, podem apresentar vários agravos à saúde incluindo reações alérgicas,

tóxicas, interações medicamentosas e efeitos mutagênicos (Ernst e Pittler 1998). Diversos grupos de plantas possuem substâncias bioativas de interesse farmacológico. No Brasil, e em outros países, vários estudos têm sido realizados com o intuito de estabelecer a atividade, esclarecer mecanismos de ação, ou mesmo, identificar componentes ativos e investigar os possíveis efeitos tóxicos de diferentes espécies vegetais (Batitucci 2003).

A espécie *Zornia diphylla* Pers (Leguminosae/Fabaceae), conhecida como arrozinho-do-campo ou urinária, é um exemplo de planta medicinal com amplo uso na medicina popular. É uma espécie herbácea perene com distribuição pantropical e número cromossômico  $2n=20$  (Grisebach 1963, Schultz 1990). São relatados usos terapêuticos da planta inteira nas formas de infusão e decocção, tanto interna, para tratamento de febre e congestão, quanto externamente, para inchaço e reumatismo. Em um estudo piloto com o extrato hidroalcoólico bruto da planta foram observados efeitos hipotensor e bradicárdico significativos em ratos espontaneamente hipertensos (Soares *et al.* 2007). Rojas *et al.* (1999) relataram o uso da planta pelos índios Otomi de Querétaro (México) para tratamento de distúrbios gastrointestinais. Nesse mesmo trabalho é reportado que o extrato de *Zornia diphylla* PERS produziu uma inibição-dependente de concentração nas contrações espontâneas de íleo isolado de rato, resultados que sustentam o uso medicinal dessa planta.

Revisando a literatura, não se encontrou nenhum trabalho científico que tenha avaliado a potencial atividade tóxica do extrato dessa planta sobre as células e o material genético. Essa avaliação é de fundamental importância, pois muitos compostos presentes nas plantas possuem atividade tóxica que podem causar danos celulares ou genéticos. Tais danos podem ser afetar processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica, bem como alterações cromossômicas, levando a processos cancerosos e morte celular. Pelo fato de causarem lesões no material genético, essas substâncias são conhecidas como genotóxicas (Costa e Menk 2000).

Segundo Purves *et al.* (1995), os testes de genotoxicidade *in vivo* e *in vitro* são fundamentais para que as indústrias farmacêuticas deliberem um novo agente terapêutico. Dentre os métodos disponíveis para avaliação em Genética Toxicológica, destacam-se o ensaio em *Allium cepa* e o teste de micronúcleo em células da medula óssea de roedores. O sistema teste vegetal de *Allium cepa* é um excelente bioindicador para o primeiro *screening* da genotoxicidade de plantas medicinais, devido ao seu baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade, auxiliando os estudos de prevenção de danos à saúde humana (Bagatini *et al.* 2007).

O teste de micronúcleo em células da medula óssea de camundongos 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). Assim como o teste em *Allium cepa*, o ensaio do micronúcleo, quando realizado corretamente, detecta tanto clastogenicidade – quebra de cromossomos – quanto aneuploidia – aneuploidia ou segregação cromossômica

anormal devido a disfunções no aparato mitótico (MacGregor *et al.* 1987, Hayashi *et al.* 1994, Krishna e Hayashi 2000, Choy 2001). O aparecimento de micronúcleos nas células analisadas é uma consequência de quebra cromossômica, evidenciando claramente a manifestação de distúrbios do processo mitótico (Ribeiro 2003, Grover e Kaur 1999). Há uma correlação positiva entre o aumento da frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e em humanos (Azevedo *et al.* 2003).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos citotóxicos, aneugênicos e mutagênicos do extrato hidroalcoólico bruto de folhas de *Zornia diphylla* por meio da análise do ciclo celular e aberrações cromossômicas em células meristemáticas de *Allium cepa* (cebola) e por meio do teste do micronúcleo, em células de medula óssea de ratos Wistar.

Os resultados dessa avaliação poderão contribuir para a implantação de projetos que visem à utilização dessa espécie na produção de fármacos e para o planejamento das ações de orientação à população quanto ao uso de medicamentos produzidos à base de plantas.

---

## Métodos

### *Zornia diphylla* Pers

As amostras foliares de *Zornia diphylla* foram coletadas no Campus da Universidade Federal do Espírito Santo. Exsiccata contendo caule, folhas, flores, frutos e raízes foi preparada e depositada no Herbário Central da UFES (VIES) sob o número de identificação 14314.

### Extrato hidroalcoólico de *Zornia diphylla* (EHZD)

As folhas de *Z. diphylla* Pers foram submetidas à secagem em estufa, por 48 horas, com circulação de ar a 40°C. As folhas secas foram pulverizadas em um moedor elétrico e maceradas em álcool 80%, durante 72 horas, à temperatura ambiente. O extrato foi filtrado a vácuo e concentrado à pressão reduzida e temperatura de 60°C, em rotaevaporador e a massa seca do extrato foi estabelecida por desidratação em aquecedor.

### Toxicidade aguda

Para avaliação da toxicidade aguda do EHZD foram utilizados camundongos Swiss ( $n=60$ ), com variação de peso de 35-40g, obtidos no Biotério da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram separados em seis grupos de 10 animais cada. O grupo controle recebeu, via injeção intraperitoneal, 0,5 mL de solução salina 0,9% e aos demais grupos foi administrado o extrato nas doses de 50, 300, 500, 1000 e 2000mg/kg. Os animais permaneceram nas gaiolas por períodos de 24 e 48 horas, sendo, então, verificado o número de óbitos para cada grupo de animais, nas diferentes doses administradas.

### Análise fitoquímica

Os ensaios fitoquímicos para caracterização dos principais grupos

de metabólitos secundários de *Z. diphylla* PERS foram realizados no Laboratório de Farmacognosia, da Universidade Federal do Espírito Santo, por meio de reações de caracterização baseadas em formação de precipitados e mudança de coloração, segundo Barbosa (2001).

#### Teste em *Allium cepa*

As sementes de *Allium cepa* (variedade Baía Periforme) foram submetidas à germinação em quatro concentrações do EHZD (0,5, 1,0, 2,0 e 3,0mg/mL). O controle negativo (CN) foi realizado com sementes submetidas à germinação em água destilada. Realizaram-se dois tipos de tratamento: contínuo, no qual as sementes foram embebidas e germinadas diretamente em água destilada (CN) e no extrato em diferentes concentrações, e o tratamento descontínuo no qual as sementes foram inicialmente embebidas e germinadas em água destilada até atingirem cerca de 2,0cm de comprimento, sendo posteriormente transferidas para o extrato nas diferentes concentrações. Após 20h (tratamento agudo), algumas raízes foram coletadas aleatoriamente e o restante permaneceu no extrato até completarem 72h (tratamento crônico). Após a coleta, as raízes foram fixadas em Carnoy 3:1, por 24 horas à temperatura ambiente. A confecção das lâminas foi realizada seguindo a metodologia de Fiskejö (1985) e a análise citológica foi realizada em microscópio de luz (LEICA, DM/LS), com objetiva de 40X. Foram analisadas 1000 células por lâmina e cinco lâminas por grupo.

#### Efeitos tóxico, citotóxico, aneugênico e mutagênico

A análise de toxicidade foi realizada por meio do índice de germinação o qual foi obtido a partir da proporção entre o número de sementes de *Allium cepa* submetidas à germinação em tratamento contínuo e o número de sementes que efetivamente apresentaram protusão da radícula.

O índice mitótico foi calculado por meio da proporção entre o número de células em divisão e o número total de células analisadas servindo como parâmetro para análise de citotoxicidade.

Os efeitos aneugênicos foram avaliados por meio de células portadoras de alterações tais como: alterações na metáfase (c-metáfases, aderências), na anáfase (anáfases multipolares, pontes e atrasos), alterações na telófase (pontes e atrasos), células binucleadas e perdas cromossômicas.

A mutagenicidade foi avaliada por meio da frequência de células portadoras de micronúcleos e quebras cromossômicas.

#### Animais

Para realização dos experimentos em animais, foram utilizados 15 ratos Wistar, *Ratus norvegicus*, machos, com idade aproximada de três semanas, obtidos do Biotério da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em sala climatizada sob temperatura constante de 26°C, com ciclos claro-escuro de 12 horas e alimentados com ração comercial padrão e água *ad libitum*. Para realização do ensaio de mutagenicidade, os animais foram randomicamente divididos em três grupos (controle negativo

– CN, controle positivo – CP – e extrato). Os ensaios foram realizados em conformidade com os Princípios Éticos de Experimentação Animal do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal. As análises de citotoxicidade e mutagenicidade do extrato foram realizadas de acordo com a metodologia de MacGregor *et al.* (1987), com modificações.

#### Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico do EHZD em ratos Wistar

Para avaliação do potencial citotóxico e mutagênico do EHZD, os animais foram expostos a uma dose diária única, via oral, de 100mg do EHZD/animal, durante 5 dias consecutivos. O grupo CN recebeu, em dose diária única, via gavagem, 10mL de solução salina/kg de massa corpórea durante 5 dias e ao grupo CP foi administrada, intraperitonealmente, ciclofosfamida (50mg/kg de massa corpórea), 24 horas antes do sacrifício. A ciclofosfamida é uma droga com potente atividade genotóxica e largamente utilizada como controle positivo em estudos de mutagenicidade (Kirkland *et al.* 2008). Após o período de tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a medula foi colhida com o auxílio de uma seringa.

#### Preparo das lâminas para pesquisa de micronúcleo

As células da medula óssea foram centrifugadas por 5 minutos a 1800rpm e o sobrenadante descartado. As lâminas foram preparadas por esfregaço, as células coradas com Giemsa 10%. As lâminas foram analisadas em teste cego, usando aumento de 1000x. Foram analisados 1000 eritrócitos por lâmina, em duplicata.

Para análise de citotoxicidade do extrato foi calculada a relação entre o número de eritrócitos policromáticos (PCEs) contados e o número total de eritrócitos (policromáticos e normocromáticos – NCEs). A mutagenicidade do extrato foi estipulada por meio do número de eritrócitos policromáticos contendo micronúcleos (EPCs-MN) a partir da contagem de 2000 eritrócitos por animal, totalizando 10.000 células por grupo.

#### Análise estatística

As análises estatísticas para os ensaios em *Allium cepa* e ratos Wistar foram realizadas por meio do teste do Qui-quadrado (Rabello-Gay *et al.* 1991), com nível de significância  $p < 0,05$ .

---

## Resultados e discussão

O extrato hidroalcoólico de *Z. diphylla* Pers teve no presente trabalho, investigados pela primeira vez, os seus potenciais tóxico, citotóxico, mutagênico e aneugênico, utilizando-se os sistemas-teste *Allium cepa* e medula óssea de ratos Wistar.

As doses do EHZD usadas para avaliação da toxicidade aguda (50, 300, 500, 1000 e 2000mg/kg de massa corpórea) não levaram os animais a óbito durante os períodos de observação de 24 e 48 horas, demonstrando não ser tóxico nas concentrações e tempos analisados para os camundongos Swiss.

### Teste em *Allium cepa*

Uma série de estudos corrobora a utilização do teste de *Allium cepa* como um ensaio importante na avaliação de genotoxicidade de extratos e infusões de plantas medicinais (Bagatini *et al.* 2007, Fachinnetto *et al.* 2007). O ensaio de *Allium cepa* é um teste de curto prazo com muitas vantagens: baixo custo, fácil manipulação, cromossomos em boas condições para estudo de danos ou distúrbios na divisão celular, incluindo a avaliação de riscos de aneuploidia, além de ser sensível e de apresentar boa correlação com outros sistemas de teste. Conseqüentemente, resultados positivos no teste de *Allium cepa* devem ser considerados como um alerta e também um indicativo de que o fator químico testado pode ser um risco para a saúde do homem (Fiskejö 1985).

A Tabela 1 mostra a porcentagem de sementes de *Allium cepa* germinadas em água destilada (CN) e em quatro diferentes concentrações de EHZD. Observamos que houve um efeito tóxico concentração dependente significativo do extrato sobre a germinação das sementes. O índice de germinação baixo é um indicativo de toxicidade do extrato.

**Tabela 1** Índice de Germinação (IG) das sementes de *Allium cepa* (n=50) submetidas a tratamento contínuo em água destilada (CN) e em quatro diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de *Zornia diphylla*.

Índice de Geminação (%)					
Grupo	CN	0,5mg/mL	1,0mg/mL	2,0mg/mL	3,0mg/mL
%	94	64*	50**	46**	24**

\*Estatisticamente significativa (p<0,05), \*\* Estatisticamente significativa (p<0,01).

A Tabela 2 apresenta os índices mitótico (IM), de efeito aneugênico (IEA) e de efeito mutagênico (IEM) em células meristemáticas de *Allium cepa* submetidas aos tratamentos contínuo e descontínuos (20 e 72h). Os resultados indicam um aumento do índice mitótico, nos tratamentos contínuo (TC) e descontínuos (TD20 e TD72), sem, no entanto, serem estatisticamente significativos em relação ao grupo controle. O EHZD demonstrou um efeito mutagênico significativo, no tratamento contínuo, apenas para a concentração de 3,0mg/mL, em relação ao controle negativo. Observou-se, também, um efeito aneugênico significativo para as concentrações de 1,0mg/mL no TC e 2,0mg/mL no TD72. Os efeitos aneugênico e mutagênico observados em células de *Allium cepa* demonstram que o EHZD provoca danos ao material genético e tende a aumentar de acordo com a concentração usada e com o tempo de exposição da célula ao extrato. Assim como o EHZD, outros extratos testados por diferentes autores têm demonstrado uma ação sobre a germinação e o índice mitótico de células de *Allium cepa* (Iganci *et al.* 2006, Fachinnetto *et al.* 2007).

O decréscimo do índice de germinação, as alterações no índice mitótico e as alterações aneugênicas e clastogênicas promovidos pelo EHZD demonstram que as substâncias presentes em *Zornia diphylla* interferem na divisão celular e no desenvolvimento do sistema

**Tabela 2** Tratamento de células meristemáticas de *Allium cepa* com quatro concentrações do extrato hidroalcoólico bruto de *Zornia diphylla*.

Tratamento (mg/mL)	IM (%)			IEA (%)			IEM (%)		
	TC	TD20	TD72	TC	TD20	TD72	TC	TD20	TD72
Controle Negativo	7,2	7,0	5,6	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2	0,2
0.5mg/mL	40,5	25,7	18,3	1,7	1,5	2,0	0,6	0,6	0,0
1.0mg/mL	27,8	33,3	23,7	2,7*	2,6	1,4	0,0	0,0	0,1
2.0mg/mL	25,3	28,5	41,8	1,6	2,4	3,1*	0,0	0,4	0,2
3.0mg/mL	31,4	32,4	27,6	2,2	1,7	2,4	15,0**	0,1	0,1

IM: índice mitótico, IEA: índice de efeito aneugênico, IEM: índice de efeito mutagênico, TC: tratamento contínuo, TD20: tratamento descontínuo por 20 horas, TD72: tratamento descontínuo por 72 horas. \*Estatisticamente significativa (p<0,05), \*\*Estatisticamente significativa (p<0,01).

radicular, o que, provavelmente, representa um dos mecanismos de ação do extrato sobre o desenvolvimento de *A. cepa* (Pires *et al.* 2001).

### Células de medula óssea de ratos Wistar

O ensaio do micronúcleo em roedores *in vivo* é amplamente utilizado para estudos de genotoxicidade (Krishna e Hayashi 2000, Doppalapudi *et al.* 2007) A Tabela 3 mostra o número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCs-MN) por grupo e a relação entre o número de EPCs e ENC em células de medula óssea de ratos Wistar. Observou-se que o grupo de animais tratados com 100 mg/rato/dia de EBZD apresentou aumento significativo no número de EPCs-MN em relação ao grupo controle negativo, não alcançando, no entanto, o grau de mutagenicidade induzido pela ciclofosfamida nos animais do grupo controle positivo. Verificou-se um aumento significativo, em relação ao grupo CN, do número de EPCs-MN no grupo de animais tratados com ciclofosfamida, o que corrobora os dados relatados na literatura. Esses resultados demonstram, como em outros estudos (Valadares *et al.* 2007), que os componentes presentes em vegetais podem induzir danos ao DNA, o que reforça a necessidade de um criterioso controle de qualidade quando da produção de fármacos à base de plantas (Alves 2004).

Não foi constatada, neste estudo, atividade citotóxica do extrato, já que a relação entre o número de EPCs e o número total de eritrócitos (EPC + ENC) não mostrou diferença estatística significativa em comparação com o grupo CN. Vários estudos mostraram

**Tabela 3** Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCs-MN) e razão EPC:(EPC + ENC) em células de medula óssea de ratos Wistar controles e tratados diariamente (5 dias) com 100mg de extrato de *Zornia diphylla*/animal.

Tratamento	EPCs-MN	EPC:(EPC+ENC)
CN (solução salina)	1 ± 0,045	0,782 ± 0,010
Extrato (100mg/animal/dia)	5 ± 1,00**	0,378 ± 0,028
CP (ciclofosfamida)	96 ± 0,28**	0,900 ± 0,046

\*\*Estatisticamente significativa (p<0,01) em relação ao grupo controle negativo, (n=5 ratos/grupo). Os dados estão expressos como média ± desvio padrão.

que plantas medicinais tradicionalmente usadas como recurso terapêutico, apresentam atividades citotóxica e/ou genotóxica em medula óssea de roedores (Valadares *et al.*, 2007, Junqueira *et al.* 2007), sangue periférico de roedores (Freitas *et al.* 2008, Maistro *et al.* 2005) ou no sistema *Allium cepa* (Vicentini *et al.* 2001, Teixeira *et al.* 2003). Isso reforça a cautela que se deve ter quando se usa plantas para tratamento de enfermidades.

#### Análise fitoquímica

Na prospecção fitoquímica do EHSD realizada neste estudo, foi detectada a presença de taninos, cumarinas e flavonóides além de ácidos orgânicos, saponinas e compostos antraquinônicos (dados não mostrados). Segundo Rojas *et al.* (1999) uma das classes de compostos fitoquímicos encontrados na espécie *Zornia diphylla* Pers são as cumarinas, compostos derivados do metabolismo da fenilalanina e que se encontram distribuídos predominantemente nas angiospermas. Uma das classes de cumarinas, as furanocumarinas, tem atraído atenção especial dada a sua fitotoxicidade. Esses compostos são atóxicos até que a luz os ative. A luz solar, na faixa do ultravioleta A (UV-A, 320-400nm) eleva algumas furanocumarinas a um estado eletrônico de alta energia. As furanocumarinas fotoativadas podem se inserir na dupla hélice do DNA e ligar-se às bases pirimídicas, citosina e timina, bloqueando a transcrição e o reparo do DNA, provocando, ocasionalmente, a morte celular (Taiz e Zeiger 2004). Estudos de Perez e Moraes (1991) mostraram que a cumarina possuem a propriedade de diminuir a porcentagem e a velocidade de germinação das sementes de *Prosopis juliflora* (Sw) D.C., o que corrobora a redução na germinação das sementes de *Allium cepa*, observada em nosso estudo.

As plantas medicinais são extremamente úteis para o tratamento de várias enfermidades, principalmente nos países em desenvolvimento, devido ao alto custo dos medicamentos e à dificuldade de atendimento nos setores de saúde. No entanto, os efeitos tóxicos, aneugênicos e mutagênicos significativos evidenciados neste estudo reforçam a cautela necessária quando da utilização de plantas medicinais pela população, pois o uso indiscriminado de ervas ou fitoterápicos, que contenham substâncias tóxicas pode gerar danos que não compensam seu potencial terapêutico.

Pode-se considerar então, que a utilização de *Zornia diphylla* pela população não é recomendada em grandes concentrações e por longos períodos de tempo. Novos estudos, com outros sistemas teste em diferentes tempos, concentrações e frações do extrato são necessários para melhor elucidar os potenciais farmacológicos e fitoterápicos do extrato dessa espécie.

#### Agradecimentos

Agradecemos à Dra. Luciana Dias Thomaz, do Setor de Botânica/UFES pela identificação taxonômica da planta e à UFES e Petrobrás pelo apoio financeiro.

#### Referências

- Alves NDC (2004) **Avaliação da adequação técnica das indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinais do Estado do Rio de Janeiro a partir dos instrumentos regulamentatórios específicos**. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro, INCQS/FIOCRUZ.
- Azevedo L, Gomes JC, Stringheta PC, Gontijo AM, Padovani CR, Ribeiro LR, Salvadori DMF (2003) Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food Chemical and Toxicology** 41: 1671-1671.
- Bagatini MD, Silva A.F, Tedesco SB (2007) Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 17(3): 444-447.
- Barbosa WLR, Tavares ICC (2001) **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**. Belém, UFPA.
- Batitucci MCP (2003) **Estudo dos efeitos cardiovasculares do extrato hidroalcoólico de plantas do gênero Solanum**: aspectos fisiofarmacológicos e citogenéticos. Tese de Doutorado. Vitória, Universidade Federal do Espírito Santo.
- Choy WN (2001) Regulatory genetic toxicology tests. In: Choy WN (ed) **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. New York, Marcel Dekker, pp. 93-113.
- Costa RMA, Menk CFM (2000) Biomonitoramento de Mutagênese Ambiental. **Biocologia, Ciência e Desenvolvimento** 12: 24-26.
- Cragg GC, Newman DJ, Snader KM (1997) Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products** 60: 52-60.
- Ernst E, Pittler MH (1998) Risks associated with herbal medicinal products. **Wiener Medizinische Wochenschrift** 152:183-189.
- Fachineto JM, Bagatini MD, Durigon J, Silva ACF, Tedesco SB (2007) Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 17: 49-54.
- Fiskejö G (1985) The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas** 102: 99-112.
- Freitas PS, Andrade SF, Maistro EL (2008) Evaluation of the *in vivo* mutagenic potential of hydroalcoholic extracts of the northern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L. Ericales, Ericaceae) on peripheral blood cells of Swiss mice (*Mus musculus* Rodentia, Muridae). **Genetics and Molecular Biology** 31: 555-560.
- Grisebach AHR (1963) **Flora of the British West Indian Islands**. New York, Wheldon e Wesley LTD and Hafner Publishing Co.
- Grover IS, Kaur S (1999) Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected micronucleus assays. **Mutation Research** 426: 183-188.
- Hayashi M, Tice RR, Macgregor JT, Anderson D, Blakey DH, Kirsch-Volders M, Oleson FB Jr, Pacchierotti F, Romagna F, Shimada H, Sutou S, Vannier B (1994) *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research** 312: 293-304.
- Iganci, JRV, Bobrowski VL, Stein VC, Rocha BHG (2006) Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivos do Instituto Biológico** 73: 79-82.
- Junqueira APF, Perazzo FF, Souza GHB, Maistro EL (2007) Clastogenicity of *Piper cubeba* (Piperaceae) seed extract in an *in vivo* mammalian cell system. **Genetics and Molecular Biology** 30: 656-663.
- Kirkland D, Kasper P, Müller L, Corvi R, Speit G (2008) Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: A follow-up to an

- ECVAM workshop. **Mutation Research** 653: 99-108.
- Krishna G, Hayashi M (2000) In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research** 455: 155-166.
- Lima SMRR (org.) (2006) **Fitomedicamentos na prática ginecológica e obstétrica**. Editora Atheneu, São Paulo.
- Macgregor JT, Heddle JA, Hite M, Margolin BH, Ramel C, Salamone MF, Tice RR, Wild D (1987) Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research** 189: 103-1012.
- Maistro EL, Carvalho JCT, Cascon V, Kaplan MAC (2005) *In vivo* evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. **Genetics and Molecular Biology** 28: 833-838.
- Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M (2006) Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie** 88: 515-1531.
- Oppalapudi RS, Riccio ES, Rausch LL, Shimon JA, Lee PS, Mortelmans KE, Kapetanovic IM, Crowell JA, Mirsalis JC (2007) Evaluation of chemopreventive agents for genotoxic activity. **Mutation Research** 629: 148-160.
- Perez SCJGA, Moraes JAPV (1991) Efeito da cumarina e de sua interação com giberelina na germinação de *Prosopis juliflora* (Sw) D.C. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 26: 1493-1501.
- Pires NM, Souza IRP, Prates HT, Faria TCL, Filho IAP, Magalhães PC (2001) Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 13: 55-65.
- Purves D, Harvey C, Tweats D, Lumley CE (1995) Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. **Mutagenesis** 10: 297-312.
- Rabello-Gay MN, Rodrigues MALR, Monteleone-Neto R (orgs) (1991) **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética.
- Ribeiro, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* (2003) In: Ribeiro, L.R, Salvadori, D.M.F, Marques, E.K. (2003) **Mutagênese Ambiental**, Canoas, Editora da ULBRA.
- Rojas A, Bah M, Rojas JI, Serrano V, Pacheco S (1999) Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Querétaro (México) for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytomedicine** 6: 367-371.
- Schultz A (1990) **Introdução à Botânica Sistemática**. 6 ed., v.02. Porto Alegre: Sagra.
- Soares LE, Belcavello L, Batitucci MCP, Amaral FT, Cunha MRH (2007) Avaliação dos efeitos cardiovasculares do extrato hidroalcoólico das folhas de *Zornia diphylla* (arrozinho-do-campo) em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos. In: **Anais do IV Encontro Científico de Ciências da Saúde**. Vitória, ES.
- Taiz L, Zeiger E (2004) **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre, Artmed.
- Teixeira RO, Camparoto ML, Mantovani MS, Vicentini, VEP (2003) Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology** 26: 551-555.
- Thomson AB, Wallace WHB (2002) Treatment of paediatric Hodgkin's disease: a balance of risks. **European Journal of Cancer** 38: 468-477.
- Valadares MC, de Castro NC, da Cunha LC (2007) *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** 43: 631-638.
- Vicentini VEP, Camparoto ML, Teixeira RO, Mantovani MS (2001) *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum** 23: 593-598.