



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA



RODRIGO DOS SANTOS ROCHA

**Avaliação da genotoxicidade de extratos de Boldo (*Plectranthus ornatus*) e
Graviola (*Annona muricata*) através do Ensaio Cometa e do Teste de
Micronúcleo em linfócitos humanos**

Feira de Santana, BA

2016

RODRIGO DOS SANTOS ROCHA

**Avaliação da genotoxicidade de extratos de Boldo (*Plectranthus ornatus*) e
Graviola (*Annona muricata*) através do Ensaio Cometa e do Teste de
Micronúcleo em linfócitos humanos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia,
da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para a
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dra. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira

Feira de Santana, BA

2016

Banca Examinadora

Evandro José Lima Rego

Prof. Dr.

Nora Ney Alves Santos

Prof(a). Dr(a).

Valéria Souza Freitas

Prof(a). Dr(a).

José Roberto Cardoso Meireles

Prof. Dr.

Prof(a) Dr(a). Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira

Orientadora e Presidente da Banca

Feira de Santana, BA

2016

Às minhas queridas Laura e Juliana

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar sempre saúde e coragem para correr atrás dos meus objetivos;

À Professora Eneida Cerqueira, pelo apoio incondicional, ensinamentos valiosos, paciência, “puxões de orelha”, orientação e principalmente pelo carinho que não da pra ser descrito, muito obrigado;

Aos membros da banca por aceitarem fazer parte desta;

Ao amigo Ronaldo Carvalho pela ajuda no treinamento dos testes aqui utilizados, sem o qual dificilmente teria conseguido;

Ao professor Alexandre Pinheiro pelo acolhimento em seu laboratório para que pudesse desenvolver os experimentos;

Ao amigo Andersom Moscoso pela ajuda na produção dos extratos;

À querida amiga Ângela Cristina pelo apoio, sempre me incentivando e segurando a onda nos momentos em que precisei;

À Vitória Caroline pela ajuda nas coletas de sangue e nos conselhos para que eu nunca desanimasse;

Ao amigo Grênivel, sempre presente nas horas em que precisei me acolhendo e ajudando sem medir esforços;

Aos amigos da UFRB, principalmente a amiga Núbia pela amizade e convivência sempre prazerosa;

À minha querida esposa, Juliana Carvalhais por nunca me deixar baixar a cabeça diante das dificuldades.

A todos os amigos, colegas e familiares que de certa maneira sempre me apoiaram, meu muito obrigado.

RESUMO

O uso de vegetais com fins medicinais contribui de forma significativa para o cuidado das necessidades primárias de assistência à saúde devido ao difícil acesso da população à assistência médica e farmacêutica, aos altos custos dos medicamentos industrializados e à uma tendência das pessoas a utilizarem produtos de origem natural. No entanto, informações técnico-científicas acerca da maioria deles, particularmente no que tange ao potencial genotóxico, são ainda insuficientes para que o uso possa ser considerado seguro. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos de extratos do boldo (*Plectranthus ornatus*) e da graviola (*Annona muricata*), através do ensaio cometa e do teste de micronúcleo em linfócitos humanos com bloqueio da citocinese (MNCtB). Os testes foram feitos em culturas de linfócitos humanos expostas aos extratos em três concentrações: 1.000µg/ml, 500µg/ml e 250µg/ml. Peróxido de hidrogênio (1mM) foi utilizado como controle positivo no ensaio cometa e sulfato de vincristina (1mM) no MNCtB. Como controle negativo foi usado o etanol 40% em ambos os testes. O processamento do material para o ensaio cometa e MNCtB foi feito de acordo, respectivamente, com os protocolos de Tice *et al.* (2000) e Fenech (1993). O ensaio cometa foi realizado em cinco repetições, sendo computados, em cada uma delas, 100 cometas em um total de duas lâminas. Para o MNCtB foram realizadas três repetições e computados 1.000 linfócitos binucleados por lâmina. A ocorrência de danos ao DNA (ensaio cometa) não diferiu entre as células das culturas expostas às diferentes concentrações dos extratos do boldo entre si e nem quando comparadas ao controle negativo. Maior ocorrência de micronúcleos (MNCtB) foi observada nas células das culturas tratadas com os extratos nas concentrações de 1.000µg/ml e de 500µg/ml quando comparadas ao controle negativo ($p < 0,05$) e às culturas tratadas com o extrato na concentração de 250µg/ml. Os extratos da graviola nas concentrações de 1.000µg/ml e 500µg/ml induziram ocorrência de danos ao DNA significativamente maior do que o observado no controle negativo e nas culturas tratadas com extrato na concentração de 250µg/ml ($p < 0,001$). Nas condições em que este estudo foi realizado, os resultados obtidos permitem concluir que: 1) extratos do boldo não são efetivos em induzir danos ao DNA, mas na dependência da concentração apresentam efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos; 2) extratos da graviola induzem danos ao DNA sob determinadas concentrações. Os resultados deste estudo suscitam fortemente a realização de outros abordando o tema, para que o real potencial genotóxico dos vegetais aqui analisados possa ser estabelecido.

Palavras-chave: boldo, *Plectranthus ornatus*, graviola, *Annona muricata*, genotoxicidade, ensaio cometa, teste de micronúcleo.

ABSTRACT

The use of vegetables with medicinal purposes contributes significantly to the care of the primary needs of assistance to health due to difficult access of the population to medical and pharmaceutical assistance, the high cost of manufactured medications and a tendency for people to use natural origin products. However, technical and scientific information about most of them, particularly with respect to the genotoxic potential, are still insufficient so that the use can be considered safe. In this context, the aim of this study was to evaluate the genotoxic effects of boldo extracts (*Plectranthus ornatus*) and soursop (*Annona muricata*), through the comet assay and micronucleus test in human lymphocytes with cytokinesis blocking (MNCtB). The tests were performed on human lymphocyte cultures exposed to the extracts in three concentrations: 1,000 μ g/ml, 500 μ g/ml and 250 μ g/ml. Hydrogen peroxide (1mM) was used as a positive control in the comet assay and vincristine sulfate (1mM) in MNCtB. As a negative control, 40% ethanol was used in both tests. The processing of the material for the comet assay and MNCtB was done according respectively to the protocols Tice et al. (2000) and Fenech (1993). The comet assay was performed in five repetitions being computed, in each of them, 100 comets in a total of two slides. For MNCtB three repetitions were performed and 1,000 binucleate lymphocytes were computed per slide. The occurrence of DNA damage (comet assay) did not differ between the cell of the cultures exposed to different concentrations of boldo extracts from each other nor compared to the negative control. Higher occurrence of micronuclei (MNCtB) was observed in the cell of the cultures treated with the extract at concentrations of 1,000 μ g/ml and 500 μ g/ml when compared to the negative control ($p < 0.05$) and cultures treated with the extract concentration of 250 μ g/ml. The soursop extracts at concentrations of 1,000 μ g/ml to 500 μ g/ml induced damage occurrence to the DNA significantly higher than that observed in the negative control and cultures treated with extract at a concentration of 250 μ g/ml ($p < 0.001$). The conditions in which this study was performed, the obtained results allow concluding that: 1) boldo extracts are not effective in inducing DNA damage, but depending on the concentration, they present clastogenic and/or aneugenic effects; 2) soursop extracts induce DNA damage under certain concentrations. The results of this study strongly raise the achievement of other addressing the issue, so that the actual genotoxic potential of vegetables analyzed here can be established.

Keywords: boldo, *Plectranthus ornatus*, graviola, *Annona muricata*, genotoxicity, comet assay, micronucleus test.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
3	CAPÍTULO 1	21
3.1	INTRODUÇÃO	23
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.3	RESULTADOS	28
3.4	DISCUSSÃO	30
	REFERÊNCIAS	33
4	CAPÍTULO 2	37
4.1	INTRODUÇÃO	39
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.3	RESULTADOS	43
4.4	DISCUSSÃO	45
	REFERÊNCIAS	47
5	CONCLUSÃO GERAL	47
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXOS	63

1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas para o tratamento de doenças remonta aos primórdios da humanidade. No passado as plantas medicinais (fitoterápicos) constituíam o principal recurso terapêutico para tratamento de doenças e foi a partir do conhecimento e do uso popular delas que foram descobertos muitos medicamentos utilizados na medicina moderna (VEILLEUX e KING, 1996).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada n.º 48/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), “fitoterápicos são medicamentos preparados exclusivamente com plantas ou partes destas (raízes, cascas, folhas, flores, frutos ou sementes) que possuem propriedades reconhecidas de cura, prevenção, diagnóstico ou tratamento sintomático de doenças, validadas em estudos etno/farmacológicos, documentações técnico-científicas ou ensaios clínicos de fase 3”.

Na América Latina, em especial nas regiões tropicais, a utilização de plantas com fins terapêuticos teve início com os índios, devido principalmente à enorme diversidade vegetal nessa região (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005).

No Brasil, a utilização de plantas com essa finalidade foi influenciada diretamente pelas culturas indígena, africana e européia. A cultura brasileira foi significativamente enriquecida por estas etnias, fundindo-se aos conhecimentos existentes (BORBA; MACEDO, 2006). Este país é detentor de uma flora abundantemente diversificada em todo seu território, com vegetações caracteristicamente distintas, das quais muitos princípios ativos são ainda desconhecidos. Estes, representam uma fonte importante de produtos naturais com atividades biológicas, constituindo modelos para a produção de um grande número de fármacos (VARANDA, 2006).

Vários são os vegetais utilizados como fitoterápicos em nosso país, a exemplo da erva-cidreira (*Melissa officinalis*), umburana-doce (*Amburana cearensis*), erva-doce (*Foeniculum vulgare*), hortelã (*Mentha arvensis*), quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*), capim-santo (*Cymbopogon citratus*), louro-de-cheiro (*Ocotea duckei*), e mastruz (*Chenopodium ambrosioides*) (MARQUES *et al.*, 2003; MIMICA-DUKIC *et al.*, 2004; HARISH e SHIVANANDAPPA 2006; KUMAR *et al.*, 2007; COUTINHO *et al.*, 2008; LEAL *et al.*, 2008; BLANCO *et al.*, 2009; KAUR e ARORA, 2009). Na Região Nordeste brasileira, entre as plantas mais comumente utilizadas para fins terapêuticos se destacam o boldo (*Plectranthus ornatus*), empregado tradicionalmente como analgésico e estimulante do apetite e principalmente nos casos de distúrbios do fígado e estômago (COSTA e NASCIMENTO,

2003) e a graviola (*Annona muricata*) empregada popularmente para o tratamento das dores de cabeça, insônia, cistite, problemas de fígado, diabetes, hipertensão, como antiinflamatório, antiespasmódico e antireumático (SOUSA *et al.*, 2010).

As informações técnico-científicas acerca da maioria das plantas utilizadas como fitoterápicos, no entanto, são insuficientes para que o uso delas possa ser considerado seguro. (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005). Adicionalmente, e de maneira equivocada, muitas pessoas acreditam que, por serem “produtos naturais”, a utilização de plantas com finalidade terapêutica é isenta de efeitos adversos à saúde. Tal uso, entretanto, pode desencadear efeitos indesejáveis, resultando por vezes em um quadro clínico grave e até fatal (PINHO *et al.*, 2010). Estes efeitos são decorrentes do fato das plantas sintetizarem substâncias tóxicas, que nelas têm a função de defesa contra infecções e ataque de animais, mas que podem, entre outros efeitos, apresentar potencial mutagênico e carcinogênico particularmente se utilizadas de forma indiscriminada (PERON *et al.*, 2008).

O câncer é uma doença genética que resulta de mutações em genes envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA; no controle da proliferação e da diferenciação celular. Além disso, alterações em genes das vias de apoptose podem contribuir para a promoção da doença, uma vez que células que têm DNA lesado escapam da morte e podem gerar descendentes geneticamente alteradas (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Neste contexto, se faz necessária a avaliação do potencial mutagênico de plantas utilizadas com fins terapêuticos (TEIXEIRA *et al.*, 2003). Os resultados de testes de genotoxicidade são de grande importância na produção de um novo medicamento, tanto é que a maioria das indústrias farmacêuticas libera o processamento de um novo agente terapêutico com base em testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (PURVES *et al.*, 1995).

A avaliação do potencial mutagênico de produtos farmacêuticos ou de plantas de uso medicinal pode ser realizada, entre outros bioensaios, através do ensaio cometa e do teste de micronúcleo em linfócitos humanos (FIGUEIREDO, 2012).

Neste estudo, considerando o largo uso na Região Nordeste brasileira, do boldo (*Plectranthus ornatos*) e da graviola (*Annona muricata*), empregados, como já comentado, com diversas finalidades terapêuticas, foram avaliados os efeitos genotóxicos de extratos destas plantas utilizando para tal o ensaio cometa e o teste de micronúcleo em linfócitos humanos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre o uso de fitoterápicos

As plantas produzem uma grande diversidade de substâncias que podem ter importância terapêutica para a manutenção da saúde humana e melhoria da qualidade de vida, justificando assim sua utilização na chamada medicina tradicional (RAVIKUMAR *et al.*, 2010). O emprego de plantas com fins medicinais é uma prática bastante difundida nos países em desenvolvimento, dado o fato de que muitos medicamentos industrializados têm um alto custo econômico, tornando essa prática por vezes no único recurso disponível para tratamento de uma dada doença (KAUR *et al.*, 2005).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS 2011), mostram que 70% a 90% das populações dos países em desenvolvimento fazem uso de plantas medicinais, o que levou esta organização a considerar tais plantas como importante instrumento na assistência farmacêutica. Quanto aos países industrializados dados, também de 2011 da OMS, revelam que o uso de plantas com fins medicinais é igualmente significativo, a exemplo do Canadá, França, Alemanha e Itália, onde 70% a 90% de suas populações têm usado este recurso da medicina tradicional (WHO, 2011). De acordo ainda com dados da OMS (2011), cerca de 25% dos medicamentos prescritos em todo o mundo são oriundos de vegetais e das 252 drogas consideradas por esta organização como básicas e essenciais, 11% são exclusivamente de origem vegetal e um número significativo destas são produtos sintéticos obtidos a partir de precursores naturais. Segundo Rates (2001), 60% dos fármacos anti-tumorais e anti-infecciosos já existentes no mercado ou sob ensaio clínico são originários de recursos naturais.

Cerca de 82% da população brasileira, segundo Rodrigues e De Simone (2010) utilizam produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde, prática adquirida pelo conhecimento tradicional indígena, quilombola ou de outros povos e comunidades tradicionais. Estes autores consideram que tal prática incentiva o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social.

O Brasil é detentor de uma grande diversidade de plantas medicinais, muitas das quais bastante utilizadas como fitoterápicos. No entanto, poucos são os estudos científicos dirigidos para a identificação real das propriedades farmacológicas e dos efeitos adversos de plantas que são comumente utilizadas em diversas populações (PERON *et al.*, 2008).

2.2 Efeitos genotóxicos de plantas utilizadas como fitoterápicos

Indivíduos que se automedicam com ervas ou outras plantas para prevenção e terapia de doenças partem frequentemente do pressuposto de que seu uso é seguro por se tratarem de “produtos naturais”. No entanto, algumas delas podem causar efeitos adversos cumulativos entre si ou por interagirem com outros medicamentos (ZINCK e CHAFFIN, 1998).

Investigações realizadas *in vitro* têm revelado que muitas plantas usadas como alimentos ou na medicina tradicional apresentam efeitos genotóxicos, fato preocupante e que serve de alerta para os riscos de desenvolvimento de câncer consequentes ao uso a longo prazo dessas plantas (GADANO *et al.*, 2002; ARORA *et al.*, 2005; FAGUNDES *et al.*, 2005; CARDOSO *et al.*, 2006; RAZAK *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008; PINHO *et al.*, 2010).

Gadano *et al.* (2002) avaliaram a cinética de proliferação celular (CPC), o índice mitótico (IM), a ocorrência de aberrações cromossômicas (AC) e de troca entre cromátides irmãs (TCI) em linfócitos humanos tratados com extratos em diferentes concentrações (1mg/ml, 10mg/ml, 100mg/ml e 1000mg/ml) oriundos de *Chenopodium ambrosioides* (Chenopodiaceae), erva utilizada na América Latina como anti-helmíntico. Os autores identificaram um aumento significativo no percentual de células com AC e na frequência de TCI e uma diminuição no IM nos linfócitos com extratos obtidos tanto por decocção quanto por infusão das plantas, mas nenhuma modificação nos valores de CPC foi observada.

Arora *et al.* (2005) avaliaram, com o uso do ensaio cometa e do teste VITOTOX, a ação genotóxica de extratos de três plantas medicinais: *Acacia nilotica*, *Juglans regia*, e *Terminalia chebula*. No teste VITOTOX, que identifica danos ao DNA de procariotos, nenhum dos extratos apresentou efeito genotóxico em três cepas de *Salmonella typhimurium*. No ensaio cometa, realizado em culturas de linfócitos humanos, as concentrações testadas foram de 2.500ppm, 500ppm e 250ppm. Extratos de *Acacia nilótica*, na concentração de 2.500ppm induziram maior ocorrência de danos ao DNA em comparação ao controle negativo. Os extratos de *Juglans regia* foram genotóxicos em concentrações acima de 250ppm, e os extratos de *Terminalia chebula* aumentaram significativamente os danos em concentrações superiores a 500ppm. Segundo estes autores os resultados obtidos nos dois testes empregados não podem ser considerados contraditórios uma vez que danos ao DNA observados no ensaio cometa podem não ser permanentes e, assim, não resultarem em mutações.

Estudo objetivando investigar a ação genotóxica de *Annona coriacea*, espécie largamente utilizada na etnofarmacologia devido as suas propriedades farmacológicas atribuídas principalmente às acetogeninas, foi realizado por Fagundes *et al.* (2005). Para tal empregaram o teste de micronúcleo em eritrócitos da medula óssea de camundongo. Os resultados mostraram que o extrato alcoólico das sementes desta planta, nas diferentes doses utilizadas (50mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg ou 400mg/kg) induziu um aumento significativo na frequência de micronúcleos, similar àquele observado com o controle positivo (ciclofosfamida, 250mg/kg). Segundo os autores, estes resultados sugerem que esta planta, nas condições experimentais avaliadas, possui um potencial significativo para induzir danos cromossômicos.

Byrsonima crassa é uma planta comumente encontrada no cerrado brasileiro, conhecida tradicionalmente por Murici-cascudo ou murici-vermelho e popularmente usada para o tratamento das disfunções estomacais e diarreias. O potencial mutagênico de extratos metanólicos de plantas desta espécie foi avaliado por Cardoso *et al.* (2006) através do computo da ocorrência de mutações gênicas em *Salmonella typhimurium* (linhagens TA100, TA98, TA102 e TA97) e de micronúcleos em reticulócitos de ratos. Os resultados mostraram atividade mutagênica do extrato apenas na linhagem TA98.

Razak *et al.* (2007), com o uso do teste de Ames modificado (teste de flutuação), avaliaram o potencial mutagênico de três plantas empregadas em algumas regiões do sudeste da Ásia para melhorar a função sexual: *Tacca integrifolia*, *Eurycoma longifolia* e *Helmintostachys zeylanica* (L.). Extratos de *Tacca integrifolia*, mas não os extratos das plantas das outras duas espécies, induziram mutações em cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100.

Santos *et al.* (2008), utilizando o ensaio cometa e o teste de micronúcleos em linfócitos humanos, avaliaram o efeito genotóxico de extratos de folhas de *Physalis angulata* (Solanaceae), planta encontrada no Norte do Brasil, cujos extratos e infusões são comumente usados na medicina popular para o tratamento da malária, asma, hepatite, dermatite e reumatismo. O ensaio cometa mostrou que os tratamentos com extratos em todas as concentrações analisadas (0,5µg/ml, 1,0µg/ml, 2,0µg/ml, 3,0µg/ml e 6,0µg/ml) aumentaram significativamente a ocorrência de danos ao DNA. Os extratos nas concentrações de 3,0µg/ml e 6,0µg/ml induziram aumento estatisticamente significativo na frequência de micronúcleos ($p < 0,05$).

Pinho *et al.* (2010) objetivando avaliar a mutagenicidade da *Baccharis trimera* (carqueja), espécie da família Asteraceae cujas folhas são muito utilizadas como chá no sul

do Brasil para o tratamento de doenças renais, intestinais, estomacais e principalmente como emagrecedora, analisaram a ocorrência de micronúcleos e anomalias do ciclo mitótico em células de *Allium cepa* L. e a ocorrência de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. Para os dois testes foram utilizados quatro tratamentos: T1 (água); T2 (20g/L de carqueja); T3 (200g/L de carqueja), e T4 (paracetamol, a 400mg/L). Efeitos do tipo dose/resposta foram observados tanto nas células vegetais quanto nos linfócitos humanos, tendo os autores sugerido o uso com moderação deste tipo de chá.

Diante do exposto, e dada a íntima relação entre danos genéticos e câncer, a avaliação dos efeitos genotóxicos dos metabólitos secundários dos vegetais utilizados na medicina tradicional é, portanto, de fundamental importância para identificação dos possíveis riscos à saúde humana decorrentes de seu consumo (VARANDA *et al.*, 2004).

2.3 Testes para detecção de danos genéticos

2.3.1 O Teste de Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese

O Teste de Micronúcleo em linfócitos humanos, com Bloqueio da Citocinese (MNCtB), proposto por Fenech e Morley (1985), é uma metodologia utilizada para quantificar *in vitro* a ocorrência de danos cromossômicos através do computo da frequência de micronúcleos (MN) em linfócitos humanos binucleados.

Micronúcleos são estruturas que medem de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo, contidas por envoltório nuclear e que apresentam material cromatínico distribuído de forma similar ao do núcleo. Como ilustrado na Figura 1, são formados durante o período de divisão celular em consequência de quebras cromossômicas ou de cromossomos inteiros que, por não se ligarem às fibras do fuso, não são incluídos nos núcleos das células filhas (SCHMID, 1975). Revelam, portanto, a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos.

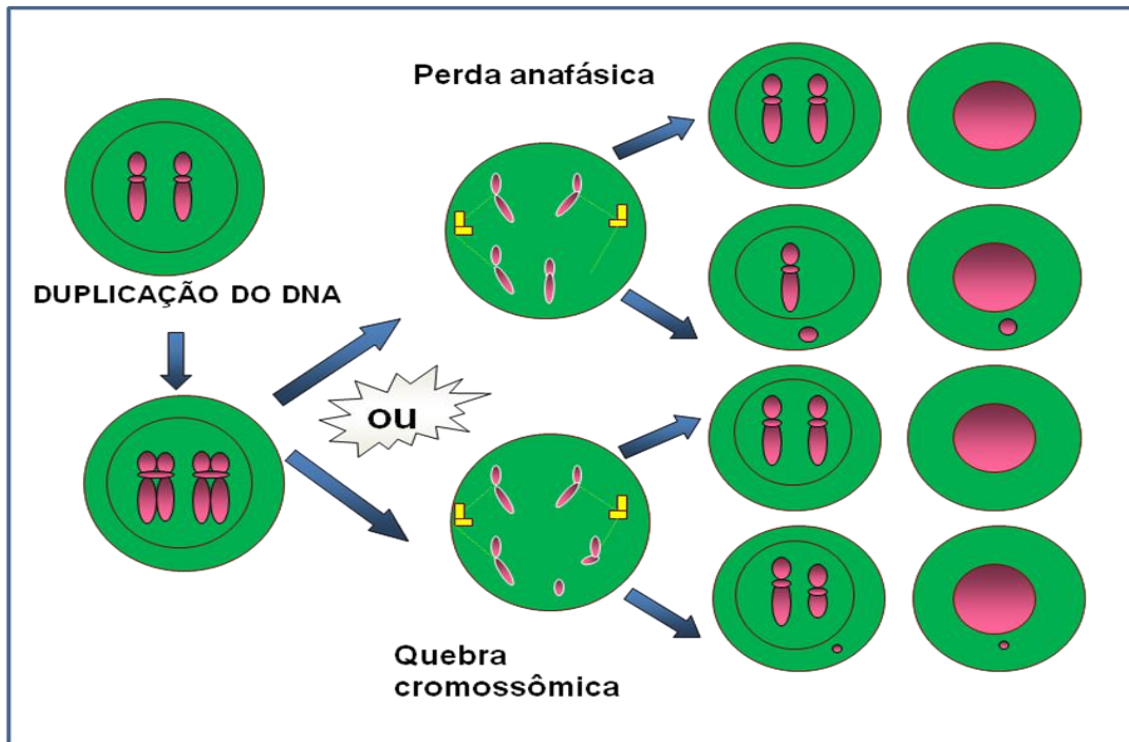


Figura 1. Mecanismo de formação do Micronúcleo. Por Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira

No teste de micronúcleo em linfócitos humanos, diferentemente do ilustrado na fig.1, as células têm sua divisão bloqueada na citocinese pela ação da citocalasina B, que é um inibidor da polimerização da proteína actina necessária para a formação do anel de microfilamentos responsável pela indução da contração do citoplasma e consequente clivagem da célula em duas células-filhas (FENECH, 2000; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003). Como micronúcleos só se formam durante a divisão celular, este bloqueio revela as células que sofreram tal processo, de modo que a análise dos micronúcleos, fica restrita às células binucleadas, o que evita subestimativas da sua frequência (Figura 2). Com isso esta metodologia propicia a comparação da frequência de danos cromossômicos entre linhagens celulares que podem diferir quanto a sua cinética de divisão e confere à técnica boa reprodutibilidade e confiabilidade, tornando o MNCTB um dos testes citogenéticos padrões na genética toxicológica (FENECH, 2007).

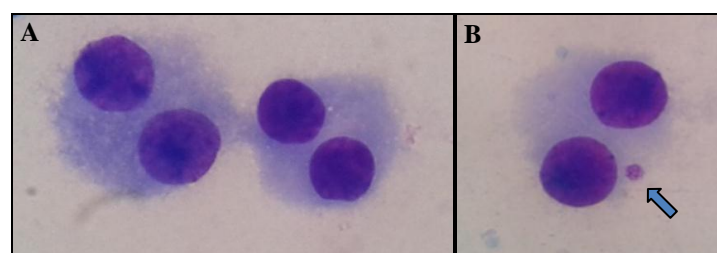


Figura 2. Linfócitos binucleados normais (a) e micronucleado (b)

2.3.2 Ensaio cometa

Ao longo da última década, o ensaio cometa, ou eletroforese em gel de célula única (SCGE), tornou-se um dos métodos padrão para avaliação de danos ao DNA, com aplicações na avaliação da genotoxicidade de um dado composto, no biomonitoramento humano, bem como na avaliação da ocorrência de reparação do DNA (COLLINS, 2004).

O "estudo microelectroforético" de danos no DNA em células individuais foi primeiramente descrito por Ostling e Johanson (1984). Esta técnica de eletroforese em gel de célula única tem sido modificada e extensivamente validada ao longo dos anos, e é agora comumente referida como ensaio cometa (MCKELVEY-MARTIN *et al.*, 1993; COLLINS, 2004).

O SCGE é um procedimento que avalia lesões de DNA (rupturas dos filamentos e sítios álcali-lábil), envolvendo a aplicação de uma corrente eléctrica, o que resulta no transporte de fragmentos de DNA para fora do núcleo, formando uma imagem semelhante a um cometa com uma cabeça e uma cauda. Uma vez que o dano ao DNA seja induzido por agentes genotóxicos, o ensaio cometa se mostra muito útil porque pode detectar lesões do DNA em células individuais obtidas sob uma variedade de condições experimentais (TICE e STRAUSS, 1995). Uma vantagem significativa do ensaio SCGE é a sua aplicabilidade a qualquer organismo eucariótico em qualquer tipo celular tanto *in vitro* como *in vivo* (COLLINS *et al.*, 1997)

É uma técnica que tem como princípio básico a lise de membranas celulares, possibilitando por eletroforese a migração do DNA em um filme de gel de agarose disposto sobre lâmina de microcopia. O cometa é visualizado por coloração com um corante de DNA fluorescente (TICE e STRAUSS, 1995; TICE *et al.*, 2000) ou coloração com prata (CLINGEN *et al.*, 2000).

A análise dos danos ao DNA refletida na cauda do cometa é feita visualmente ou através de programas de computador. Em qualquer das duas formas de análise, são classificados em cinco categorias que representam os níveis dos danos ao DNA, sendo estes: 0 - sem dano, 1- baixo nível de dano, 2- médio nível de dano, 3- alto nível de dano e 4- dano total (Figura 3).

Apesar de nos estudos mais recentes a análise automatizada ser mais frequentemente empregada, a análise visual ainda é bastante utilizada em muitos estudos: Luiz *et al.*, 2003, Rodeiro *et al.*, 2006, Cavalcante *et al.*, 2006, Tsuboy *et al.*, 2010, Gonçalves *et al.*, 2012, Marques *et al.*, 2012, Sampaio *et al.*, 2012, Silva 2012, Rebouças *et al.*, 2013 e Khisroon *et*

al., 2015. Adicionalmente, Dhawan *et al.*, 2009 e Wong *et al.*, 2005 consideram que a interpretação dos resultados analisados visualmente ou de forma automatizada não os diferenciam. Segundo Collins *et al.* 2004, a análise dos danos ao DNA traduzidos em cometas, sem o uso de sofisticados programas de imagem é confiável, pois o olho humano é facilmente treinado para discriminar as diferenças na análise.

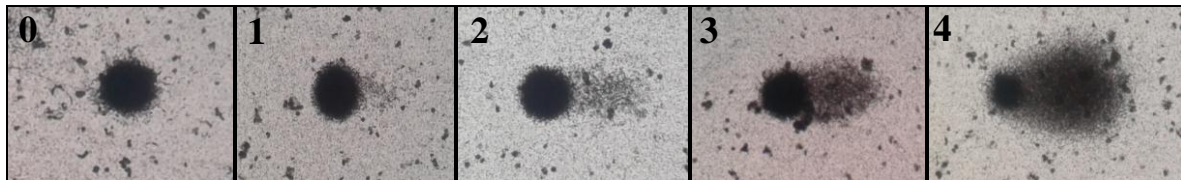


Figura 3. Níveis de danos ao DNA evidenciados no ensaio cometa: 0 - sem dano, 1- baixo nível de dano, 2- médio nível de dano, 3- alto nível de dano e 4- dano total

2.4 Plantas avaliadas neste estudo: descrição botânica e ocorrência

2.4.1 Boldo (*Plectranthus ornatus*)

O boldo (*Plectranthus ornatus*) pertence à família Lamiaceae que é originária de países do Mediterrâneo e Oriente, tendo sido introduzida no novo mundo através dos descobrimentos portugueses (século XVI). Esta família abrange cerca de 200 gêneros e 3.200 espécies sendo que, destas, 300 pertencem ao gênero *Plectranthus* e diversas delas são apontadas como tendo propriedades terapêuticas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007).

No Nordeste do Brasil, a espécie *Plectranthus ornatus*, popularmente conhecida como boldo, boldo chinês, boldo gambá, boldo miúdo ou boldo rasteiro (Figura 4) se destaca pelo uso largamente disseminado. Suas folhas são usadas para fins terapêuticos diversos como: redução das secreções gástricas, vermícidas, antissépticos, purgativos, analgésico, anti-inflamatórios, antieméticos (MAURO *et al.*, 2008).



https://www.google.com.br/search?hl=ptBR&site=imghp&tbm=isch&source=hp&biw=1266&bih=666&q=plectranthus+ornatus&oq=plectranthus+or&gs_l=img-3.0.0.10.1466.DD7AVnLXV6w

Figura 4. Planta do boldo (*Plectranthus ornatus*)

Estudos da composição química desse vegetal revelam diversos constituintes, destacando-se os fenilpropanol como timol, carvacrol, eugenol (ALBUQUERQUE *et al.*, 2007) e diterpenóides como abietano, caurano, labdano, clerodano e halimano (RIJO *et al.*, 2012).

2.4.2 Graviola (*Annona muricata*)

A *Annona muricata* (Figura 5) conhecida como graviola, pertence à família Annonaceae, na ordem Magnoliales, família essa que se encontra entre as angiospermas mais primitivas. Tem origem nas antilhas e é encontrada principalmente em regiões tropicais e subtropicais, popularmente conhecida como “graviola”, “pinha” e “guanabana” “anona-de-espinho”, “jaca-de-pobre”, “jaca-do-pará”, “coração-de-rainha”, “araticum-grande” e “araticum- manso”. A família Annonaceae possui aproximadamente 2.500 espécies, sendo 109 nativas da América tropical e dez da África tropical (GEURTS, 1981).



https://www.google.com.br/search?hl=pt-BR&site=inghp&tbn=isch&source=hp&biw=1266&bih=666&q=plectranthus+ornatus&oq=plectranthus+or&gs_l=img.BR&tbn=isch&q=graviola+arvore&imgre=UHylQNU8ySLGIM%3A

Figura 5. Arvore e fruto da graviola

Annona muricata é uma planta decídua, facilmente encontrada em quase todos os países tropicais. No Brasil é distribuída principalmente no Norte e Nordeste, adaptada a baixa altitude e climas úmidos, vegetando bem em altitudes de até 1.200m. Requer temperatura média anual variável de 21°C a 30°C (sem quedas abaixo de 12°C), chuvas acima de 1.000 mm/ano bem distribuídos (100mm/mês) e umidade relativa do ar entre 75% e 80%.

Pode chegar a 12m de altura, possui folhas verdes brilhantes e flores hermafroditas branco-amareladas, grandes e isoladas, que nascem no tronco e nos ramos. Sua floração pode iniciar-se no terceiro ou quarto ano após plantio da semente e o fruto (sincarpo) tem forma ovalada, podendo atingir 10kg e comprimento médio de 30cm e possui abundância de sementes que são envolvidas por uma polpa branca (PINTO *et al.*, 2005).

Análises fitoquímicas da *Annona muricata* revelaram a presença de compostos fenólicos, alcalóides, flavonóides e terpenos. As acetogeninas incluem-se entre os seus principais metabólitos secundários, são exclusivos das Annonaceae, e derivam de ácidos graxos de cadeia longa. Estes metabólitos são considerados importantes alternativas para o desenvolvimento de drogas antitumorais (BRITO *et al.*, 2008).

Segundo Sousa *et al.* (2010), a graviola é popularmente utilizada para o tratamento das dores de cabeça, insônia, cistite, problemas de fígado, diabetes, hipertensão, como antiinflamatório, antiespasmódico e antireumático.

2.5 Estudos avaliando a genotoxicidade de boldo (*Plectranthus ornatus*) e graviola (*Annona muricata*)

O registro na literatura de estudos em que foi investigada a genotoxicidade das plantas avaliadas no presente trabalho se resume à publicação do artigo de Garcia e Nepomuceno (2011). Estes autores empregaram o teste SMART em *Drosophila melanogaster*, na avaliação dos efeitos genotóxicos de extratos obtidos do fruto de *Annona muricata*. Efeitos genotóxicos não foram descritos e a avaliação da ação antigenotóxica revelou efeito protetor.

Considerando o largo consumo em diversas populações dos chás de boldo (*Plectranthus ornatus*) e graviola (*Annona muricata*), importante se faz a realização de estudos, visando identificar seu potencial mutagênico. Sem dúvida, esta é uma estratégia importante na redução dos riscos de desenvolvimento de câncer, uma vez que plantas apresentando propriedades mutagênicas devem ser consideradas como potencialmente perigosas para o desenvolvimento de câncer (VERSCHAEVE e VAN STADEN, 2008). Por outro lado, é possível que estas plantas ao invés de genotoxicidade, apresentem efeitos antimutagênicos de modo que pesquisas objetivando identificar agentes capazes de inibir ou diminuir tais efeitos podem ser de grande valia, contribuindo para a prevenção do câncer (VERSCHAEVE e VAN STADEN, 2008).

3 CAPÍTULO 1

Avaliação da genotoxicidade do extrato de Boldo (*Plectranthus ornatus*) através do ensaio cometa e do teste de micronúcleo em linfócitos humanos¹

RESUMO

Entre os muitos vegetais consumidos no nordeste brasileiro com fins medicinais destaca-se o boldo (*Plectranthus ornatus*), empregado principalmente nos casos de distúrbios do fígado e estômago. Não há, contudo, registro na literatura de estudos avaliando sua genotoxicidade. Neste contexto, este estudo objetivou avaliar os efeitos genotóxicos de extratos deste vegetal, através do ensaio cometa e do teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese (MNCtB). Os testes foram feitos em culturas de linfócitos humanos expostas aos extratos em três concentrações: 1.000µg/ml, 500µg/ml e 250µg/ml. Peróxido de hidrogênio (1mM) foi utilizado como controle positivo no ensaio cometa e sulfato de vincristina (1mM) no MNCtB. Etanol (40%) foi utilizado como controle negativo. O ensaio cometa foi realizado em cinco repetições, sendo computados em cada uma delas 100 cometas em um total de duas lâminas (50/lâmina). Para o MNCtB foram realizadas três repetições e computados 1000 linfócitos binucleados. A ocorrência de danos ao DNA (ensaio cometa) não diferiu entre as células das culturas expostas às diferentes concentrações dos extratos e nem quando comparadas ao controle negativo. Maior ocorrência de micronúcleos foi observada nas células das culturas tratadas com os extratos nas duas maiores concentrações quando comparadas ao controle negativo ($p < 0,05$). Nas condições em que este estudo foi realizado, os resultados obtidos permitem concluir que os extratos do boldo não são efetivos em induzir danos ao DNA, mas na dependência da concentração apresentam efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos.

Palavras-chave: boldo, *Plectranthus ornatus*, genotoxicidade, ensaio cometa, teste de micronúcleo.

¹ Artigo formatado de acordo com as instruções para autores do periódico Mutation Research (anexo I)

ABSTRACT

Evaluation of genotoxicity of the boldo extract (*Plectranthus ornatus*) through the comet assay and micronucleus test in human lymphocytes

Among the many vegetables consumed in northeastern of Brazil with medical purposes the boldo (*Plectranthus ornatus*), highlights itself, used mainly in cases of disorders of the liver and stomach. There is, however, no registration in the literature evaluating its genotoxicity. In this context, this study aimed to evaluate the genotoxic effects of extracts of this vegetable, through the comet assay and micronucleus test with cytokinesis blocking (MNCtB). The tests were performed on human lymphocyte cultures exposed to the extracts in three concentrations: 1,000µg/ml, 500µg/ml and 250µg/ml. Hydrogen peroxide (1mM) was used as a positive control in the comet assay and vincristine sulfate (1mM) in MNCtB. Ethanol (40%) was used as a negative control. The comet assay was performed in five repetitions, computed in each 100 comets in a total of two slides (50/slide). For MNCtB three repetitions were performed and 1,000 binucleate lymphocytes computed. The occurrence of damage in the DNA (comet assay) did not differ between cell cultures exposed to different concentrations of the extracts nor when compared to the negative control. Increased occurrence of micronuclei was observed in the cells of cultures treated with the extracts in the two higher concentrations when compared to negative control ($p < 0.05$). The conditions in which this study was performed, the results showed that, the boldo extracts are not effective in inducing damage to the DNA, but depending on the concentration it presents clastogenic and/or aneugenic effects.

Keywords: boldo, *Plectranthus ornatus*, genotoxicity, comet assay, micronucleus test.

1. Introdução

O uso de vegetais com fins terapêuticos foi, historicamente, muito cedo incorporado pelo homem e perdura largamente em tempos atuais o que se deve ao fato de que uma grande porcentagem da população mundial não tem acesso ao tratamento farmacológico convencional [1]. No Brasil, tal prática decorre principalmente do alto custo dos medicamentos industrializados e também do difícil acesso da população à assistência médica e farmacêutica [2].

Muitas são as plantas popularmente reconhecidas como eficazes no tratamento de doenças, a exemplo da erva-cidreira (*Melissa officinalis*), hortelã (*Mentha arvensis*), quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*), capim santo (*Cymbopogon citratus*), louro-de-cheiro (*Ocotea duckei*) [3-7]. Na Região Nordeste brasileira, destaca-se o boldo (*Plectranthus ornatus*), empregado tradicionalmente como analgésico e estimulante do apetite e principalmente nos casos de distúrbios do fígado e estômago [8].

Em que pesem as propriedades medicinais que plantas possam apresentar, há que levar em conta o fato de que muitos produtos delas podem apresentar efeitos adversos o que é preocupante dado o fato de que, por serem “naturais”, são consideradas inócuas por seus consumidores que, muitas vezes, delas fazem uso indiscriminado [9,10].

Segundo Santos *et al.* [11], em extratos obtidos de algumas plantas podem ser encontrados componentes químicos com potencial mutagênico e/ou carcinogênico, os quais, ao interagir com a molécula de DNA em sequências que correspondem a genes envolvidos no ciclo celular, podem dar origem ao processo de transformação maligna.

A avaliação genotóxica de extratos de plantas utilizadas com fins medicinais é, portanto, de grande importância para a segurança de seu uso assim como é importante avaliar se, ao invés de induzirem efeitos genotóxicos, apresentam atividade antigenotóxica.

Para tal, vários testes estão disponíveis e entre eles destacam-se o ensaio cometa, efetivo em detectar danos ao DNA, e o teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese (MNCtB), que expressa perdas ou quebras cromossômicas. Estes testes foram utilizados neste estudo para avaliar os efeitos genotóxicos de extratos do boldo (*Plectranthus ornatus*) em linfócitos humanos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta e identificação do material vegetal

As plantas de Boldo (*Plectranthus ornatus*) foram coletadas na cidade de Retirolândia, situada no nordeste da Bahia, em quintal de residência onde eram cultivadas, ao lado de outras plantas, para uso com fins medicinais. Retirolândia está situada a 293 metros de altitude, Latitude: 11° 28' 46" Sul, Longitude: 39° 24' 58" Oeste, e conta, segundo censo do IBGE de 2010 [12], com 12.055 habitantes. A área da cidade onde a residência está localizada é uma área inteiramente residencial, com praticamente nenhuma exposição à tráfego de veículos ou fumaça de fábricas. Segundo informações da proprietária, o solo onde as plantas são cultivadas não tem aditivos químicos e, fora do período de chuvas, sua rega é feita com água encanada fornecida pela Empresa Baiana de Águas e Saneamento (EMBASA).

Fazendo uso de uma tesoura de poda, foram coletados, em um mesmo dia, por volta das 7h da manhã, caules e folhas de cerca de 50 plantas. Destas, duas foram utilizadas para confecção, no local da coleta, das exsicatas que foram encaminhadas, juntamente com algumas flores coletadas posteriormente, para o Herbário da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (HURB) onde foi feita a identificação por um botânico (Registro HURB 11211). O restante do material coletado foi acondicionado em sacos de papel madeira para transporte até o Laboratório de Extração de Produtos Vegetais (LAEX), localizado no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), onde foi produzido o extrato.

2.2. Preparação do extrato

Para obtenção do extrato, o material coletado (cerca de 48 plantas), foi posto para secar durante 14 dias em estufa a 60°C e em seguida as plantas foram pulverizadas em moinho de facas obtendo-se, assim, 710g de matéria seca. Este material foi colocado em erlenmeyer contendo três litros de álcool (70%) para obtenção do extrato por maceração. Objetivando aumentar a eficiência da extração o material foi então submetido à ultrassom por uma hora e deixado por cinco dias em contato com o álcool (70%). O procedimento de extração foi repetido por mais três vezes, sendo concluído portanto após 20 dias. O extrato obtido foi então filtrado a vácuo com papel filtro e concentrado em rota-evaporação com pressão negativa (730mmHg) a 60°C, acondicionado em 3 bekers que foram colocados em estufa a 60°C por três dias para atingir peso constante. Uma vez atingido o peso constante, o material foi

mantido sob refrigeração (4°C) e transportado em isopor com gelo para o Laboratório de Bioquímica e Imunologia Veterinária da UFRB. Neste laboratório foi feito inicialmente o congelamento em ultra freezer à -80°C para que pudesse ser feita no liofilizador a retirada da água para obtenção do extrato em pó, o que demandou um tempo de 24h. Finalmente este material foi armazenado em frascos estéreis em freezer à -4°C.

2.3. Testes de solubilidade

Foram realizadas diluições com três diferentes veículos: dimetilsulfóxido (DMSO), etanol 40% e água destilada (0,1g do extrato para 1ml do veículo) para verificar a solubilidade do extrato. A melhor dissolução do extrato foi obtida com etanol a 40%, sendo este o veículo utilizado para diluir o extrato (solução estoque de 25.000µg/ml).

2.4. Determinação das concentrações

Para determinar as concentrações dos extratos a serem utilizados nos experimentos, foram realizados testes de viabilidade celular de exclusão com azul de Tripán, em sangue total com os extratos nas seguintes concentrações: 2.000µg/ml, 1.000µg/ml, 500µg/ml, 250 µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml. Para cada uma destas concentrações foram usados 200µl de sangue total em 3ml de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal estéril e exposto por períodos de 1h, 2h, 4h e 8h em estufa de crescimento celular a 37°C e com 5% de CO₂, após o que 20µl da suspensão celular e 20µl de azul de Tripán (0,4%) foram colocados e homogeneizados em eppendorf esterilizado. Após a homogeneização, foram colocados 20µl desta solução em Câmara de Neubauer para determinar a porcentagem de células viáveis. Para todas as concentrações testadas a viabilidade celular foi acima de 90%, sendo escolhidas para avaliação, tanto de danos ao DNA (ensaio cometa) quanto de danos cromossômicos (teste de micronúcleos), as concentrações de 1.000µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml, obtidas da solução estoque.

2.5. Ensaio cometa

Foram feitas cinco coletas de sangue de um único doador voluntário (3ml por coleta), por um profissional capacitado, com intervalos de uma semana. A escolha de um só doador

foi fundamentada nos estudos de Vijayalaxmi, Tice e Strauss [13], Juchimiuk, Gnys e Maluszynska [14], Siddique *et al.* [15], Gupta *et al.* [16] e Silva [17].

O sangue coletado foi centrifugado para separação dos leucócitos por dez minutos a 2.500 rpm. O anel de leucócitos, pequena quantidade de plasma e soro (aproximadamente 500µl) foram então transferidos para eppendorf e homogeneizados.

Para avaliação da atividade genotóxica, 40µl, 20µl e 10µl da solução estoque do extrato, foram adicionados separadamente à 1ml do meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino, correspondendo, respectivamente, às concentrações de 1.000µg/ml, 500µg/ml e 250µg/ml. Cada uma destas soluções foi adicionada à placas de culturas contendo 20µl do material obtido do sangue após centrifugação e homogeneização. Como controle positivo foi usado o peróxido de hidrogênio (1mM) e como controle negativo etanol 40%. Para cada um dos tratamentos, o tempo de exposição foi de 2h.

Após o período de exposição aos extratos, as células foram transferidas para eppendorf e centrifugadas a 1.000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o material celular restante foi então misturado com agarose de baixo ponto de fusão, rapidamente colocado sobre lâmina de microscópio com pré-cobertura de agarose com ponto de fusão normal. Uma lamínula foi colocada para que o material se espalhasse uniformemente e posteriormente retirada após permanecer por cinco minutos em geladeira. A seguir, as lâminas foram imersas por 24h em cubetas contendo solução de lise (NaCl 2,5M, Tris 10 mM e EDTA 100mM) e mantidas em geladeira durante este período, findo o qual foram transferidas para cuba de eletroforese previamente envolvida em cubos de gelo. As lâminas foram então cobertas por solução tampão (NaOH 300mM, EDTA 100mM) e submetidas a uma corrente elétrica (25v; 300mA) durante 20 minutos, protegidas da luz, proporcionando a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras.

Ao final da eletroforese, as lâminas foram seguidamente lavadas por três vezes com solução neutralizadora (Tris 10mM, HCl 40mM) e com água destilada (uma vez). Após secagem, foram submersas em solução de fixação (CCl_3COOH , ZnSO_4 e $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) durante dez minutos e posteriormente lavadas com água destilada.

Após 24h as lâminas foram coradas com solução de nitrato de prata (0,1%) durante 30 min, sendo posteriormente lavadas três vezes com água destilada e imersas por 5 minutos em solução a 1% de ácido acético e novamente lavadas por três vezes com água destilada.

As avaliações foram feitas duas lâminas de cada uma das culturas e os experimentos foram realizados em cinco repetições sendo considerado para análise estatística a média dos resultados obtidos nestes cinco experimentos.

A identificação dos danos ao DNA foi realizada sob microscopia óptica com aumento de 400X, levando em consideração o padrão de escores determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa, sendo computados 100 cometas (50 em cada uma das duas lâminas feitas), os quais foram classificados visualmente em cinco categorias que representam o grau do dano sofrido pelas células: 0 = sem dano, 1- baixo nível de dano, 2- médio nível de dano, 3- alto nível de dano e 4- dano total.

2.6. Teste de micronúcleo

A cultura de linfócitos para o Teste de micronúcleo foi realizada segundo protocolo de Fenech [18].

Quatrocentos microlitros do sangue total, coletados em tubos heparinizados, foram adicionados a 5ml de meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro bovino fetal em placas de crescimento de cultura celular. Para obtenção de células em divisão e para evitar a contaminação bacteriana das culturas foram, respectivamente, adicionados à elas 100µl de fitohemaglutinina a 2% e 125µl de gentamicina. As culturas foram mantidas em estufa de crescimento a 37°C com 5% de CO₂ por um total de 72h.

Após 24h em estufa, as culturas foram tratadas com as três concentrações do extrato 1.000µg/ml, 500µg/ml 250µg/ml. O controle positivo usado foi a Vincristina (1mM) e o controle negativo foi o veículo de diluição (etanol 40%). Para promover o bloqueio da citocinese, promovendo com isso a formação de linfócitos binucleados, citocalasina B na concentração de 4µg/ml foi 20h após tratamento acrescentada às culturas. Ao final das 72h, o conteúdo dos frascos foi transferido para tubos de centrífugas e submetidos à centrifugação a 1.000rpm por oito minutos. O sobrenadante foi desprezado e foram acrescentados 4mL de solução de cloreto de potássio (KCl) 0,075M e 4mL de solução fixadora de metanol/acido acético 3:1. Este procedimento foi repetido por três vezes, após o que as células foram resuspendidas em 1ml de solução fixadora que foi gotejada em lâmina de vidro até cobri-la por inteiro. A lâminas foram deixadas secar à temperatura ambiente por no mínimo 2h, coradas com solução de Giemsa a 5% durante 10min e montadas com lamínulas fixadas com *entellan*.

Foram feitas três repetições do teste para todas as culturas e para o computo do total de células binucleadas e da ocorrência de micronúcleos foi considerado o total obtidos nestas três repetições.

As lâminas foram analisadas em teste cego sob microscópio óptico com objetiva de 40X. Foram considerados micronúcleos as estruturas arredondadas com diâmetro de até 1/3

do diâmetro do linfócito [19]. Para cada uma das três repetições do teste, foram analisados mil linfócitos binucleados totalizando 3.000 por cada concentração testada.

2.7. Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos para o ensaio cometa foi feita com o uso da ANOVA e do teste de TUKEY, através do programa estatístico Prism 3.0.

Para o Teste de MN foi empregado o teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros [20] que é um teste de significância alternativo ao de Qui-quadrado (χ^2), na linha do teste exato de Fischer [21] e adequado à avaliação de eventos citogenéticos quando uma grande amostra de células é necessária para detecção da ocorrência de uma determinada alteração citológica.

Para todas as análises o nível de significância considerado foi de 5%.

2.8. Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da UEFS, parecer 940.844 (Anexo II).

3. Resultados

3.1. Ensaio cometa

A Fig.1 apresenta os resultados obtidos na análise dos cometas pós exposição das culturas às três diferentes concentrações do extrato de boldo (1.000 μ g/ml, 500 μ g/ml 250 μ g/ml), controle positivo (peróxido de hidrogênio 1mM) e controle negativo (etanol 40%). Não foi observada diferença estatisticamente significativa na ocorrência de danos ao DNA quando comparadas células das culturas expostas à quaisquer das três concentrações do extrato do boldo em relação ao controle negativo ($p > 0,05$). Não foram observadas também diferenças quando comparados entre si os resultados obtidos nas culturas expostas aos extratos de boldo ($p > 0,05$). A ocorrência de danos ao DNA foi significativamente maior nas culturas expostas ao peróxido de hidrogênio quando feita comparação com os resultados das outras culturas ($p < 0,001$).

Genotoxicidade do Extrato Hidroalcoólico do Boldo

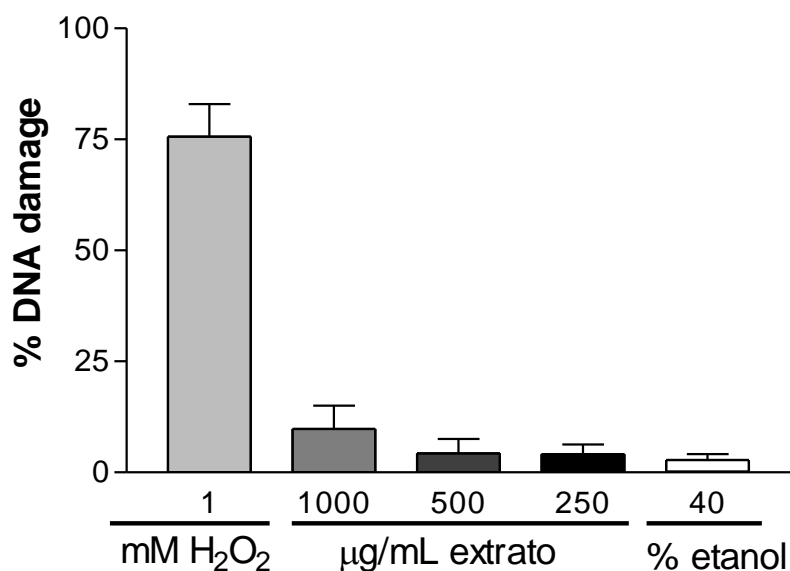


Fig. 1. Genotoxicidade do extrato hidroalcoólico do boldo em porcentagem

3.2. Teste de micronúcleo

A avaliação das diferenças na ocorrência de micronúcleos entre as células das culturas tratadas com os extratos nas três concentrações (1.000µg/ml, 500µg/ml 250µg/ml) e as células dos controles positivo (vincristina) e negativo (etanol 40%), mostrou diferença significativa: $\chi^2 = 99,1495$, G.L. = 4, $p < 0,05$. As partições do qui-quadrado revelam que o número de MN nas células das culturas expostas à vincristina foi significativamente maior que o observado nas células de todas as outras culturas ($p < 0,05$). A comparação entre os resultados obtidos nas culturas tratadas com o etanol a 40% e aqueles observados nas células das culturas tratadas com os extratos nas concentrações de 1.000µg/ml e de 500µg/ml mostrou que a ocorrência de micronúcleos foi significativamente maior nas células tratadas com o extrato nestas concentrações ($p < 0,05$). A ocorrência de micronúcleo não diferiu, entretanto, quando comparadas células tratadas com etanol 40% e células expostas ao extrato na concentração de 250µg/ml ($p > 0,5$). Dados apresentados no quadro 1.

Quadro 1: Dados referentes à ocorrência de micronúcleo

Concentrações (C) e Controles (CP,CN)	MN obs.	MN esp.	Nº cels.	χ^2	Partições do χ^2 G.L.= 1
C 1.000µg/ml (a)	16	19,800000	3000	99,1495 G.L.=4 p<0,05	(a) X (b) 0,5714, p>0,5 (a) X (c) 4,5455, p<0,05 (a) X (d) 26,2987, p<0,05 (a) X (e) 7,200, p<0,05
C 500µg/ml (b)	12	19,800000	3000		(b) X (c) 2,000, p>0,5 (b) X (d) 32,8904, p<0,05
C 250µg/ml (c)	6	19,800000	3000		(b) X (e) 4,000, p<0,05 (c) X (d) 45,1493, p<0,05
CP (d)	61	19,800000	3000		(c) X (e) 0,4000, p>0,5
CN (e)	4	19,800000	3000		(d) X (e) 49,9846, p<0,05

obs= observado, esp= esperado, céls= células

4. Discussão

As vias metabólicas secundárias de vegetais dão origem a diversos compostos a exemplo de alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, culmarinas e terpenos, os quais, por vezes, são específicos de determinadas famílias, gênero ou espécie [22]. As funções de muitos destes compostos frequentemente são desconhecidas mas para diversos deles efeitos genotóxicos ou antígenotóxicos já foram identificados, o que aponta para a importância de estudos objetivando avaliar tais efeitos, principalmente em plantas que são rotineiramente utilizadas com fins terapêuticos [23-30].

Em relação ao boldo (*Plectrants ornatos*), vegetal objeto deste estudo, diversos de seus metabólitos secundários já foram identificados, a exemplo de compostos fenólicos como timol, carvacrol e eugenol [31] e de diterpenóides como abietano, caurano, labdano, clerodano e halimano [32].

Neste estudo, os extratos do boldo, em qualquer das concentrações testadas, não foram efetivos em induzir danos ao DNA traduzidos como cometas. Não há registro na literatura de estudos em que o potencial de extratos do boldo em induzir tais danos foram avaliados pelo ensaio cometa. LLana-Ruiz-Cabello *et al.* [30] empregaram este ensaio em células da linhagem Caco-2 (células de carcinoma de cólon humano) para avaliação do carvacrol e timol. Tal como no presente estudo não foi observada maior ocorrência de danos ao DNA. Resultados semelhantes foram descritos por Rebouças *et al.* [33] ao avaliarem em

células do sangue de camundongos, com o uso também do ensaio cometa, extratos de *Himatanthus articulatus*, vegetal rico em compostos fenólicos, nas concentrações de 500mg/kg, 1.000mg/kg e 2.000mg/kg.

A ação genotóxica do diterpeno caurano (ácido caurenóico) presente no óleo de copaíba (*Copaifera langsdoffi*) foi avaliada por Cavalcante *et al.* [34] em fibroblastos de hamster chinês, através do ensaio cometa. As concentrações testadas foram de 2,5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 30µg/ml e 60µg/ml. Os resultados mostraram que a ocorrência de danos ao DNA induzida pelo caurano nas concentrações de 2,5µg/ml, 5µg/ml, e 10µg/ml não diferiu de modo estatisticamente significativo em comparação ao controle negativo. No entanto, nas concentrações mais elevadas (30µg/ml e 60µg/ml) houve aumento significativo na frequência de tais danos. Estes resultados apontam para a genotoxicidade do caurano de modo dose dependente. Apesar do caurano estar presente na composição do boldo, a comparação destes resultados com os obtidos no presente estudo não pode ser feita dadas as diferenças metodológicas, principalmente no que tange à concentração do caurano nos extratos empregados neste estudo.

O potencial genotóxico dos extratos de boldo, avaliado neste estudo com o uso do teste de micronúcleos em culturas de linfócitos humanos expostas, foi detectado nas duas maiores concentrações testadas (1.000µg/ml e 500µg/ml) evidenciando no número de micronúcleos um gradiente de ocorrência em função da concentração, mas que não foi suficiente para evidenciar estatisticamente diferenças na ocorrência destas estruturas quando comparadas as concentrações de 500µg/ml e 250µg/ml.

Não foi encontrado registro na literatura de estudos em que efeitos genotóxicos de extratos de boldo tenham sido avaliados com o uso do teste de micronúcleos, mas este teste tem sido empregado em outros vegetais utilizados com fins medicinais para avaliação da genotoxicidade de metabólitos que são comuns ao boldo.

Maior ocorrência de micronúcleos em células tratadas com caurano extraído do óleo de copaíba foi descrita por Cavalcante *et al.* [34] em fibroblastos de hamster chinês. Tal efeito foi observado, contudo, apenas nas concentrações mais elevadas: 30 µg/ml e 60 µg/ml. No presente estudo, maior ocorrência de micronúcleos só foi também detectada nas maiores concentrações, mas a comparação dos resultados nele obtidos com os descritos por Cavalcante *et al.* [34], fica impossibilitada dadas as diferenças metodológicas uma vez que estes autores empregaram o caurano isoladamente e neste estudo foi investigado o extrato da planta. Assim, deste estudo, nenhuma inferência sobre um dado composto isoladamente é passível de ser formulada.

Ananthi *et al.* [25], avaliaram a ocorrência de micronúcleos em linfócitos humanos expostos a extratos de *Hemidesmus indicus*, vegetal cuja composição inclui compostos fenólicos, terpenos, alcalóides, flavonóides, culmarinas e taninos. Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, maior ocorrência de micronúcleos não foi descrita por estes autores. Rebouças *et al.* [33] também não observaram maior ocorrência de micronúcleos em células de camundongos expostas a três diferentes concentrações (500mg/kg, 1.000mg/kg e 2.000mg/kg) de extratos de *Himatanthus articulatus*, vegetal, como já comentado, rico em compostos fenólicos. Resultados semelhantes foram descritos por Turkez e Aydin [35] ao investigarem a ocorrência destas estruturas em culturas de linfócitos humanos tratadas com carvacrol em concentrações que variaram de 0mg/l a 200 mg/l.

Hollenbach *et al.* [29] empregaram o teste de micronúcleo em medula óssea de ratos Wistar para avaliarem o potencial genotóxico do óleo essencial de *Origanum vulgare*, cuja composição em carvacrol, timol, gama terpineno e *p*-cimeno é em torno de 80,2% a 98% [36]. Maior ocorrência de micronúcleos em qualquer das concentrações testadas (500mg/kg, 1.000mg/kg e 2.000mg/kg) não foi descrita, o que poderia sugerir a priori que a maior ocorrência destas estruturas, observada no presente estudo, não foi induzida por compostos que o boldo apresenta em comum com este vegetal, a exemplo do carvacrol e do timol. Maisanaba *et al.* [37], no entanto, descreveram maior indução de micronúcleos em células de linfoma de camundongos (L5178Y/TK[±]) tratadas com carvacrol na concentração mais elevada: 700µM. Adicionalmente, Azirak e Rencuzogullari [38] avaliando a genotoxicidade do carvacrol e do timol através do computo de aberrações cromossômicas em células de medula óssea de ratos, descreveram maior ocorrência destas alterações nas células dos animais expostos à todas as concentrações destes metabólitos testadas (10mg/kg, 30mg/kg, 50mg/kg, 70mg/kg e 40mg/kg, 60mg/kg, 80mg/kg, 100mg/kg, respectivamente).

Importante ressaltar a necessidade de realização de outros estudos avaliando este vegetal para que, com segurança, possa ser estabelecida sua genotoxicidade/antigenotoxicidade, haja vista que este foi o primeiro estudo em que estes efeitos foram nele avaliados.

5. Conclusões

Os resultados deste estudo sugerem que, nas condições testadas, compostos do boldo não induzem alterações na molécula de DNA passíveis de serem detectadas pelo ensaio

cometa. Na dependência da concentração, induzem danos cromossômicos traduzidos como micronúcleos.

REFERÊNCIAS

- [1] L.M. Bertini, A.F. Pereira, C.L.L. Oliveira, E.A. Menezes, S.M. Morais, F.A. Cunha, E.S.B. Cavalcanti. Perfil desensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarma*. 17 (2005) 80-83.
- [2] S. Kaur, H. Michael, S. Arora, P.L. Härkönen, S. Kumar. The in vitro cytotoxic and apoptotic activity of Triphala-an Indian herbal drug. *J Ethnopharmacol*. 97 (2005) 15-20.
- [3] N. Mimica-Dukic, B. Bozin, M. Sokovic, N. Simin. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis*. (Lamiaceae) Essential Oil. *J. Agric. Food Chem*. 52 (2004) 2485–2489.
- [4] H.D.M. Coutinho, J.G.M. Costa, E.O. Lima, V.S. Falcão-Silva, J.P. Siqueira-Júnior, Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multi resistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy*. 54 (2008) 328–330.
- [5] R. Harish, T. Shivanandappa. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. *Food Chemistry*. 95 (2006) 180–185.
- [6] M.M. Blanco, C.A.R.A. Costa, A.O. Freire, J.G. Santos jr, M. Costa. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. *Phytomedicine*. 16 (2009) 265–270.
- [7] R.C.P. Marques, S.R.B. Medeiros, C.S. Dias, J.M. Barbosa-Filho, L.F. Agnez-Lima. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. *Mutation Research*. 536 (2003) 117–120.
- [8] M.C.C.D. Costa, S.C. Nascimento. Atividade Citotóxica de *Plectranthus ornatus* Andr. (Lamiaceae). *Acta Farm. Bonaerense*. 22 (2003) 155-158.
- [9] M.I.G. Silva, A.P.S. Gondim, I.F.S. Nunes, F.C.F. Sousa, Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16 (2006) 455-462.
- [10] R.F. Alexandre, F. Bagatini, C.M.O. Simões. Potenciais interações entre fármacos e produtos à base de valeriana ou alho. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18 (2008) 455-463.

- [11] R.A. Santos, T.R. Cabral, I.R. Cabral, L.M.G. Antunes, C.P. Andrade, P.C.S. Cardoso, M.O. Bahia. Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated in vitro. *Biocell*. 32 (2008) 195-200.
- [12] IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, censo demográfico 2010. Disponível em <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=292610&search=||infogr%E1ficos:-informa%E7%F5es-completas.>20/01/2016>
- [13] R.R. Vijayalaxmi, G. Tice, H.S. Strauss. Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutation Research*. 271 (1992) 243-252.
- [14] J. Juchimiuk, A. Gnys e J. Maluszynska. DNA damage induced by mutagens in plant and human cell nuclei in acellular comet assay. *folia Histochemica et Cytobiologica*. 44 (2006) 127-131.
- [15] Y.H. Siddique, G. Ara, T. Beg, M.H. Shahi, M. Afzal. Protective Role of *Ocimum sanctum* Infusion against Norethynodrel-induced Genotoxic Damage in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes, *journal of the Indian Society of Toxicology*. 02 (2006) 10-14.
- [16] J. Gupta, Y. Siddique, G. Ara, T. Beg, M. Afzal. Protective role of tea polyphenol, EGCG, against genotoxic damage induced by anticancer drugs and steroid compounds in cultured human lymphocytes. *The Internet Journal of Nutrition and Wellness*. 7 (2008) 1-8.
- [17] R. C. Silva, Avaliação da Genotoxicidade e Antigenotoxicidade do extrato bruto de *Garcinia angostana* L. (EBGM). (Dissertação). Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular - área de concentração: Biotecnologia, Biocatálise e Genética Toxicológica. (2012). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA.
- [18] M. Fenech. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature*. 2 (2007) 1084-1104.
- [19] F. Sarto, S. Finnoto L. Giacomelli. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis*. 2 (1987) 11-17.
- [20] C.A. Bragança-Pereira. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. *In: M.N, Rabello-Gay, M.A. Rodrigues, L.A.R. Monteleone-Neto. Mutagênese, carcinogênese e teratogênese : Métodos e critérios de avaliação. São Paulo: Sociedade Brasileira de genética* (1991) 113-21.
- [21] J.G. Kalbfleisch. probability and statistical inference. Springer-verlag. New York, (1979) 339.
- [22] N. Mezzoug, A. Elhadri, A. Dallouh, S. Amkiss, N.S. Skali, J. Abrini, A. Zhiri, D. Baudoux, B. Diallo, M. El Jaziri, M. Idaomar. Investigation of the mutagenic and

antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutation Research*. 629 (2007) 100–110.

[23] M.C. Souza, A.C. Siani, M.F. Ramos, O.J.M. Lima, M.G. Henriques. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. *Pharmazie*; 58 (2003) 582-6.

[24] E. Ipek, H. Zeytinoglu, S. Okay, B.A. Tuylu, M. Kurkcuoglu, K.H. Baser. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*. 93 (2005) 551–556.

[25] R. Ananthi, N. Chandra, S.T. Santhiya, A. Ramesh. Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* R. Br. root extract in cultured lymphocytes. *Journal of Ethnopharmacology*. 127 (2010) 558–560.

[26] M.S. Tsuboy, J.C. Marcarini, R.C. Luiz, I.B. Barros, D.T. Ferreira, L.R. Ribeiro, M.S. Mantovani. In Vitro Evaluation of the Genotoxic Activity and Apoptosis Induction of the Extracts of Roots and Leaves from the Medicinal Plant *Coccoloba mollis* (Polygonaceae). *Journal Med Food*. 13 (2010) 503–508.

[27] E.S. Marques, S. Silva, R. Niero, S.F. Andrade, P.C.P. Rosa, F.F. Perazzo, E.L. Maistro. Genotoxicity assessment of *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) extract in mammalian cells in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, 142 (2012) 362–366.

[28] D.C. Gontijo, L.C. Fietto, J.P.V. Leite. Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante e antimutagênica e toxicológica do extrato aquoso das folhas de *Ocimum gratissimum* L. *Rev. Bras. Pl. Med.* 16 (2014) 874-880.

[29] C.B. Hollenbach, M.F. Santos, F.P.S. Mello, L.G. Osório, T.L. Schuch, L.M. Silva, M.R.A. Rodrigues, F.B. Mello, J.R.B. Mello. Avaliação do potencial genotóxico do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em ratos Wistar por meio do teste de micronúcleos. *R. bras. Bioci.* 12 (2014) 66-71.

[30] M. Llana-Ruiz-Cabello, S. Maisanaba, M. Puerto, A.I. Prieto, S. Pichardo, A. Jos, A.M. Cameán. Evaluation of the mutagenicity and genotoxic potential of carvacrol and thymol using the Ames Salmonella test and alkaline, Endo II and FPG-modified comet assays with the human cell line Caco-2. *Food and Chemical Toxicology*. 72 (2014) 122–128.

[31] R.L. Albuquerque, M.G.V. Silva, M.I.L. Machado, F.J.A. Matos, S.M. Morais, J.S. Neto, Chemical composition and antioxidant activity of *Plectranthus grandis* and *P. ornatus* essential oils from north-eastern Brazil. *Flavour Fragr. J.* 22 (2007) 24–26.

- [32] P. Rijo, A.S. Fernandes, F. Simões, L. Pinheiro. Evaluation of diterpenoids from *P. ornatus* as potential COX-1 inhibitor. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 9 (2012) 111-118.
- [33] S.O. Rebouças, J. Silva, R.S. Bertoni, N. Decker, M.S. Santos, R.R. Rossatto, D.S. Corrêa, A.B.F. Ferraz. Assessment of the genotoxic and mutagenic properties of *Himatanthus Articulatus* bark extracts used as phytotherapeutic drug in the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*. 147 (2013) 474–480.
- [34] B.C. Cavalcanti, L.V. Costa-Lotufo, M.O. Moraes, R.R. Burbano, E.R. Silveira, K.M.A. Cunha, V.S.N. Rao, D.J. Moura, R.M. Rosa, J.A.P. Henriques, C. Pessoa. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. *Food and Chemical Toxicology*. 44 (2006) 388–392.
- [35] H. Turkez, E. Aydin. Investigation of cytotoxic, genotoxic and oxidative properties of carvacrol in human blood cells. *Toxicology and Industrial Health*. 16 (2013) 1–9.
- [36] V.A. Bampidis, V. Christodoulou, P. Florou-Paneri, E. Christaki, A.B. Spais, P.S. Chatzopoulou. Effect of dietary dried oregano leaves supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs. *Animal Feed Science and Technology*. 121 (2005) 285–295.
- [37] S. Maisanaba, A.I. Prieto, M. Puerto, D. Gutiérrez-Praena, R. Marcos, A.M. Cameán. In vitro genotoxicity testing of carvacrol and thymol using the micronucleus and mouse lymphoma assays. *Mutation Research*. 78 (2015) 37–44.
- [38] S. Azirak, E. Rencuzogullari. The In Vivo Genotoxic Effects of Carvacrol and Thymol in Rat Bone Marrow Cells. *Environmental Toxicology*. 23 (2008) 728-735.

CAPÍTULO 2

Avaliação da genotoxicidade do extrato da graviola (*Annona muricata*) através do Ensaio Cometa em linfócitos humanos²

RESUMO

Annona muricata, popularmente conhecida como graviola, é uma planta largamente empregada no tratamento de diversos males como: insônia, cistite, problemas de fígado, diabetes, hipertensão e reconhecida como apresentando efeitos antiinflamatório, antiespasmódico e antirreumático. Alguns de seus componentes (acetogeninas) são considerados alternativas para o desenvolvimento de drogas antitumorais, o que faz supor que possam apresentar genotoxicidade. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos de extratos da graviola (*Annona muricata*), através do ensaio cometa. Os testes foram feitos em culturas de linfócitos humanos expostas aos extratos em três concentrações: 1.000µg/ml, 500µg/ml e 250µg/ml. Peróxido de hidrogênio (1mM) foi utilizado como controle positivo e como controle negativo foi usado o etanol 40%. O processamento do material para o ensaio cometa foi feito de acordo, com o protocolo de Tice *et al.* (2000). O ensaio cometa foi realizado em cinco repetições sendo computados, em cada uma delas, 100 cometas em um total de duas lâminas. A ocorrência de danos ao DNA nas culturas expostas aos extratos nas concentrações de 1.000µg/ml e 500µg/ml foi significativamente maior do que o observado no controle negativo e nas culturas tratadas com o extrato na concentração de 250µg/ml ($p < 0,001$). Nas condições em que este estudo foi realizado, os resultados obtidos permitem concluir que os extratos da graviola induzem danos ao DNA sob determinadas concentrações. Os resultados deste estudo suscitam fortemente a realização de outros abordando o tema, para que o real potencial genotóxico do vegetal aqui analisado possa ser estabelecido.

Palavras-chave: Graviola, *Annona muricata*, ensaio cometa, genotoxicidade.

2 Artigo formatado de acordo com as instruções para autores do periódico Mutagenesis (anexo III)

ABSTRACT

Genotoxicity assessment of graviola extract (*Annona muricata*) through the comet assay in human lymphocytes

Annona muricata, popularly known as soursop, is a plant widely used in the treatment of various ailments such as insomnia, cystitis, liver problems, diabetes, hypertension and recognized as having anti-inflammatory effects, antispasmodic and antirheumatic. Some of its components (acetogenins) are considered alternatives for the development of anti-tumor drugs, which suggests that they can present genotoxicity. In this context, the aim of this study was to evaluate the genotoxic effects of extracts of soursop (*Annona muricata*), through the comet assay. The tests were performed on human lymphocyte cultures exposed to the extracts in three concentrations: 1,000 μ g/ml, 500 μ g/ml and 250 μ g/ml. Hydrogen peroxide (1mM) was used as positive control and as a negative control was used 40% ethanol. The comet assay was performed in five repetitions being computed, on each of them, 100 comets on a total of two slides. The occurrence of damage in the DNA in the cultures exposed to the extracts at concentrations of 1,000 μ g/ml to 500 μ g/ml was significantly higher than that observed in the negative control and in the treated cultures with the extract at a concentration of 250 μ g/ml ($p < 0.001$). The conditions in which this study was performed, the results showed that the extracts of soursop induce DNA damage under certain concentrations. The results of this study strongly raise the achievement of others addressing the issue, so that the actual genotoxic potential of the vegetable analyzed here can be established.

Keywords: soursop, *Annona muricata*, comet assay, genotoxicity.

Introdução

O uso de vegetais com fins medicinais contribui de forma significativa para o cuidado das necessidades primárias de assistência à saúde devido ao difícil acesso da população à assistência médica e farmacêutica, aos altos custos dos medicamentos industrializados e à uma tendência das pessoas a utilizarem produtos de origem natural (1,2). Neste contexto, de forma equivocada, muitas pessoas utilizam plantas com propriedades medicinais indiscriminadamente por acreditarem que, por serem, “produtos naturais” não possuem efeitos adversos (3).

Não existem, contudo, informações científicas suficientes em relação à maioria dos vegetais utilizados com fins terapêuticos para que possa ser garantida a segurança de seu uso. Como qualquer medicamento, há que haver critério para indicação e conhecimento sobre o modo como atuam, visto que vegetais podem apresentar efeitos adversos per se ou por interagirem com fármacos naturais, ou não, de efeitos similares tendo, assim, potencializada sua ação (4).

De particular importância, é o conhecimento sobre os efeitos genotóxicos advindos da utilização de plantas com fins terapêuticos, haja vista a relação íntima entre mutagenicidade e carcinogenicidade (5). Entre os muitos testes que detectam efeitos mutagênicos, inclui-se o ensaio cometa, efetivo em detectar diretamente danos na molécula do DNA.

No presente estudo, este teste foi utilizado para avaliar o potencial genotóxico de extratos da graviola (*Annona muricata*), vegetal reconhecido como apresentando efeitos antiinflamatório, antiespasmódico e antirreumático e empregado para o tratamento da insônia, cistite, problemas de fígado, diabetes, hipertensão (6).

Diversos dos componentes químicos da *Annona muricata*, já foram identificados incluindo-se entre eles compostos fenólicos, alcaloides, flavonoides, terpenos e acetogeninas. Vale destacar que as acetogeninas, compostos orgânicos derivados de ácidos graxos de cadeia longa encontrados exclusivamente nas Annonaceae, são consideradas importantes alternativas para o desenvolvimento de drogas antitumorais (7). Não existe, entretanto, registro na literatura de estudos em que o potencial genotóxico deste vegetal tenha sido avaliado.

Materiais e Métodos

Coleta e identificação do material vegetal

As folhas, flores e frutos da Graviola (*Annona Muricata*) foram coletados com o uso de tesoura de poda em um mesmo dia, por volta das 7h da manhã, em quintal de residência localizada na cidade de Retirolândia (nordeste da Bahia). Esta cidade está situada a 293 metros de altitude, Latitude: 11° 28' 46" Sul, Longitude: 39° 24' 58" Oeste, e, segundo censo do IBGE de 2010 (8), tinha à época 12.055 habitantes. A área da cidade onde a residência está localizada é uma área exclusivamente residencial, livre de tráfego de veículos ou fumaça de fábricas. Segundo informações da proprietária, ao solo onde a planta é cultivada não são adicionados aditivos químico e sua rega é feita com água encanada fornecida pela Empresa Baiana de Águas e Saneamento (EMBASA).

Para confecção das exsiccatas (duas), feitas no local da coleta, além das folhas foram incluídos os frutos e as flores. Este material foi encaminhado para o Herbário da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (HURB), sendo a identificação feita por um botânico (Registro HURB 11210).

Foram coletadas cerca de 500 folhas que foram acondicionadas em sacos de papel madeira para transporte até o Laboratório de Extração de Produtos Vegetais (LAEX), localizado no Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), onde este material foi processado para obtenção do extrato.

Preparação do extrato

As folhas coletadas foram postas para secar durante 14 dias em estufa a 60°C e em seguida foram pulverizadas em moinho de facas obtendo-se, assim, 873g de matéria seca. Para obtenção do extrato por maceração, matéria seca obtida foi colocada em erlenmeyer contendo três litros de álcool a 70%. Este procedimento foi repetido por mais três vezes, o que demandou 20 dias. O extrato obtido foi então filtrado a vácuo com papel filtro e concentrado em rota-evaporação com pressão negativa (730mmHg) a 60°C, acondicionado em 3 bekers que foram colocados em estufa a 60°C por três dias para atingir peso constante. Uma vez atingido o peso constante, o material foi mantido em geladeira (4°C) até ser transportado, acondicionado em isopor com gelo, para o Laboratório de Bioquímica e Imunologia Veterinária da UFRB, onde foi feito inicialmente o congelamento em ultra freezer à -80°C

para que pudesse ser feita no liofilizador a retirada da água. Após 24h, foi então obtido o extrato em pó. Por fim, este material foi armazenado em frascos estéreis em freezer à -4°C.

Testes de solubilidade

Foram testados três veículos para avaliar a solubilidade do extrato: dimetilsulfóxido (DMSO), etanol 40% e água destilada (0,1g do extrato para 1ml do veículo). A melhor dissolução do extrato foi obtida com etanol a 40%, sendo este o veículo utilizado para diluir o extrato (solução estoque de 25.000µg/ml).

Determinação das concentrações

As concentrações do extrato da graviola usadas no experimento, foram previamente determinadas a partir do teste de viabilidade celular de exclusão com azul de Tripan, em sangue total com os extratos nas seguintes concentrações: 2.000µg/ml, 1.000µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml, 100µg/ml, 50µg/ml. Para cada uma delas foram usados 200µl de sangue total em 3ml de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal estéril e exposto por períodos de 1h, 2h, 4h e 8h em estufa de crescimento celular a 37°C e com 5% de CO₂, após o que 20µL da suspensão celular e 20µL de azul de Tripan (0,4%) foram colocados e homogeneizados em eppendorf esterilizado. Após a homogeneização, foram colocados 20µL desta solução em Câmara de Neubauer para determinar a porcentagem de células viáveis. Para todas as concentrações testadas a viabilidade celular foi acima de 90%, sendo escolhidas para avaliação, de danos ao DNA (ensaio cometa) as concentrações de 1.000µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml, obtidas a partir de uma solução estoque refrigerada contida em tubo Falcon (5ml, na concentração de 25.000µg/ml).

Ensaio cometa

Coleta do material

Foram feitas cinco coletas de sangue de um só doador voluntário (3ml por coleta), por um profissional capacitado, com intervalos de uma semana. A escolha de um só doador foi fundamentada nos estudos de Vijayalaxmi, Tice e Strauss (9), Juchimiuk, Gnys e Maluszynska (10), Siddique *et al.* (11), Gupta *et al.* (12) e Silva (13).

O sangue coletado foi centrifugado para separação dos leucócitos por dez minutos a 2.500 rpm. O anel de leucócitos, pequena quantidade de plasma e soro (aproximadamente 500µl) foram então transferidos para eppendorf e homogeneizados.

Preparação das culturas de linfócitos

Para avaliação da atividade genotóxica, 40µl, 20µl e 10µl da solução estoque do extrato, foram adicionados separadamente à 1ml do meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino correspondendo, respectivamente, às concentrações de 1.000µg/ml, 500µg/ml e 250µg/ml. Estas soluções foram separadamente adicionadas à placas de culturas contendo 20µl do material obtido do sangue, após centrifugação e homogeneização. Como controle positivo foi usado o peróxido de hidrogênio (1mM) e como controle negativo etanol 40%. Para cada um dos tratamentos, o tempo de exposição foi de 2h.

Confecção das lâminas

Findo o período de exposição, as culturas foram transferidas para eppendorf onde foram centrifugadas a 1.000 rpm durante 5'. O sobrenadante foi desprezado e o material celular restante foi então misturado com agarose de baixo ponto de fusão, rapidamente colocado sobre lâmina de microscópio com pré-cobertura de agarose com ponto de fusão normal. Para que o material se espalhasse uniformemente foi colocada lamínula e para facilitar sua retirada a lâmina ficou por 5min em geladeira. Retiradas as lamínulas, as lâminas foram imersas em cubetas contendo solução de lise (NaCl 2,5M, Tris 10mM e EDTA 100mM) e mantidas em geladeira por 24h.

Eletroforese em gel de agarose

Posteriormente em uma cuba de eletroforese previamente envolvida em cubos de gelo, as lâminas foram cobertas por solução tampão (NaOH 300mM, EDTA 100mM), protegidas da luz e submetidas a uma corrente elétrica (25v; 300mA) durante 20 minutos para que ocorresse a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo.

Coloração das lâminas

Ao final da eletroforese, as lâminas foram lavadas por três vezes com solução neutralizadora (Tris 10mM e HCl 40mM) e em seguida com água destilada. Após secarem, as lâminas foram fixadas com solução de fixação (CCl₃COOH, ZnSO₄ e C₃H₈O₃) durante 10 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. Após 24h foram coradas com solução de nitrato de prata (0,1%) durante um período de 30 minutos, ao final do qual foram lavadas

três vezes com água destilada e imersas em solução de ácido acético a 1% por cinco minutos, sendo então novamente, por três vezes, lavadas com água destilada.

Para cada uma das concentrações testadas, controles positivo e negativo foram feitas duas lâminas das culturas e cada um dos experimentos foram realizados em cinco repetições sendo considerado para análise estatística a média dos resultados obtidos nestes cinco experimentos.

Análise do ensaio cometa

A identificação dos danos ao DNA foi realizada sob microscopia óptica com aumento de 400X, levando em consideração o padrão de escores determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa, sendo computados 100 cometas (50 em cada uma das duas lâminas feitas), os quais foram classificados visualmente em cinco categorias que representam o grau do dano sofrido pelas células: 0 = sem dano, 1- baixo nível de dano, 2- médio nível de dano, 3- alto nível de dano e 4- dano total.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos para o ensaio cometa foi feita com o uso da ANOVA e do teste de TUKEY, através do programa estatístico Prism 3.0.

Para todas as análises o nível de significância considerado foi de 5%.

Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da UEFS, parecer 940.844 (Anexo II).

Resultados

A Figura 1 apresenta graficamente os resultados obtidos na análise dos cometas pós exposição das culturas às três diferentes concentrações do extrato da graviola (1.000µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml), controle positivo (peróxido de hidrogênio 1mM) e controle negativo (etanol 40%). Foi observada diferença estatisticamente significativa na ocorrência de danos ao DNA quando comparadas células das culturas expostas às concentrações de 1.000µg/ml e 500µg/ml do extrato da graviola em relação ao controle negativo ($p < 0,001$). Não foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparadas células das culturas

expostas à concentração de 250µg/ml do extrato em relação ao controle negativo ($p>0,05$). Quando comparados entre si os resultados obtidos nos tratamentos com os extratos, foram detectadas diferenças entre os danos observados nas células das culturas expostas ao extrato na concentração de 1.000µg/ml, quando comparados aos resultados obtidos nas células das culturas expostas às outras duas concentrações ($p<0,001$). Foi também observada diferença significativa quando comparados os resultados obtidos nas culturas expostas ao extrato na concentração de 500µg/ml em relação às expostas ao extrato com concentração de 250µg/ml ($p<0,01$). Não foi observada diferença significativa na ocorrência de danos ao DNA quando comparadas células das culturas expostas ao peróxido de hidrogênio com aquelas expostas ao extrato na concentração de 1.000µg/ml ($p>0,05$). No entanto, ao comparar as células das culturas expostas ao peróxido de hidrogênio com aquelas expostas às outras duas concentrações do extrato (500µg/ml e 250µg/ml), a ocorrência de danos foi significativamente maior nas culturas expostas ao peróxido de hidrogênio ($p<0,001$).

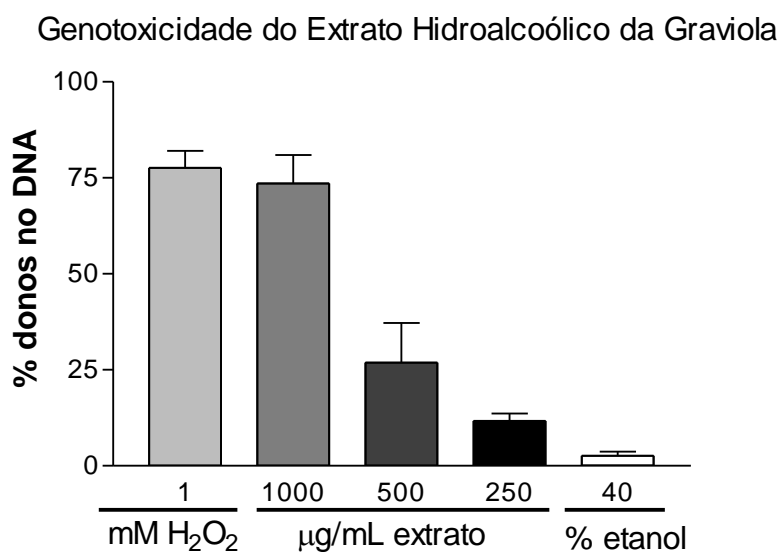


Figura 1. Genotoxicidade das concentrações do extrato da graviola em porcentagem

Discussão

Dentre os muitos vegetais que são utilizados na medicina tradicional, a família Annonaceae se destaca pelo largo uso, que abrange o tratamento de diversas enfermidades (14). A Annonaceae constitui uma família de árvores e arbustos com frutos comestíveis e aromáticos, incluindo 120 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies. Entre os muitos gêneros desta família, *Annona* se constitui como um dos mais importantes e tem mais de 120 espécies (15). Neste gênero destaca-se, pelo largo uso com fins medicinais, a espécie *Annona muricata* (6), vegetal que foi o objeto de estudo deste trabalho.

Análises fitoquímicas de plantas da família Annonaceae revelam a presença de terpenos, flavonóides, alcalóides, compostos fenólicos e acetogeninas (16). As acetogeninas, segundo Brito *et al.* (7), caracterizam-se por serem metabólitos secundários, derivados de ácidos graxos de cadeia longa, exclusivos das Annonaceae, e têm despertado o interesse de pesquisadores de todo o mundo por serem consideradas importantes alternativas para o desenvolvimento de drogas antitumorais (7).

Neste contexto, é de particular importância a avaliação dos efeitos genotóxicos de drogas anti-câncer sobre células não-tumorais, dada a possibilidade de que elas induzam tumores secundários em indivíduos com câncer (17) ou que induzam tumores primários em indivíduos sem a doença. Assim, poderiam estar sob risco de desenvolvimento de câncer indivíduos que fazem uso de plantas, com metabólitos secundários apresentando tais efeitos, para tratamento de outras enfermidades.

No presente estudo, os extratos da *Annona muricata* foram efetivos na indução de danos ao DNA traduzidos como cometa nas duas maiores concentrações testadas (1.000µg/ml e 500µg/ml). Não foi encontrado registro na literatura de estudos em que o potencial genotóxico de extratos desta espécie tenha sido avaliado pelo ensaio cometa, de modo que a comparação dos resultados aqui descritos só pode ser feita com base em resultados obtidos em outros estudos realizados com metodologias diferentes ou com espécies do mesmo gênero. Grover *et al.* (18), com o uso deste mesmo teste, descreveram genotoxicidade de extratos oriundos das sementes de *Annona squamosa* nas duas maiores concentrações de três que foram testadas (75mg/kg, 150mg/kg e 300mg/kg).

A ocorrência de danos cromossômicos induzidos por plantas do gênero *Annona* também tem sido relatada (14,18,20). Fagundes *et al.* (14) investigaram, com o uso do teste de

micronúcleo em células da medula óssea de camundongos, o potencial de extratos de *Annona coriacea* vegetal que segundo Silva *et al.* (19) tem como principais metabólitos, as acetogeninas em induzir tais danos. Maior ocorrência de micronúcleos foi descrita para todas as concentrações testadas (50mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg e 400mg/kg). Grover *et al.* (18), avaliando a genotoxicidade de extratos de *Annona squamosa*, com o uso deste teste, descreveram maior ocorrência de micronúcleos apenas nas maiores concentrações testadas (150mg/kg e 300mg/kg). García-Aguirre *et al.* (20), utilizando a mesma metodologia, relataram maior ocorrência de micronúcleos em camundongos expostos à três acetogeninas isoméricas extraídas da semente de *Annona cherimola*. Segundo estes autores, o efeito genotóxico observado pode estar relacionado com a ação das acetogeninas no complexo I do transporte de elétron inibindo a passagem deste na mitocôndria, podendo dar origem a radicais livres afetando assim a molécula de DNA. Estes autores fazem tal suposição com base em que extratos de *Annona squamosa* foram mostrados serem efetivos em aumentar o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) e por reduzir a quantidade de glutathione (antioxidante) (21).

Considerando que as acetogeninas são metabólitos exclusivos da família Annonaceae e comuns à todos esses gêneros, esses resultados tal como os aqui descritos permitem levantar a hipótese de que as acetogeninas, por suas propriedades antitumorais, poderiam estar relacionadas com a genotoxicidade observada. No entanto, em alguns estudos, nenhuma genotoxicidade foi detectada e efeitos antígenotóxicos destes metabólitos foram descritos (22-24).

Vilar *et al.* (22) avaliaram a ação mutagênica e antimutagênica do extrato de araticum (*Annona crassiflora* Mart.), vegetal rico em metabólitos como os flavonóides e acetogeninas, através do teste de micronúcleos em eritrócitos de camundongos. Em todas as doses testadas (10mg/kg, 20mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg e 160mg/kg) não houve aumento significativo na ocorrência de micronúcleos. No que diz respeito à antimutagenicidade, exceto na menor dose testada, todas as outras reduziram significativamente a frequência de danos pós-exposição dos animais à mitomicina C. Estes resultados, portanto, indicam uma possível ação protetora do extrato de araticum frente ao DNA, atribuída segundo os autores à presença dos flavonóides que poderiam atuar como agentes antioxidantes promovendo a captura de radicais livres.

Estes resultados permitem supor que a capacidade em capturar radicais livres pelos flavonoides (22,23), se sobreponha ao potencial das acetogeninas em gerar estes radicais (20) anulando, assim, possíveis efeitos genotóxicos que seriam induzidos por estes metabólitos e exercendo ainda efeito protetor. Como já comentado, contudo, a genotoxicidade dos vegetais

que contém as acetogeninas não é ainda fato estabelecido, com alguns estudos apontando para este efeito (14,18,20) e outros sugerindo efeito protetor (22-24).

Efeitos mutagênicos de extratos obtidos de outros vegetais do gênero *Annona* também não foram observados, a exemplo da *Annona nutans*, vegetal rico em flavonoides, derivados fenólicos e acetogeninas (25), *Annona cherimola* e *Annona aquamata* (26).

Além deste estudo, apenas Garcia e Nepomuceno (23), empregando o teste SMART em *Drosophila melanogaster*, avaliaram a genotoxicidade de extratos obtidos do fruto de *Annona muricata*. Efeitos genotóxicos não foram descritos e a avaliação da ação antigenotóxica revelou efeito protetor.

Os resultados deste estudo, primeiro a avaliar através do ensaio cometa a genotoxicidade da *Annona muricata*, suscitam fortemente a realização de outros abordando o tema, considerando: a) o largo uso deste vegetal no tratamento de diversas doenças; b) os resultados conflitantes a respeito da ação das acetogeninas; c) a escassez de estudos por qualquer outra metodologia avaliando a mutagenicidade/antimutagenicidade deste vegetal; d) a necessidade de identificar o real potencial genotóxico/antigenotóxico de seus principais metabólitos secundários isoladamente.

Conclusão geral

Nas condições testadas, os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que extratos de *Annona muricata*, na dependência da concentração, induzem alterações na molécula de DNA passíveis de serem detectadas pelo ensaio cometa.

REFERÊNCIAS:

1. Silva, M.I.G., Gondim, A.P.S., Nunes, I.F.S., Sousa, F.C.F. (2006) Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Revista Brasileira de Farmacognosia.*, **16**, 455-462.
2. Alexandre, R.F., Bagatini, F., Simões, C.M.O. (2008) Potenciais interações entre fármacos e produtos à base de valeriana ou alho. *Revista Brasileira de Farmacognosia.*, **18**, 455-463.
3. Pinho, D.S., Sturbelle, R.T., Martino-Roth, M.G., Garcias, G.L. (2010) Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e

teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy., **20**, 165-170.

4. Arnous, A.H., Santos A.S., Beinner, R.P.C. (2005) Plantas medicinais de uso caseiro-conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. Revista Espaço para a Saúde., **6**, 1-6.

5. Peron, A.P., Felipes, J., Mattge, G.I., Cantagalli, L.B., Mariucci, R.G., Vicentini, V.E.P. (2008) Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. Revista Brasileira de Biociências., **6**, 127-130.

6. Sousa, O.V., Vieira, G.D., Pinho J.J.R.G., Yamamoto, C.H., Alves M.S. (2010) Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract of *Annona muricata* L. Leaves in Animal Models. Int. J. Mol. Sci., **11**, 2067-2078.

7. Brito, H.O., Noronha, E.P., Martins, L.M. (2008) Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa* (ATA). Rev. Bras. Farm., **89**, 180-184.

8. IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, censo demográfico 2010. Disponível em:[http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=292610&search=||infogr % E1ficos:-informa%E7%F5es-completas](http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=292610&search=||infogr%20E1ficos:-informa%E7%F5es-completas).

9. Vijayalaxmi, R.R., Tice, G., Strauss, H.S. (1992) Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. Mutation Research. **271**, 243-252.

10. Juchimiuk, J., Gnys, A., Maluszynska, J. (2006) DNA damage induced by mutagens in plant and human cell nuclei in acellular comet assay. Folia Histochemica et Cytobiologica., **44** 127-131.

11. Siddique, Y.H., Ara, G., Beg, T., Shahi, M.H., Afzal. M. (2014) Protective Role of *Ocimum sanctum* Infusion against Norethynodrel-induced Genotoxic Damage in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes, journal of the Indian Society of Toxicology., **02**, 10-14.

12. Gupta, J., Siddique, Y., Ara, G., Beg, T., Afzal. M. (2008) Protective role of tea polyphenol, EGCG, against genotoxic damage induced by anticancer drugs and steroid compounds in cultured human lymphocytes. The Internet Journal of Nutrition and Wellness., **7**, 1-8.

13. Silva, R.C. (2012) Avaliação da Genotoxicidade e Antigenotoxicidade do extrato bruto de *Garcinia angostana* L. (EBGM). (Dissertação). Programa de pós-graduação em Genética e

Biologia Molecular - área de concentração: Biotecnologia, Biocatálise e Genética Toxicológica. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA.

14. Fagundes, F.A., Oliveira, L.B., Cunha, L.C., Valadares, M.C. (2005) *Annona coriácea* induz efeito genotóxico em camundongos. *Revista Eletrônica de Farmácia.*, **2**, 24-29.
15. Leboeuf, M., Cave, A., Bhaumik, P.K., Mukherjee, B., Mukherjee, R. (1982) The phytochemistry of the annonaceae. *Phytochemistry.*, **21**, 2783-2813.
16. Yuan, S.S.F. (2003) Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. Elsevier Science Inc.
17. Cavalcanti, B.C., Ferreira, J.R.O., Moura, D.J., Rosa, R.M., Furtado, G.V., Burbano, R.R., Silveira, E.R., Lima, M.A.S., Camara, C.A.G., Saffi, J., Henriques, J.A.P., Rao, V.S.N., Costa-Lotufo, L.V., Moraes, M.O., Pessoa, C. (2010) Structure–mutagenicity relationship of kaurenoic acid from *Xylopiá sericeae* (Annonaceae). *Mutation Research.*, **701**, 153–163.
18. Grover, P., Singh, S.P., Prabhakar, P., Utkarsh, V., Reddy, A., Balasubramanyam, A., Mahboob, M., Rahman, M.F., Misra, S. (2009) In vivo assessment of genotoxic effects of *Annona squamosa* seed extract in rats. *Food and Chemical Toxicology.*, **47**, 1964–1971.
19. Silva, E.L.M., Roblot, F., Mahuteau, J., Cave, A. (1996) Coriadienin, the First Annonaceous Acetogenin with Two Double Bonds Isolated from *Annona coriácea*. *J. Nat. Prod.*, **59**, 528-530.
20. García-Aguirre, K.K., Zepeda-Vallejo, L.G., Ramón-Gallegos, E., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E. (2008) Genotoxic and Cytotoxic Effects Produced by Acetogenins Obtained from *Annona cherimolia* MILL. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 2346—2349.
21. Pardhasaradhi, B.V.V. Reddy, M. ALI, A. M. Kumary A. L. Khar A. (2005) Differential cytotoxic effects of *Annona squamosa* seed extracts on human tumour cell lines: Role of reactive oxygen species and glutathione. *J. Biosci.* **30**, 237–244.
22. Vilar, J.B., Ferreira, F.L, Ferri, P.H, Guillo, L.A., Chen, C.L.(2008) Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. *Braz. J. Biol.*, **68**, 141-147.
23. Garcia, T.A., Nepomuceno, J.C. (2011) Atividade antigenotóxica da polpa da graviola (*annona muricata*), avaliada por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster*. *Perquirere UNIPAM.*, **8**, 70-80.
24. Chen, Y., Xu, S., Chen, J., Wang, Y., Xu, H., Fan, N., Lin, X. (2012) Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seeds extract containing annonaceous acetogenin compounds. *Journal of Ethnopharmacology.*, **142**, 462–466.

25. Gonçalves, C.A., Silva, N.L., Mauro, M.O., David, N., Cunha-Laura, A.L., Auharek, S.A., Monreal, A.C.D., Vieira, M.C., Silva, D.B., Santos, F.J.L., Siqueira, J.M., Oliveira, R.J. (2014) Evaluation of mutagenic, teratogenic, and immunomodulatory effects of *Annona nutans* hydromethanolic fraction on pregnant mice. *Genetics and Molecular Research.*, **13**, 4392-4405.
26. Guidoti, D.T., Guidoti, D.G.G., Berti, A.P., Düsman, E., Vicentini V.E.P. (2014) Potencial mutagênico do chá de folhas e do suco de atemóia (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.) em células hematopoiéticas de ratos Wistar. *R. bras. Bioci.*, **12**, 52-55.

REFERÊNCIAS:

ALEXANDRE, R.F; BAGATINI, F; SIMÕES, C.M.O. Potenciais interações entre fármacos e produtos à base de valeriana ou alho. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 455-463, 2008.

ALBUQUERQUE, R.L; SILVA, M.G.V; MACHADO, M.I.L; MATOS, F.J.A; MORAIS, S.M; NETO, J.S; Chemical composition and antioxidant activity of *Plectranthus grandis* and *P. ornatus* essential oils from north-eastern Brazil. **Flavour Fragr. J.** v.22, p.24–26, 2007.

ANANTHI, R; CHANDRA, N; SANTHIYA, S.T; RAMESH, A. Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* R. Br. root extract in cultured lymphocytes. **Journal of Ethnopharmacology**. v.127 p.558–560, 2010.

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO-RDC Nº. 48, DE 16 DE MARÇO DE 2004. Disponível em < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc_48_16_03_04_registro_fitoterapicos%20.pdf> Acesso em 24/01/2012.

ARNOUS, A.H; SANTOS A.S; BEINNER, R.P.C. Plantas medicinais de uso caseiro-conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**. v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.

ARORA, S; BRITS, E; KAUR, S; KAUR, K; SOHI, R.S; KUMAR, S; VERSCHAEVE L. Evaluation of Genotoxicity of Medicinal Plant Extracts by the Comet and VITOTOX Tests. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.24, p.193–200, 2005.

AZIRAK, S. RENCUZOGULLARI, E. The In Vivo Genotoxic Effects of Carvacrol and Thymol in Rat Bone Marrow Cells. **Environmental Toxicology** p.728-735, 2008.

BAMPIDIS, V.A; CHRISTODOULOU, V; FLOROU-PANERI, P; CHRISTAKI, E; SPAIS, A.B; CHATZOPOULOU P.S. Effect of dietary dried oregano leaves supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs. **Animal Feed Science and Technology**. V.121 p.285–295 2005.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarma*17: 80-83. 2005.

BLANCO, M.M; COSTA, C.A.R.A; FREIRE, A.O; SANTOS JR, J.G; COSTA. M. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine**. v.16 p.265–270, 2009

BRAGANÇA-PEREIRA, C.A. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. *In*: RABELLO-GAY, M.N, RODRIGUES, M.A. LA. R., MONTELEONE NETO, R. Mutagênese, carcinogênese e teratogênese : Métodos e critérios de avaliação. São Paulo: **Sociedade Brasileira de genética**, p.113-21, 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde)

BRITO, H.O.; NORONHA, E.P.; MARTINS, L.M. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa* (ATA). *Rev. Bras. Farm.*, v. 89, n. 3, p. 180-184, 2008.

BORBA, A.M; MACEDO, M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. **Acta bot. bras.** v. 20, P. 771-782, 2006.

CARDOSO, C.R.P; CÓLUS, I.M.S; BERNARDI, C.C; SANNOMIYA, M; VILEGAS, W; VARANDA, E.A. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Toxicology.** v. 225 p. 55–63, 2006.

CAVALCANTI, B.C; COSTA-LOTUFO, L.V; MORAES, M.O; BURBANO, R.R; SILVEIRA E.R; CUNHA, K.M.A; RAO, V.S.N; MOURA, D.J; ROSA, R.M; HENRIQUES, J.A.P; PESSOA C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology,** v.44 p.388–392, 2006.

CAVALCANTI, B.C; FERREIRA, J.R.O; MOURA, D.J; ROSA, R.M; FURTADO, G.V; BURBANO, R.R; SILVEIRA, E.R; LIMA, M.A.S; CAMARA, C.A.G; SAFFI, J; HENRIQUES, J.A.P; RAO, V.S.N; COSTA-LOTUFO, L.V; MORAES, M.O; PESSOA. C. Structure–mutagenicity relationship of kaurenoic acid from *Xylopia sericeae* (Annonaceae). **Mutation Research,** v.701,p.153–163, 2010.

CHEN, Y; XU, S; CHEN, J; WANG, Y; XU, H; FAN, N; LIN. X. Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seeds extract containing annonaceous acetogenin compounds. **Journal of Ethnopharmacology,** v.142, p.462–466, 2012

CLINGEN, P.H; LOWE, J.E; GREEN, M.H.L. Measurement of DNA damage and repair capacity as a function of age using the comet assay. In: Barnett, Y.A. and Barnett, C.R. (eds), *Aging methods and protocols* (Totowa: Humana Press), p.143-157, 2000

COLLINS A.R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair Principles, Applications, and Limitations. **Molecular Biotechnology** v.26, p.249–261, 2004.

COLLINS, A; DUSINSKA, M; FRANKLIN, M; SOMOROVSKA, M; PETROVSKA, H; DUTHIE, S; FILLION, L; PANAYIOTIDIS, M; RASLOVA, K; VAUGHAN, N. Comet Assay in Human Biomonitoring Studies: Reliability, Validation, and Applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis.** v.30, p.139–146, 1997.

CORDELL, G.A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry** v. 40 p. 1585–1612, 1995.

COSTA, M.C.C.D; NASCIMENTO, S.C. Atividade Citotóxica de *Plectranthus ornatus* Andr. (Lamiaceae). **Acta Farm. Bonaerense**. V. 22 p. 155-158, 2003.

COUTINHO, H.D.M; COSTA, J.G.M; LIMA, E.O; FALCÃO-SILVA, V.S; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multi resistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**. v.54 p.328–330, 2008.

DÉCIGA-CAMPOS, M; RIVERO-CRUZ, I; ARRIAGA-ALBA, M; CASTANEDA-CORRAL, G; ANGELES-LÓPEZ, G.E; NAVARRETE, A; MATA, R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 110 p. 334–342, 2007.

DHAWAN, A; BAJPAYEE, M; PARMAR. D. Comet assay; a reliable tool for the assessment of DNA damage in diferente models, **Cell Biol. Toxicol.** v.25 p.5-32, 2009.

FAGUNDES, F.A; OLIVEIRA, L.B; CUNHA, L.C; VALADARES, M.C. *Annona coriácea* induz efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2 (1), p. 24-29, 2005.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay. **Nature**, v.2, p.1084-1104, 2007.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; MORLEY, A. Solution to the kinetic problem in the micronucleus test. **Cytobios**, v. 43, p. 233-246, 1985.

FIGUEIREDO, F. R. G. Ensaio mutagênicos em decocto de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger (Bixaceae) em *Poecilia reticulata* e linfócitos humanos. Dissertação

Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia, 2012.

GADANO, A; GURNI, A; LÓPEZ, P; FERRARO, G; CARBALLO, M. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 81 p. 11-16, 2002.

GARCÍA-AGUIRRE, K.K; ZEPEDA-VALLEJO, L.G; RAMÓN-GALLEGOS, E; ALVÁREZ-GONZÁLEZ, I; MADRIGAL-BUJADAR, E. Genotoxic and Cytotoxic Effects Produced by Acetogenins Obtained from *Annona cherimolia* MILL. **Biol. Pharm. Bull.** v.31(12), p. 2346—2349, 2008.

GARCIA, T.A; NEPOMUCENO. J.C. Atividade antígeno-tóxica da polpa da graviola (*annona muricata*), avaliada por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster*. *Perquirere UNIPAM*, v.8(2), p.70-80, 2011.

GARCIA, C.M; ZANETTI, G.D; ZAGO, A.M; BITTENCOURT, C.F; HEINZMANN, B.M. Estudo Morfo-Anatômico de *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus tenellus* Roxb. **Acta Farm. Bonaerense**. v. 23 p. 67-70, 2004.

GEURTS, F. Annonaceous Fruits. Royal Tropical Institute, Amsterdam, the Netherlands. 1981. 16 p

GONÇALVES, A.L.M; LEMOS, M; NIERO, R; ANDRADE, S.F; MAISTRO, E.L. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Brassica oleracea* L. var. acephala D.C. in different cells of mice. **Journal of Ethnopharmacology** v.143 p.740–745, 2012.

GONÇALVES, C.A; SILVA, N.L; MAURO, M.O; DAVID, N; CUNHA-LAURA, A.L; AUHAREK, S.A; MONREAL, A.C.D; VIEIRA, M.C; SILVA, D.B; SANTOS, F.J.L; SIQUEIRA, J.M; OLIVEIRA. R.J. Evaluation of mutagenic, teratogenic, and immunomodulatory effects of *Annona nutans* hydromethanolic fraction on pregnant mice. **Genetics and Molecular Research**, v.13(2), p.4392-4405, 2014.

GONTIJO, D.C; FIETTO, L.C; LEITE, J.P.V. Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante, antimutagênica e toxicológica do extrato aquoso das folhas de *Ocimum gratissimum* L. **Rev. Bras. Pl. Med.** v.16, n.4, p.874-880, 2014.

GROVER, P; SINGH, S.P; PRABHAKAR, P.V; REDDY, A; BALASUBRAMANYAM, A; MAHBOOB, M; RAHMAN, M.F; MISRA, S. In vivo assessment of genotoxic effects of *Annona squamosa* seed extract in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.47,p.1964–1971, 2009.

GUPTA, J; SIDDIQUE, Y; ARA, G; BEG, T; AFZAL, M. Protective role of tea polyphenol, EGCG, against genotoxic damage induced by anticancer drugs and steroid compounds in cultured human lymphocytes. *The Internet Journal of Nutrition and Wellness*. v.7, p.1-8, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HARISH, R; SHIVANANDAPPA. T. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. **Food Chemistry**. v.95 p.180–185, 2006.

HOLLENBACH, C.B; SANTOS, M.F; MELLO, F.P.S; OSÓRIO, L.G; SCHUCH, T.L; SILVA, L.M; RODRIGUES, M.R.A; MELLO, F.B; MELLO, J.R.B. Avaliação do potencial genotóxico do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em ratos Wistar por meio do teste de micronúcleos. **R. bras. Bioci**, v. 12, n. 2, p. 66-71, 2014.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, censo demográfico 2010. Disponível em <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=292610&search=||info%EF5es-completas>.

IPEK, E; ZEYTIÑOGLU, H; OKAY, S; TUYLU, B.A; KURKCUOGLU, M; BASER, K.H. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. **Food Chemistry**, v.93 p.551–556, 2005.

JUCHIMIUK, J; GNYS, A; MALUSZYNSKA, J. DNA damage induced by mutagens in plant and human cell nuclei in acellular comet assay. **folia histochemica et cytobiologica**. v.44 p.127-131, 2006.

KAUR, G.J. ARORA, D.S. Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.9 p.30, 2009.

KAUR, S; MICHAEL, H; ARORA, S; HÄRKÖNEN, P.L; KUMAR, S. The in vitro cytotoxic and apoptotic activity of Triphala-an Indian herbal drug. **J Ethnopharmacol**. v. 97 p. 15-20, 2005.

KALBFLEISCH, J.G. probability and statistical inference. **Springer-verlag**. New York, p339. 1979.

KHISROON, M; KHAN, A; NASEEM, M; ALI, N; KHAN, S; RASHEED. S.B. Evaluation of DNA damage in lymphocytes of radiology personnel by comet assay. **J Occup Health**. v.57, p. 268–274, 2015.

KUMAR, R; MISHRA, A.K; DUBEY, N.K; TRIPATHI, Y.B. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**. v.115, p.159–164, 2007.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M; MAISANABA, S; PUERTO, M; PRIETO, A.I; PICHARDO, S; JOS, A; CAMEÁN A.M. Evaluation of the mutagenicity and genotoxic potential of carvacrol and thymol using the AmesSalmonellatest and alkaline, Endo IIIand FPG-modified comet assays with the human cell line Caco-2. **Food and Chemical Toxicology**, v.72 p.122–128, 2014.

LEAL, L.K.A.M; FONSECA, F.N; PEREIRA, F.A; CANUTO, K.M; FELIPE, C.F.B; FONTENELE, J.B; PITOMBEIRA, M.V; SILVEIRA, E.R; VIANA, G.S.B. Protective Effects of Amburoside A, a Phenol Glucoside from *Amburana cearensis*, against CCl₄-Induced Hepatotoxicity in Rats. **Planta Med**. V.74 p.497-502, 2008.

LEBOEUF, M; CAVE, A; BHAUMIK, P.K; MUKHERJEE, B; MUKHERJEE, R. The hytochemistry of the annonaceae. **Phytochemistry**, v.21(12)p. 2783-2813, 1982.

LUIZ, R.C; JORDÃO, B.Q; EIRA, A.F; RIBEIRO, L.R; MANTOVANI, M.S. Non-mutagenic or Genotoxic Effects of Medicinal Aqueous Extracts from the *Agaricus blazei* Mushroom in V79 Cells. **Cytologia**, v.68, p.1–6, 2003.

MACGREGOR, J.T; HEDDLE, J.A; HITE, M; MARGOLIN, B.H; RAMEL, C; SALAMONE, M.F; TICE, R.R; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**. v. 189 p. 103–112, 1987.

MAISANABA, S; PRIETO, A.I; PUERTO, M; GUTIÉRREZ-PRAENA, D; MARCOS, R; CAMEÁN A.M. In vitro genotoxicity testing of carvacrol and thymol using the micronucleus and mouse lymphoma assays. **Mutation Research**, v.78 p.37–44, 2015.

MARQUES, R.C.P; MEDEIROS, S.R.B; DIAS, C.S; BARBOSA-FILHO, J.M; AGNEZ-LIMA, L.F. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. **Mutation Research**. V.536, p.117–120, 2003.

MAURO, C; SILVA, C.P; MISSIMA, J; OHNUKI, T; RINALDI, R.B; FROTA, M. Estudo anatômico comparado de órgãos vegetativos de boldo miúdo, *Plectranthus ornatus* Codd. e malvariço, *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. – Lamiaceae. **Rev.bras. farmacogn.** v.18(4) p.608-613, 2008.

MARQUES, E.S; SILVA, S; NIERO, R; ANDRADE, S.F; ROSA, P.C.P; PERAZZO, F.F; MAISTRO E.L. Genotoxicity assessment of *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) extract in mammalian cells in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142, p.362–366, 2012.

MCKELVEY-MARTIN, V.J; GREEN, M.H.L; POOL-ZOBEL, B.L; COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. **Mutation Research**. v.288, p.47-63, 1993.

MEZZOUG, N; ELHADRI, A; DALLOUH, A; AMKISS, S; SKALI, N.S; ABRINI, J; ZHIRI, A; BAUDOUX D; DIALLO, B; EL JAZIRI, M; IDAOMAR M. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. **Mutation Research** v.629 p.100–110, 2007.

MIMICA-DUKIC, N; BOZIN, B; SOKOVIC, M; SIMIN, N. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis*. (Lamiaceae) Essential Oil. **J. Agric. Food Chem.** v.52, p.2485–2489, 2004.

PAULO, P.T.C; DINIZ, M.F.F.M; MEDEIROS, I.A; MORAIS, L.C.S.L; ANDRADE, F.B; SANTOS, H.B. Ensaios clínicos toxicológicos, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill). **Rev Bras Farmacog.** v. 19 p. 68-76, 2009.

PERON, A.P; FELIPES, J; MATTGE, G.I; CANTAGALLI, L.B; MARIUCCI, R.G; VICENTINI, V.E.P. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 2, p. 127-130, 2008.

PINHO, D.S; STURBELLE, R.T; MARTINO-ROTH, M.G; GARCIAS, G.L. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy.** v. 20, p. 165-170, 2010.

PINTO, A.C.Q. Taxonomy and Botany. In: PINTO, A.C.Q.; CORDEIRO, M.C.R.; ANDRADE, S.R.M.; et. al. (Org.). *Annona* Species. International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, UK, p. 3-27, 2005.

PURVES, D; HARVEY, C; TWEATS, D; LUMLEY, C.E. Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. **Mutagenesis.** v. 10 p. 297-312, 1995.

RABELLO-GAY, M.N; RODRIGUES, M.A. LA. R.; MONTELEONE-NETO, R. Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: Métodos e critérios de avaliação. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 1991.

RATES, S. M. K. Plants as source of drougs. *Toxicon*, n. 39, p. 603-613, 2001.

RAVIKUMAR, Y.S; MAHADEVAN, K.M; MANJUNATHA, H; SATYANARAYANA, N.D. Antiproliferative, apoptotic and antimutagenic activity of isolated compounds from *Polyalthia cerasoides* seeds. **Phytomed.** v. 17 p. 513-8, 2010.

RAZAK, M.A; AIDOO, K.E; CANDLISH, A.G.G. Mutagenic and cytotoxic properties of three herbal plants from Southeast Asia. **Tropical Biomedicine.** v. 24 p. 49–59, 2007.

REBOUÇAS, S.O; SILVA, J; BERTONI, R.S; DECKER, N; SANTOS, M.S; ROSSATTO, R.R; CORRÊA, D.S; FERRAZ, A.B.F. Assessment of the genotoxic and mutagenic properties of Himatanthus Articulates bark extracts used as phytotherapeutic drug in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology** v.147 p.474–480, 2013.

RIJO, P; FERNANDES, A.S; SIMÕES, F; PINHEIRO, L. Evaluation of diterpenoids from *P. ornatus* as potential COX-1 inhibitor. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v.9, p.111-118, 2012.

RODEIRO, I; CANCINO, L; GONZALEZ, J.E; MORFFI, J; GARRIDO, G; GONZALEZ, R.M; NUNEZ, A.R. Delgado Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. **Food and Chemical Toxicology.** v.44 p.1707–1713, 2006.

RODRIGUES, A. G.; DE SIMONI, C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 31, n. 255, p. 7-12, mar./abr. 2010.

RUIZ, A.L.T.G; TAFFARELLO, D; SOUZA, V.H.S; CARVALHO, J.E. Farmacologia e toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharigenistelloides*. **Rev Bras Farmacogn.** v. 18 p. 295-300, 2008.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste de micronúcleo em células humanas in vitro. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese ambiental. ULBRA, Rio Grande do Sul, p. 201-222, 2003.

SAMPAIO, J; TREMÉA, R; MARCO, M.G; VIEIRA, R.B; TACCA, J.A; STRÖHER, D.J; PILAR, B.C; GÜLLICH, A.A.C; SCHWANZ, M; MANFREDINI, V. Estudo da genotoxicidade in vitro e in vivo após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. obtidos por infusão. **R. bras. Bioci.** v.10(4) p.462-467, 2012.

SANTOS, R.A; CABRAL, T.R; CABRAL, I.R; ANTUNES, L.M.G; ANDRADE, C.P; CARDOSO, P.C.S; BAHIA, M.O. Genotoxic effect of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated in vitro. **Biocell.** v.32 p.195-200, 2008.

SARTO, F.; FINNOTO S., GIACOMELLI L., *et al.* The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, 2: 11-17, 1987.

SARTO, F.; FINNOTO S., GIACOMELLI L., *et al.* The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. **Mutagenesis**, 2: 11-17, 1987.

SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutation Research*, v. 31, p. 9-15, 1975.

SIDDIQUE, Y.H; ARA, G; BEG, T; SHAHI, M.H; AFZAL, M. Protective Role of *Ocimum sanctum* Infusion against Norethynodrel-induced Genotoxic Damage in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes, **journal of the Indian Society of Toxicology**. v.02 p.10-14 2006.

SILVA, M.I.G; GONDIM, A.P.S; NUNES, I.F.S; SOUSA, F.C.F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, p.455-462, 2006.

SINGH, M.P; MCCOY, M; TICE, R.R; SCHINEIDER, P. a simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* V.175, p. 184-191. 1988.

SILVA, R. C. Avaliação da Genotoxicidade e Antigenotoxicidade do extrato bruto de *Garcinia angostana* L. (EBGM). (Dissertação). Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular - área de concentração: Biotecnologia, Biocatálise e Genética Toxicológica. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, 2012.

SOUSA, O.V; VIEIRA, G.D; PINHO J.J.R.G; YAMAMOTO, C.H; ALVES M.S. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract of *Annona muricata* L. Leaves in Animal Models. *Int. J. Mol. Sci.* v. 11, p. 2067-2078, 2010.

SOUZA M. C., SIANI A.C., RAMOS M.F., MENEZES-DE-LIMA O.J., HENRIQUES M.G. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. *Pharmazie*; 58:582-6. 2003

TICE, R.R; AGURELL, E; ANDERSON, D; BURLINSON, B; HARTMANN, A; KOBAYASHI, H; MIYAMAE, Y; ROJAS, E; RYU, J.C; SASAKY, Y.F. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol.Mutagen.* v. 35, p. 205-221, 2000.

TEIXEIRA, R.O; CAMPAROTO, M.L; MANTOVANI, M.S; VICENTINI, V.E.P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in vitro and in vivo assays. *Genet Mol Bio.* v. 4, p. 551-555, 2003.

TSUBOY, M.S; MARCARINI, J.C; LUIZ, R.C; BARROS I.B; FERREIRA D.T; RIBEIRO L.R; MANTOVANI M.S. In Vitro Evaluation of the Genotoxic Activity and Apoptosis Induction of the Extracts of Roots and Leaves from the Medicinal Plant *Coccoloba mollis* (Polygonaceae). *Journal Med Food.* v.13 p. 503–508, 2010.

TURKEZ, H; AYDIN, E. Investigation of cytotoxic, genotoxic and oxidative properties of carvacrol in human blood cells. *Toxicology and Industrial Health*, v.16 p 1–9, 2013.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* v. 27, n.1, p.1-7, 2006.

VARANDA, E.A; DEVIENNE, K.F; RADDI, M.S.G; FURUYA, E.M; VILEGAS, W. Mutagenicity of paepalantine dimer and glycoside derivatives from *Paepalanthus bromelioides*. **Toxicology in Vitro** v. 18 p. 109–114, 2004.

VEILLEUX, C., KING, S.R., 1996. In: Morganstein, L. (Ed.), *An Introduction to Ethnobotany* (Available at: <http://www.accessexcellence.org/RC/Ethnobotany/>. Accessed: September 2007.

VERSCHA EVE, L; VAN STADEN, J. Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 28 p. 575-587, 2008.

VIJAYALAXMI, A; RAYMOND, R; TICE, B; GARY, H.S. Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. **Mutation Research**, v.271, p. 243-252, 1992.

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

WONG, V.W.C; SZETO, Y.T; COLLINS, A.R; BENZIE, I.F.F. The Comet Assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research. **Current Topics in Nutraceutical Research**, v. 3,p.1-14, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Regional office for the Western Pacific. The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, 2011. 12p.

YUAN, S. S. F. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. Elsevier Science Inc., 2003

ZINK, T; CHAFFIN, J. “Herbal ‘health’ products: What family physicians need to know,” **American Family Physician**. V.58, p.1133–1140, 1998.

Anexo I- instruções aos autores (periódico Mutation Research)



MUTATION RESEARCH - GENETIC TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL MUTAGENESIS

A section of Mutation Research

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 1383-5718

DESCRIPTION

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis publishes papers advancing knowledge in the field of genetic toxicology. Papers are welcomed in the following areas:

New developments in genotoxicity testing of chemical agents (e.g. improvements in methodology of assay systems and interpretation of results). Alternatives to and refinement of the use of animals in genotoxicity testing. Nano-genotoxicology, the study of genotoxicity hazards and risks related to novel man-made nanomaterials. Studies of epigenetic changes in relation to genotoxic effects. The use of structure-activity relationships in predicting genotoxic effects. The isolation and chemical characterization of novel environmental mutagens. The measurement of genotoxic effects in human populations, when accompanied by quantitative measurements of environmental or occupational exposures. The application of novel technologies for assessing the hazard and risks associated with genotoxic substances (e.g. OMICS or other high-throughput approaches to genotoxicity testing).

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis is now accepting submissions for a new section of the journal that will be dedicated to the discussion of current issues relating to design, interpretation and strategic use of genotoxicity tests (**Current Topics in Genotoxicity Testing**). This section is envisaged to include discussions relating to the development of new international testing guidelines, but also to wider topics in the field. The evaluation of contrasting or opposing viewpoints is welcomed as long as the presentation is in accordance with the journal's aims, scope, and policies.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

Environmental Scientists, Occupational Health Researchers, Mutageneticists, Toxicologists

IMPACT FACTOR

2014: 2.415 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
 Chemical Abstracts
 Current Contents/Life Sciences
 MEDLINE®
 EMBASE
 PASCAL M
 Reference Update
 Scopus
 EMBiology

EDITORIAL BOARD

Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

EDITORS:

G. Jenkins, Swansea University, Singleton Park, SA2 8PP, Swansea, Wales, UK
P.D. Josephy, Dept. of Molecular & Cellular Biology, College of Biological Science, University of Guelph, 50 Stone Road East, Guelph, ON N1G 2W1, Canada, Fax: +1 519 837 1802
S. Knasmueller, Inst. of Cancer Research; Environmental Toxicology Group; Medical University Vienna, Inner Medicine I, Borschkegasse 8a, A-1090, Vienna, Austria

SPECIAL ISSUE EDITOR:

D.J. Kirkland, Genetic Toxicology Consulting, Kirkland Consulting, P.O. Box 79, Tadcaster, North Yorkshire, LS24 0AS, England, UK

FOUNDING EDITOR:

F.H. Sobels

EDITORIAL BOARD

D. Averbek, Orsay Cedex, France
A.B. Britt, Davis, California, USA
T.A. Cebula, College Park, Maryland, USA
W.N. Choy, Lafayette, New Jersey, USA
M.C. Cimino, Washington, District of Columbia, USA
A.R. Collins, Oslo, Norway
M.L. Cunningham, Research Triangle Park, North Carolina, USA
A.K. Dhawan, Ahmedabad, Gujarat, India
S.H. Doak, Swansea, Wales, UK
A. Doherty, Cambridge, UK
Y.E. Dubrova, Leicester, UK
M. Dusinska, Norway
D.A. Eastmond, Riverside, California, USA
G.L. Erexson, North Chicago, Illinois, USA
S. de Flora, Genova, Italy
K. Fujikawa, Higashi-Osaka, Japan
J. Gallagher, Research Triangle Park, North Carolina, USA
J.B. Guttenplan, New York, New York, USA
S. Hamada, Kamisu-shi, Ibaraki-ken, Japan
A. Hartmann, Basel, Switzerland
J. He, Hangzhou, China
Y. Ibuki, Suruga-ku, Shizuoka-Shi, Japan
A.N. Jha, Plymouth, UK
K. Kawai, Kitakyushu-shi, Fukuoka, Japan
S. Kyoizumi, Hiroshima, Japan
M.G. Manjanatha, Jefferson, Arkansas, USA
F. Marchetti, Health Canada, Canada
H.J. Martus
K. Matsumoto

T. Morita, Tokyo, Japan
K. Mortelmans, Menlo Park, California, USA
L. Mueller, Basel, Switzerland
A. Noda, Hiroshima, Japan
T. Nohmi, Minato-ku, Tokyo, Japan
S. Oikawa
F. Palitti, Viterbo, Italy
C. Pueyo de la Cuesta, Córdoba, Spain
A.M. Richard, Research Triangle Park, North Carolina, USA
E. Rojas del Castillo, Mexico DF, Mexico
A. Rothfuss, Berlin, Germany
D. Shaughnessy, Raleigh, North Carolina, USA
L.M. Sierra Zapico, Oviedo, Spain
N.P. Singh, Seattle, Washington, USA
G. Speit, Ulm, Germany
S. Sutou, Okayama, Japan
T. Takamura-Enya, Kanagawa, Japan
D. Tavares, Franca, São Paulo, Brazil
V Thybaud, Vitry sur Seine Cedex, France
J. Topinka, Prague, Czech Republic
M.Z. Vasquez, Morrisville, North Carolina, USA
L. Verschaeve, Brussels, Belgium
K.K. Vijayalaxmi, San Antonio, Texas, USA
K.L. Witt, Research Triangle Park, North Carolina, USA
L.J. Wu, Hefei, Anhui, China
M. Yamada
E. Zeiger, Chapel Hill, North Carolina, USA

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis publishes papers advancing knowledge in the field of genetic toxicology. Papers are welcomed in the following areas:

New developments in genotoxicity testing of chemical agents (e.g. improvements in methodology of assay systems and interpretation of results). Alternatives to and refinement of the use of animals in genotoxicity testing. Nano-genotoxicology, the study of genotoxicity hazards and risks related to novel man-made nanomaterials. Studies of epigenetic changes in relation to genotoxic effects. The use of structure-activity relationships in predicting genotoxic effects. The isolation and chemical characterization of novel environmental mutagens. The measurement of genotoxic effects in human populations, when accompanied by quantitative measurements of environmental or occupational exposures. The application of novel technologies for assessing the hazard and risks associated with genotoxic substances (e.g. OMICS or other high-throughput approaches to genotoxicity testing).

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis is now accepting submissions for a new section of the journal that will be dedicated to the discussion of current issues relating to design, interpretation and strategic use of genotoxicity tests (**Current Topics in Genotoxicity Testing**). This section is envisaged to include discussions relating to the development of new international testing guidelines, but also to wider topics in the field. The evaluation of contrasting or opposing viewpoints is welcomed as long as the presentation is in accordance with the journal's aims, scope, and policies.

Types of Paper

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis publishes the following types of article: (I) Research papers- papers reporting results of original, fundamental research. (II) Short communications of up to 5 printed pages. (III) Rapids - are accelerated publications - research papers identified by the Editor as being of significant quality and thereby qualifying for rapid reviewing, and publication within 8-10 weeks of acceptance. (IV) Current issues are generally short, 1-2 page comments on a topical theme, and are published within 10 weeks of acceptance. (V) Volunteered and invited Mini-reviews of less than 10 printed pages, using references generally no later than 2 years old. The journal accepts Letters to the Editor.

Please note that Full-length reviews comprehensively covering and critically analysing a topic are published in *Mutation Research Reviews*. Also published in the Reviews section are invited papers in the series *Reflections in Mutation Research*, in which research and techniques that have played an important part in the development of the field of mutation research are revisited and their significance discussed. Special issues, comprising multiple original and/or review articles written from a particular viewpoint, on a central theme, are published on a regular basis in the appropriate section of *Mutation Research* by topic or article type.

Any submissions that report the results of studies on extracts or complex mixtures (e.g., solvent extracts of herbal preparations; soil, air, or water samples) will receive preliminary review by an Editor. Unless such manuscripts offer significant new insight, such as the chemical identification of previously unknown mutagens or anti-mutagens, they will be returned to the authors without being sent for further review. For further clarification of this journal policy please refer to the [Editorial](#) published in *Mutation Research* 391 (1997) 1.

It is the policy of the Editors to conduct a preliminary review of each submitted manuscript that reports the results of molecular epidemiology studies.

(i) As with any studies involving human subjects, approval by an appropriately constituted ethics review board and informed consent by participants are required.

(ii) Authors are advised to collaborate with qualified epidemiologists with respect to study design and interpretation.

(iii) In studies of the potential genotoxic effects of exposure to environmental agents, it is strongly recommended that quantitative evidence of exposure (such as analysis of personal monitoring devices or measurement of urinary biomarkers, for example) be obtained.

Manuscripts which do not conform to these requirements will be returned to the authors without being sent for further review.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

The Journal requires full disclosure of all potential conflicts of interest. Please declare any financial or personal interests that might be viewed to inappropriately influence the work presented. Interests could include employment, consultancies, stock ownership and honoraria. If there are no conflicts of interest, the authors should state, "The authors declare that there are no conflicts of interest". If there are any financial or personal interests please state so here and include this statement as an Acknowledgement in your submitting manuscript. Signed copies of the *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* Conflict of Interest policy form are required upon submission. The Conflict of Interest policy form can be downloaded [here](#). In order to minimize delays, we strongly advise that the signed copies of these statements are prepared before you submit your manuscript.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

A Chinese version of the submission instructions for MUTGEN can be found [here](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3300**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver

value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

The Editors welcome submissions by the authors of the names and addresses of up to four individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.

Free access to scientific publications for public institutions in developing countries:

The Health InterNetwork Access to Research Initiative (HINARI) is an initiative to provide free or nearly free access to the major journals in biomedical and related social sciences, to public institutions in developing countries. Starting in January 2002 with over 2000 journals from Elsevier and other leading biomedical publishers, HINARI is part of the Health InterNetwork, which was introduced by the United Nations' Secretary General Kofi Annan at the UN Millennium Summit in the year 2000.

For further information and registration, please check the HINARI site: <http://www.who.int/hinari/en/>

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. **The abstract should be up to 300 words of size.**

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide between 3 to 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

e-CRC

General points: Elsevier can only accept MS Word, LaTeX, or postscript/PDF documents as electronic camera-ready copy (e-CRC). Electronic files can be stored on CD or may be transferred to Elsevier via FTP (details available from Customer support: <http://support.elsevier.com>). Please note: always send the source file (Word or LaTeX) together with any PDF files as this can contribute to better quality final PDF files and help in the conversion to XML.

MS Word file: Please ensure that you use normal fonts as much as possible in your documents, such as Times New Roman, Arial, Symbol, Helvetica, or Times (TrueType or Type 1 fonts). Special fonts, such as those used in the Far East (Japanese, Chinese, Korean, etc.) may be cause problems during processing. If you use a lot of special fonts, please convert the document to PDF with Adobe Acrobat (see below, and also Elsevier's Quickguide: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Please place figures in a logical place within the document (see also the section on *Preparation of electronic illustrations* at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>). To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-checker' function of your wordprocessor.

LaTeX documents: Please use a LaTeX setup that uses Type 1 fonts instead of the sometimes default bitmap fonts (Type 3, or pk fonts). For instance, using the LaTeX Times package may be enough to enable this adjustment. For information on LaTeX see <https://www.elsevier.com/latex>. Please provide all document-related and temporary files on submission, as well as the resulting postscript or PDF file.

Postscript/PDF files: Please create postscript files, making sure all fonts are embedded. When creating PDF files with Adobe Acrobat, please use version 4.05 or higher, and use the standard "Press Optimized" settings, as provided by Adobe.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.

- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) and in the printed version (unless you specify otherwise). Please indicate your preference for color: in print and on the Web, or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/mutation-research-genetic-toxicology-and-environmental-muta>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume and issue/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-Itwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum

size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data in Brief

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, *Data in Brief* (<http://www.journals.elsevier.com/data-in-brief>). The open access fee for *Data in Brief* is \$500. For authors who submit in 2015 a reduced fee of \$250 will apply. Please use the following template to write your Data in Brief: <https://www.elsevier.com/dib-template>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission Checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web and in print, or to be reproduced in color on the Web and in black-and-white in print. There are no color charges for Web and/or print reproduction
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

Anexo II- Parecer consubstânciado

CEP/UEFS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação mutagênica de extratos de Boldo (*Plectranthus ornatus*) e Graviola (*Annona muricata*) através do Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleo em linfócitos humano

Pesquisador: Rodrigo dos Santos Rocha

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 35145814.0.0000.0053

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Feira de Santana

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 940.844

Data da Relatoria: 31/12/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa para construção de tese de Doutorado no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), de autoria de RODRIGO DOS SANTOS ROCHA, sob a orientação da Profª Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira e o apoio da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia(UFRB).

O projeto aborda que "Desde os primórdios da humanidade os vegetais são largamente utilizados para fins terapêuticos no tratamento de diversas enfermidades. A partir desses conhecimentos foram produzidos os fitoterápicos que têm suas propriedades de cura reconhecida. Por serem ditos naturais, existe a crença, entre muitos indivíduos, de que são isentos de efeitos adversos, porém, muitos estudos realizados in vitro e in vivo chamam a atenção para o uso indiscriminado de plantas no tratamento de doenças, já que alguns efeitos genotóxicos têm sido associados ao seu uso. Dentre os vários vegetais que são utilizados na medicina tradicional, algumas espécies se destacam como o boldo (*Plectranthus ornatus*) e graviola (*Annona muricata*) devido a sua larga utilização no tratamento de várias doenças. Assim, esse trabalho objetiva avaliar a mutagenicidade ou a antimutagenicidade dos extratos destas plantas através do Ensaio Cometa e Teste de Micronúcleo em linfócitos humanos." (projeto completo p. 1)

Em relação aos aspectos metodológicos: A pesquisa visa avaliar estes efeitos mediante testes "in

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 **CEP:** 44.031-460
UF: BA **Município:** FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 **E-mail:** cep@uefs.br



Continuação do Parecer: 940.844

vitro" em células sanguíneas. "As plantas de Boldo (*Plectranthus ornatus*) e graviola (*Annona muricata*) serão obtidas na cidade de Retirolândia, BA e, após feitas exsicatas serão encaminhadas para o herbário da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (HUFREB) para identificação por um botânico. As folhas coletadas serão colocadas para secar em estufa, pulverizadas e os extratos obtidos com o emprego de etanol: água na proporção de 70% e 30%, respectivamente. posteriormente a solução será filtrada e armazenada em geladeira a 5°. A solução de etanol será removida por evaporador rotativo, enquanto a água será retirada por liofilização. Avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica. Neste projeto será avaliada a atividade genotóxica dos extratos das plantas, utilizando os testes do Cometa e de Micronúcleo (MN) em células do sangue humano e a atividade antigenotóxica utilizando o ensaio Cometa. Serão realizadas coletas de sangue do próprio pesquisador, por um profissional capacitado para tal função, em intervalos de uma semana entre cada uma delas. Os experimentos serão realizados em triplicata. O sangue coletado, 5 mL por coleta em um total de 12 coletas, será centrifugado para a separação dos leucócitos por dez minutos a 3200 rpm. O anel de leucócitos, pequena quantidade de plasma e soro serão transferidos para um tubo estéril e serão homogeneizados. O Ensaio Cometa será utilizado para avaliar possível atividade

genotóxica traduzida como dano ao DNA, ou antigenotóxica, avaliada através da redução pelos extratos de danos ao DNA induzidos pelo peróxido de hidrogênio (protocolo proposto por Tice et al.(2000)" Como o sangue será coletado do próprio pesquisador, este pede dispensa de TCLE.

Apresenta Cronograma exequível e Orçamento no valor de R\$ 24.808,95 com a contrapartida da UEFS descrita como materiais e equipamentos do Laboratório de Genética e Toxicologia e contrapartida da UFRB através do Laboratório de Bioquímica e imunologia Veterinária.

O Pesquisador Responsável tem experiência técnica e o currículo da Pesquisadora Colaboradora e Orientadora dá o suporte necessário ao desenvolvimento da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

"Avaliar, através do Ensaio Cometa e do Teste de Micronúcleo em linfócitos humanos, possíveis efeitos mutagênicos ou antimutagênicos induzidos por extratos de duas plantas utilizadas como medicamento na medicina tradicional, visando subsidiar a segurança do uso in natura e a produção de medicamentos pela indústria farmacêutica.

Objetivo Secundário:

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-460
UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 E-mail: cep@uefs.br



Continuação do Parecer: 940.844

Identificar danos genéticos, traduzidos em micronúcleos, induzidos por extratos de Boldo (*Plectranthus ornatus*), e graviola (*Annona muricata*), plantas largamente utilizadas como medicamentos. Avaliar a genotoxicidade ou a antigenotoxicidade traduzidas, respectivamente, em danos ao DNA e reparo destes danos dos extratos de Boldo (*Plectranthus ornatus*) e graviola (*Annona muricata*) através do Ensaio Cometa." (Projeto completo, p.3, e Formulário simplificado da Plataforma Brasil, p.2)

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

"Os riscos previstos serão os de manipulação dos reagentes e equipamentos no laboratório pelo pesquisador, riscos esses que são mínimos já que o mesmo tem o domínio sobre a técnica." (formulário simplificado Plataforma Brasil, p.2)

Benefícios: "Os resultados desta pesquisa pode subsidiar na produção de medicamentos oriundos destes vegetais, e até mesmo sua utilização "in natura" pelas populações trazendo maior segurança na utilização destes." (formulário simplificado Plataforma Brasil, p.2)

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O tema proposto tem relevância científica e social, e é viável do ponto de vista ético.

Contudo, o desenvolvimento da pesquisa revelou a necessidade de reflexão no que se refere à metodologia, pois para a obtenção do sangue para os testes laboratoriais, o próprio pesquisador, e apenas ele, doará o sangue. O Pesquisador tem conhecimento técnico-científico de todos os passos a serem realizados no estudo, seus objetivos e importância, bem como do desconforto que passará doando as amostras de sangue.

Em relação a ser o único doador das amostras sanguíneas, em Ofício anexado à Plataforma Brasil, o pesquisador tece as seguintes considerações:

"A literatura é ampla no registro de testes de mutagenicidade utilizando culturas de células que são clones de uma mesma linhagem celular (Valentin-Severin et al., 2003, Sturbelle et al., 2008, Eroglu et al., 2010, Senedese et al., 2011, Widziewicz et al., 2012, Li et al., 20012), sendo que nosso trabalho não objetiva avaliar se a variabilidade genética interfere na ação das substâncias aqui estudadas.

Este estudo, especificamente, teve como base a dissertação do mestrado de Ronaldo Carvalho da

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 **CEP:** 44.031-460
UF: BA **Município:** FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 **E-mail:** cep@uefs.br



Continuação do Parecer: 940.844

Silva (em anexo), defendida e aprovada por banca examinadora no Programa de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), trabalho este que também só utilizou uma linhagem celular.

Ao investigar o potencial mutagênico de uma dada substância, quer este potencial seja ou não evidenciado, estamos gerando informações para subsidiar o uso in natura e para a produção de medicamentos, que nunca devem ser inferidas a partir de um só estudo, estudo desta natureza foi realizado por Rodeiro et al., 2006, no qual foram incluídos apenas 2 indivíduos."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Protocolo completo e vale ressaltar que o pesquisador apresentou:

- 1) Declaração da coordenadora do Laboratório de Genética e Toxicologia da UEFS, a analista universitária MAIZA ALVES LOPES, confirmando a existência da infraestrutura necessária para apoiar a realização da pesquisa.
- 2) Declaração do professor e coordenador do Laboratório de Bioquímica e Imunologia Veterinária da UFRB ALEXANDRE MORAES PINHEIRO, também afirmando a existência da infraestrutura para a realização da pesquisa.
- 3) Declaração da técnica em Patologia Clínica da UFRB VITORIA CAROLINE DA SILVA PORTO, se comprometendo com a coleta de sangue para a pesquisa.
- 4) Declaração de compromisso com a Res.466/2012 da pesquisadora colaboradora a prof.ª ENEIDA DE MORAES MARCÍLIO CERQUEIRA.
- 5) Concordância com a pesquisa através da folha de rosto assinada pelo vice-diretor do Departamento de Ciências Biológicas Prof.º HÉLIO KAMIDA.

Recomendações:

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 **CEP:** 44.031-460
UF: BA **Município:** FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 **E-mail:** cep@uefs.br



Continuação do Parecer: 940.844

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após o atendimento das pendências, o Projeto está aprovado para execução, pois atende aos princípios bioéticos para pesquisa envolvendo seres humanos, conforme a Resolução nº 466/12 (CNS).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Tenho muita satisfação em informar-lhe que o seu Projeto de Pesquisa satisfaz às exigências da Res. 466/12. Assim, seu projeto foi Aprovado, podendo ser iniciada a coleta de dados com os participantes da pesquisa conforme orienta o Cap. IX.3, alínea 5a - Res. 466/12.

Relembro que conforme institui a Res. 466/12, Vossa Senhoria deverá enviar a este CEP relatórios anuais de atividades pertinentes ao referido projeto e um relatório final tão logo a pesquisa seja concluída. O não cumprimento poderá implicar no impedimento de apreciação de novos projetos do pesquisador.

Em nome dos membros CEP/UEFS, desejo-lhe pleno sucesso no desenvolvimento dos trabalhos e, em tempo oportuno, um ano, este CEP aguardará o recebimento dos referidos relatórios.

FEIRA DE SANTANA, 29 de Janeiro de 2015

Assinado por:
Zannety Conceição Silva do Nascimento Souza
(Coordenador)

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 **CEP:** 44.031-460
UF: BA **Município:** FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 **E-mail:** cep@uefs.br

Anexo III- Instruções aos autores (periódico Mutagenesis)

OXFORD JOURNALS CONTACT US MY BASKET MY ACCOUNT

mutagenesis

ABOUT THIS JOURNAL CONTACT THIS JOURNAL SUBSCRIPTIONS CURRENT ISSUE ARCHIVE SEARCH

[Oxford Journals](#) > [Life Sciences & Medicine](#) > [Mutagenesis](#) > [For Authors](#) > [Instructions To Authors](#)

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

New for 2010 – Please note that the journal now encourages authors to complete their copyright licence to publish form online

Manuscripts must be submitted online. Once you have prepared your manuscript according to the instructions below please visit the [online submission website](#). Instructions on submitting your manuscript online can be [viewed here](#).

SCOPE AND POLICY OF MUTAGENESIS

Mutagenesis is an international multi-disciplinary journal designed to bring together research aimed at the identification, characterization and elucidation of the mechanisms of action of physical, chemical and biological agents capable of producing genetic change in living organisms and the study of the consequences of such changes.

A variety of different types of manuscripts are published in *Mutagenesis*:

Original articles, reporting the results of fundamental and molecular studies upon the mechanisms of induction of point, chromosomal and genomic mutations and their roles in inherited and somatic disorders.

Papers on guidelines for mutagenicity testing of environmental agents, which describe and discuss the techniques and quality control standards necessary for adequate testing of environmental agents.

Cell lines, strains, DNA probes etc. The submission to and acceptance of a manuscript for publication in *Mutagenesis* implies that the authors will provide samples of such materials as cell lines, strains, mutants and DNA probes described in their publication to other investigators for research purposes.

Animal husbandry. Papers that report experiments involving live animals must include a statement that the animals were treated and housed in accordance with approved guidelines (giving the source) or supervised by an animal care committee (giving the name) or both.

Letters to the Editors may be submitted on current topics. Such letters may cover theoretical, social and practical aspects of mutational change, but should aim for a concise presentation.

Reviews The Editors welcome the submission of reviews of topics covering all aspects of mutagenic change.

Meta-analyses *Mutagenesis* publishes well-written systematic reviews on gene variants that conform to standards such as the Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology standards (Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting: Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. *JAMA*. 2000;283(15):2008-2012).

However, due to a change in policy, single gene SNP or single disease systematic reviews or meta-analyses will no longer be published, except in exceptional circumstances. The Editorial Board selects reviews of exceptional quality on very relevant topics only. For all others, we suggest consulting the HuGENet website <http://www.cdc.gov/genomics/huGENet/reviews/index.htm> in order to submit the meta-analyses elsewhere.

All manuscripts submitted to *Mutagenesis* are refereed for their pertinence, content and relevance to the scope of the journal.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Mutagenesis accepts submissions online at <http://mc.manuscriptcentral.com/mutage>

Author Self-Archiving/Public Access policy from May 2005
For information about this journal's policy, please visit our Author Self-Archiving policy page http://www.oxfordjournals.org/access_purchase/self-archiving_policya.html.

For instructions on how to submit your manuscript online please [click here](#).

For any queries please contact the editorial office:
Prof. D H Phillips, King's College London, Franklin-Wilkins Building, 150 Stamford Street, London SE1 9NH, UK.
[Click here](#) to email the Editorial Office.

Submission of a paper implies that it reports unpublished work and that it is not under consideration for publication elsewhere. If previously published tables, illustrations or more than 200 words of text are to be included, then the copyright holder's written permission must be obtained. Copies of any such permission letters should be enclosed with the paper.

OPEN ACCESS OPTION FOR AUTHORS

Mutagenesis authors have the option to publish their paper under the [Oxford Open initiative](#); whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication. After your manuscript is accepted the corresponding author will be required to accept a mandatory licence to publish agreement. As part of the licensing process you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for open access. If you do not select the open access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will not be charged.

THE JOURNAL

- > [About this journal](#)
- > [Publishers' Books for Review](#)
- > [Rights & Permissions](#)
- > [Dispatch date of the next issue](#)
- > [This journal is a member of the Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#)
- > [We are mobile – find out more](#)

Published on behalf of


- > [The UK Environmental Mutagen Society](#)

Impact factor: 3.183

Editor-in-Chief
Professor David Phillips
> [View full editorial board](#)


FOR AUTHORS

- > [Instructions to authors](#)
- > [Online submission](#)
- > [Submit Now!](#)



Open access options for authors - visit [Oxford Open](#)

- > [Self-archiving policy](#)



- > [This journal enables compliance with the NIH Public Access Policy](#)

ALERTING SERVICES

- > [Email table of contents](#)
- > [Email Advance Access](#)
- > [CiteTrack](#)
- > [XML RSS feed](#)

CORPORATE SERVICES

- > [Advertising sales](#)
- > [Reprints](#)
- > [Supplements](#)

If you choose the Open Access option you can pay the charges using our Author Services site. This will enable you to pay online with a credit/debit card, or request an invoice by email or post. Open access charges can be viewed [here](#) in detail; discounted rates are available for authors based in some developing countries (click [here](#) for a list of qualifying countries). Please note that these charges are in addition to any colour charges that may apply.

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the European Union, OUP will assume that the service is provided for business purposes. Please provide a VAT number for yourself or your institution and ensure you account for your own local VAT correctly.

CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

At the point of submission, Mutagenesis policy requires that each author reveal any financial interests or connections, direct or indirect, or other situations that might raise the question of bias in the work reported or the conclusions, implications, or opinions stated - including pertinent commercial or other sources of funding for the individual author(s) or for the associated department(s) or organization(s), personal relationships, or direct academic competition. When considering whether you should declare a conflicting interest or connection please consider the conflict of interest test: Is there any arrangement that would embarrass you or any of your co-authors if it was to emerge after publication and you had not declared it?

As an integral part of the online submission process, Corresponding authors are required to confirm whether they or their co-authors have any conflicts of interest to declare, and to provide details of these. If the Corresponding author is unable to confirm this information on behalf of all co-authors, the authors in question will then be required to submit a completed [Conflict of Interest form](#) to the Production Office. It is the Corresponding author's responsibility to ensure that all authors adhere to this policy.

If the manuscript is published, Conflict of Interest information will be communicated in a statement in the published paper.

PROOFS

Authors are sent page proofs electronically as a PDF file, or by post if required. To avoid delays in publication, proofs should be checked immediately for typographical errors and returned to the publishers by express (special delivery) post. Alternatively, to save time, corrections may be given to Oxford University Press by fax: +44 (0)1865 353773. Essential changes of an extensive nature may be made only by insertion of a Note added in proof. A charge is made to authors who insist on amendment within the text at the page-proof stage.

LICENCE TO PUBLISH

It is a condition of publication in the Journal that authors grant an exclusive licence to UK Environmental Mutagen Society. This ensures that requests from third parties to reproduce articles are handled efficiently and consistently and will also allow the article to be as widely disseminated as possible. Authors may use their own material in other publications provided that the Journal is acknowledged as the original place of publication, and Oxford University Press is notified in writing and in advance.

Upon receipt of accepted manuscripts at Oxford Journals authors will be invited to complete an online copyright licence to publish form.

Please note that by submitting an article for publication you confirm that you are the corresponding/submission author and that Oxford University Press ("OUP") may retain your email address for the purpose of communicating with you about the article. You agree to notify OUP immediately if your details change. If your article is accepted for publication OUP will contact you using the email address you have used in the registration process. Please note that OUP does not retain copies of rejected articles.

PREPARATION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be in their final form when they are submitted so that proofs require only correction of typographical errors.

Sections of the manuscript

Regular full-length papers should be subdivided into the following sequence of sections: Title page, Abstract, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Legends to figures, Tables. The Title page must include the telephone and fax numbers and E-mail address of the corresponding author. In the Journal, the Materials and methods, Acknowledgements and References sections are printed in smaller type to accommodate more text. The Materials and methods section must give precise details of strains, concentrations and solvents. Where an activation system has been included it is necessary to know (i) the source, (ii) the inducer and (iii) the concentration treatment time, and incubation time with conditions should be given. Positive and negative controls together with their concentrations must be included. The number of replicates and the number of repeat experiments should be stated. Additional factors for *in vivo* tests should include age, weight, sex and total number of animals used in each experiment. A detailed dose regime is required. Papers for the Mutagenicity testing section should conform to the above requirements. In addition, results should be presented in tabular form.

General format

Prepare your manuscript text using a Word processing package (save in .doc or .rtf format). Use double spacing (space between lines of type not less than 6 mm) throughout the manuscript and leave margins of 25 mm (1 inch) at the top, bottom and sides of each page. Number each page. Please avoid footnotes; use instead, and as sparingly as possible, parenthesis within brackets. Enter text in the style and order of the journal. Type references in the correct order and style of the journal. Type unjustified, without hyphenation, except for compound words. Type headings in the style of the journal. Use the TAB key once for paragraph indents. Where possible use Times for the text font and Symbol for the Greek and special characters. Use the word processing formatting features to indicate **Bold**, *Italic*, Greek, Maths, ^{Superscript} and _{Subscript} characters. Clearly identify unusual symbols and Greek letters. Differentiate between the letter O and zero, and the letters I and l and the number 1. Mark the approximate position of each figure and table.

Check the final copy of your paper carefully, as any spelling mistakes and errors may be translated into the typeset version.

Abstract

The second page of every manuscript must contain only the Abstract, which should be a single paragraph not exceeding 300 words. Please abide strictly by this limitation of length. Published papers will only have the first 300 words of their abstracts incorporated into Medline, text in excess of this limit will be lost. The Abstract should be comprehensible to readers before they have read the paper, and abbreviations and reference citations should be avoided.

Funding

Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled 'Funding'. This should appear before the 'Acknowledgements' section.

The following rules should be followed:

- The sentence should begin: 'This work was supported by ...'

- The full official funding agency name should be given, i.e. 'the National Cancer Institute at the National Institutes of Health' or simply 'National Institutes of Health' not 'NCI' (one of the 27 substitutions) or 'NCI at NIH' ([full RfN-approved list of UK funding agencies](#)). Grant numbers should be given in brackets as follows: '[grant number xxxx]'.
- Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: '[grant numbers xxxx, yyyy]'.
- Agencies should be separated by a semi-colon (plus 'and' before the last funding agency).
- Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number 'to [author initials]'.

An example is given here: 'This work was supported by the National Institutes of Health [AA123456 to C.S., BB765432 to M.H.]; and the Alcohol & Education Research Council [hfyg667789]'.

Oxford Journals will deposit all NIH-funded articles in PubMed Central. See [Depositing articles in repositories – information for authors](#) for details. Authors must ensure that manuscripts are clearly indicated as NIH-funded using the guidelines above.

Acknowledgements

These should be included at the end of the text and not in footnotes. Personal acknowledgements should precede those of institutions or agencies.

References

Authors are responsible for the accuracy of the references. Published articles and those in press (state the journal which has accepted them) may be included. In the text, references should be cited, in order of appearance, as a number in brackets, e.g. (1). These should be on the line, do not use superscript. At the end of the manuscript the citations should be listed numerically. References should include, in the following order: all authors' names (with surnames and initials inverted), year, paper title in full, journal title, volume number and inclusive page numbers. If a book, the name and address of the publisher should be given. The name of the journal should be abbreviated according to the *World List of Scientific Periodicals* and underlined to indicate italics.

References should therefore be listed as follows:

1. Hartley-Asp, B. and Hyldig-Nielsen, F. (1984) Comparative genotoxicity of nitrogen mustard and nor-nitrogen mustard. *Carcinogenesis*, **5**, 1637-1640.
2. Kirk, J.T.O. and Tilney-Bassett, R.A.E. (1978) *The Plastids. Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*, 2nd revised edn. Elsevier/North Holland, New York.
3. Warren, W. (1984) The analysis of alkylated DNA by high pressure liquid chromatography. In Venitt, S. and Parry, J.M. (eds), *Mutagenicity Testing - a Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 25-44.

Personal communication (J.Smith, personal communication) should be authorized by those involved, in writing, and unpublished data should be cited as (unpublished data). Both should be used as sparingly as possible and only when the unpublished data referred to is peripheral rather than central to the discussion. References to manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (B.Smith and N.Jones, in preparation) and should NOT be included in the list of references.

Tables

Tables should be typed on separate sheets, and numbered consecutively with Roman numerals. Tables should be self-explanatory and include a brief descriptive title. Footnotes to tables indicated by lower case letters are acceptable, but they should not include extensive experimental detail. An arrow in the text margin should be used to indicate where a table should be inserted in the text.

Illustrations

All illustrations (line drawings and photographs) should be referred to in the text as Figure 1 etc., which should be abbreviated to 'Fig. 1.' only in the figure legend. Figures must be prepared at publication quality resolution, using applications capable of generating high-resolution TIFF files of at least 300 pixels per inch at the final printed size for colour figures and photographs, and 1200 pixels per inch for black and white line drawings. Although some other formats can be translated into TIFF format by the publisher, the conversion may alter the tones, resolution and contrast of the image. Digital colour art should be submitted in CMYK rather than RGB format, as the printing process requires colours to be separated into CMYK and this conversion can alter the intensity and brightness of colours. Therefore authors should be satisfied with the colours in CMYK (both on screen and when printed) before submission. Please also keep in mind that colours can appear differently on different screens and printers. Failure to follow these guides could result in complications and delays.

Photographs. These must be submitted in the desired final size so that reduction can be avoided. The type area of a page is 248 x 185 mm (width) and photographs, including their legends, must not exceed this area. A single column is 88 mm wide. A double column is 185 mm wide. Ideally, photographs should fit either a single column or a double column. Photographs should be of sufficiently high quality with respect to detail, contrast and fineness of grain to withstand the inevitable loss of contrast and detail inherent in the printing process. Please indicate the magnification by a rule on the photographs.

Colour figures. There is a special charge for the inclusion of colour figures. The cost is £350 per figure. Orders from UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the EU, we will assume that the service is provided for business purposes, please provide a VAT number for yourself or your institution and ensure you account for your own local VAT correctly.

Line drawings. Please provide these as clear, sharp prints, suitable for reproduction as submitted. No additional artwork, redrawing or typesetting is done. Therefore, all labelling should be on the original drawing. Ensure that the size of lettering is in proportion with the overall dimensions of the drawing. Ideally, line drawings should be submitted in the desired final size to avoid reduction (maximum dimensions 248 x 185 mm including legends) and should fit either a single (88 mm) or a double column width (185 mm). If submitting line drawings which require reduction, please check that the lettering will be clearly legible after the drawing has been reduced to the size at which it will be printed. After reduction, letters should not be smaller than 1.5 mm in height.

Figure legends. These should be on a separate, numbered manuscript sheet. Define all symbols and abbreviations used in the figure. Common abbreviations and others in the preceding text should not be redefined in the legend.

Conventions

In general, the journal follows the conventions of the *CBE Style Manual* (Council of Biology Editors, Bethesda, MD, 1983, 5th edn).

Follow *Chemical Abstracts* and its indexes for chemical names. For guidance in the use of biochemical terminology follow the recommendations issued by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, as given in *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, published by the Biochemical Society, UK. For enzymes, use the recommended name assigned by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1978, as given in *Enzyme Nomenclature*, published by Academic Press, New York, 1980. Where possible, use the recommended SI (Système International) units.

Genotypes should be italicized; phenotypes should not be italicized. For bacterial genetics nomenclature follow Demerec *et al.* (1966) *Genetics*, **54**, 61-76.

Abbreviations

Try to restrict the use of abbreviations to SI symbols and those recommended by the IUPAC. Abbreviations should be defined in brackets after their first mention in the text. Standard units of measurements and chemical symbols of elements may be used without definition in the body of the paper.

LANGUAGE EDITING

Particularly if English is not your first language, before submitting your manuscript you may wish to have it edited for language. This is not a mandatory step, but may help to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication. If you would like information about one such service please click [here](#). There are other specialist language editing companies that offer similar services and you can also use any of these. Authors are liable for all costs associated with such services.

OFFPRINTS

The publishers supply the URL upon electronic publication. Offprints can be purchased using the Oxford Journals Author Services site.

AUTHOR SELF-ARCHIVING/PUBLIC ACCESS POLICY

For information about this journal's policy, please visit our [Author Self-Archiving policy page](#).

Online ISSN 1464-3804 - Print ISSN 0267-8357

Copyright © 2012 United Kingdom Environmental Mutagen Society

OXFORD
UNIVERSITY PRESS

[Site Map](#) [Privacy Policy](#) [Frequently Asked Questions](#)