UNIVERSIDADE DE SOROCABA PRÓ-REITORIA ACADÊMICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Edson Hideaki Yoshida

SEGURANÇA DE FITOQUÍMICOS ISOLADOS DE *Dipteryx alata* VOGEL SOB O PARÂMETRO DA MUTAGENICIDADE PELO TESTE DE AMES

Sorocaba/SP 2014

Edson Hideaki Yoshida

SEGURANÇA DE FITOQUÍMICOS ISOLADOS DE *Dipteryx alata* VOGEL SOB O PARÂMETRO DA MUTAGENICIDADE PELO TESTE DE AMES

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

Sorocaba/SP 2014

Ficha Catalográfica

Yoshida, Edson Hideaki
Segurança de fitoquímicos isolados de Dipteryx alata Vogel sobre o parâmetro da mutagenicidade pelo teste de Ames / Edson Hideaki Yoshida. – 2014. 75 f. : il.
Orientador: Prof^a Dr^a. Yoko Oshima Franco Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2014.
1. Plantas medicinais. 2. Fitoquímicos. 3. Neurofarmacologia. I. Franco, Yoko Oshima, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Edson Hideaki Yoshida

SEGURANÇA DE FITOQUÍMICOS ISOLADOS DE *Dipteryx alata* VOGEL SOB O PARÂMETRO DA MUTAGENICIDADE PELO TESTE DE AMES

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: 31/07/2014

BANCA EXAMINADORA:

Ass.:___

Pres.: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco Universidade de Sorocaba – UNISO

Ass.:_____

1ª Exam.: Profa. Dra. Denise Grotto Universidade de Sorocaba – UNISO

Ass.:___

2ª Exam.: Profa. Dra. Bertha Devora Agurto Berdejo de Castro Universidade de Sorocaba – UNISO

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha família, minha esposa Valquiria Miwa Hanai Yoshida pela inspiração e pelo apoio incondicional, aos meus filhos Tárik Hanai Yoshida, Renê Hanai Yoshida e Ian Hanai Yoshida (in memoriam). É a existência destas pessoas maravilhosas, espíritos de Luz em minha vida, que me motivou e trouxe até onde estou hoje.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos especiais à orientação da Profa. Dra. Yoko Oshima Franco que contribuiu e continua a contribuir na minha formação acadêmica e científica, além do apoio e ajuda sábia que me surpreende e encanta no caminhar do mestrado.

RESUMO

O uso de plantas medicinais tem sido um complemento e/ou uma prática alternativa de substituição para terapias convencionais. Estudos anteriores demonstraram que o extrato hidroalcoólico liofilizado da casca de Dipteryx alata Vogel antagoniza o bloqueio neuromuscular in vitro causado pelo veneno de Bothrops jararacussu em preparações nervo frênico-diafragma de camundongos e não apresenta mutagenicidade para as quatro linhagens de Salmonella typhimurium com ou sem ativação metabólica no teste de Ames. O fracionamento de liofilizado hidroalcoólico da D. alata Vogel por partição líquido-líquido com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, realizado por nossa equipe de pesquisa, isolou da sub fração diclorometano, dezoito estruturas químicas elucidadas com base em dados espectroscópicos, incluindo espectroscopia de massa de alta resolução e ressonância nuclear magnética. A investigação de mutagenicidade, através de métodos de análise reconhecidos e regulamentados, auxilia a elucidar os efeitos mutagênicos de grande preocupação da saúde humana. Este trabalho teve como objetivo ampliar a investigação de mutagenicidade da D. alata Vogel, através do teste de Ames, avaliando a atividade de três ácidos fenólicos e uma isoflavona, entre os dezoito isolados. Foi selecionado o método de Salmonella/microssomas (Teste de Ames) aplicado as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102. Os resultados são apresentados na forma de artigos científicos. Os ensaios de mutagenicidade mostraram que nenhuns dos três compostos fenólicos induziram qualquer aumento no número de colônias revertentes em comparação com o grupo de controle negativo, indicando a ausência de qualquer atividade mutagênica e a avaliação preliminar de mutagenicidade da isoflavona também indicou ausência de indução mutagênica. A ausência de atividade mutagênica por estes compostos nas linhagens de S. typhimurium no teste de Ames é um passo positivo no sentido de determinar o seu uso seguro em medicina. Considerando as propriedades biológicas destes compostos, a falta de efeito mutagênico em sistemas bacterianos é altamente relevante. Estes resultados podem estimular pesquisas para medicamentos que utilizam esses fitoquímicos seguros para o tratamento de várias condições patológicas.

Palavras-chave: Ácido protocatecuico. Ácido vanílico. *Dipteryx alata* Vogel. *Salmonella typhimurium*. Teste de Ames. Vanilina.

ABSTRACT

The use of medicinal plants has been a practical alternative, adjunct and /or substitute, to conventional therapies. Previous studies demonstrated that lyophilized hydroalcoholic bark extract of Dipteryx alata Vogel antagonized the in vitro neuromuscular blockade caused by Bothrops jararacussu in phrenic nerve-diaphragm preparations from mice and shows mutagenicity for the four strains of Salmonella typhimurium with or without metabolic activation in the Ames test. Fractionation of lyophilized hydroalcoholic of D. alata Vogel by liquid-liquid partition with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol, conducted by our research team, isolated from dichloromethane sub-fraction, eighteen chemical structures elucidated on the basis of spectroscopic data, including mass spectroscopy of highresolution and nuclear magnetic resonance. Investigation of mutagenicity by recognized methods and regulated analysis helps to elucidate the mutagenic effects of great concern for human health. This study aimed to further investigate the mutagenicity of D. alata Vogel, through the Ames test, evaluating the activity of three phenolic acids and isoflavones, among eighteen isolates. The method of Salmonella/microsome (Ames test) applied the TA97, TA98, TA100 and TA102 strains were selected. The results are presented as papers. The mutagenicity assays showed that none of the three phenolic compounds induce any increase in the number of revertant colonies compared with the negative control group, indicating the absence of any mutagenic activity and preliminary assessment of mutagenicity of isoflavone also indicated the absence of mutagenic induction. The absence of mutagenic activity by these compounds in strains of S. typhimurium in the Ames test is a positive step towards determining their safe use in medicine. Considering the biological properties of these compounds lack of mutagenic effect in bacterial systems is highly relevant. These results may encourage research for drug using these phytochemicals safe for the treatment of various pathological conditions.

Keywords: Ames test. *Dipteryx alata*. Vogel. Protocatechuic acid. *Salmonella typhimurium*. Vanillic acid. Vanillin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A, C, G, T Bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina e timina)
- AFB1- Aflatoxina B1
- AMG Ágar mínimo glicosado
- ATCC American Type Culture Colection
- AZS Azida sódica
- 2-AA 2-aminoantraceno
- 2-AF 2-aminofluoreno
- 2-AP 2-amino-purina
- 5-BU 5-bromouracil
- B[a]P Benzo[a]pireno
- EC50 Concentração efetiva mediana
- EMS Etilmetanossulfato
- EP Efeito proliferativo
- EPA Associação de Proteção Ambiental (Environmental Protection Association)
- HRMS Espectroscopia de massa de alta resolução
- His Histidina
- IM Índice de mutagenicidade
- MeOH Metanol
- Met Metionina
- MMC Mitomicina C
- NG Nitrosoguanidina
- NCCLS Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards
- NMR Ressonância nuclear magnética
- NPD 4-nitro-o-fenilenodiamina
- S9 Fração microssomal de fígado de ratos tratados com Aroclor 1254
- TA97a, TA98, TA100 e TA102 Linhagens de Salmonella typhimurium
- Ura Uracila

LISTA DE TABELA

| Tabela 1 - Características das linhagens de S. typhimurium. | 25 |
|---|----|
| Tabela 2 - Taxa de reversão espontânea por placa. | |

LISTA DE FIGURAS

| Figura 1 - Estrutura química dos componentes 1-18 | 14 |
|--|----|
| Figura 2 - Estrutura química dos ácidos fenólicos. | 15 |
| Figura 3 - Estrutura química dos flavonoides. | 16 |
| Figura 4 - Estrutura química da 7,8,3'-trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona | 17 |
| Figura 5 – Esquema do Teste de Ames. Método de incorporação em placas | 22 |
| Figura 6 – Controles negativo e positivo da linhagem TA98 | 32 |

| 1 | INTRODUÇÃO | 11 | | | |
|-------|--|----|--|--|--|
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | | | | |
| 2.1 | Dipteryx alata Vogel | | | | |
| 2.2 | Mutagenicidade | | | | |
| 2.3 | Teste de Ames (teste salmonella/microssoma) | | | | |
| 3 | OBJETIVOS | | | | |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | | | | |
| 4.1 | Fitoquímicos do extrato da Dypteryx alata Vogel | 27 | | | |
| 4.2 | Teste de Ames | 27 | | | |
| 4.2. | Linhagens de Salmonella typhimurium | 27 | | | |
| 4.2.2 | 2 Verificação das características genéticas das linhagens de <i>S. typhimurium</i> | 27 | | | |
| 4.2.3 | 3 Manutenção e estoque das linhagens de <i>S. typhimurium</i> | 29 | | | |
| 4.2.4 | Preparo dos inóculos de <i>S. typhimurium</i> | 29 | | | |
| 4.2. | 5 Meio de cultura e soluções | 29 | | | |
| 4.2.0 | 5 Mistura S9 | 31 | | | |
| 4.2.7 | 7 Controles negativos e positivos | 32 | | | |
| 4.3 | Protocolo de ensaio | 33 | | | |
| 4.3. | l Teste de incorporação em placas | 33 | | | |
| 4.3.2 | 2 Método de pré-incubação | 34 | | | |
| 4.3.3 | 3 Teste de toxicidade | 35 | | | |
| 4.3.4 | 4 Análise dos resultados | 35 | | | |
| 5 | RESULTADOS | 37 | | | |
| 5.1 | Artigo 1 | | | | |
| 5.2 | 2 Artigo 2 | | | | |
| 6 | CONCLUSÃO72 | | | | |

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

O Bioma Cerrado exibe uma área de aproximadamente 203 milhões de hectares segundo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) de 2004, ocupando a porção central do Brasil (IBAMA, 2011). Sendo considerado o segundo bioma da América do Sul, ocupando 25% do território brasileiro. Quanto a diversidade biológica, o Cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica do mundo que abriga nos diversos ecossistemas uma flora com mais de 11.000 espécies de plantas nativas (MENDONÇA et al., 2008), das quais 4.400 espécies são endêmicas (MYERS et al., 2000).

Depois da Mata Atlântica, o Cerrado é o bioma brasileiro que mais sofreu alterações com a ocupação humana. Com a crescente pressão para a abertura de novas áreas, visando incrementar a produção de carne e grãos para exportação, tem havido um progressivo esgotamento dos recursos naturais da região. Em termos históricos, o bioma Cerrado teve uma área suprimida de 47,8% até o ano de 2008 (IBAMA, 2008-2009).

Os estudos que ampliem o conhecimento das espécies do Cerrado podem ajudar na preservação do Bioma, tanto na disponibilização de alternativas de renda pela utilização dos recursos naturais disponíveis, quanto através do manejo econômico sustentável das áreas de Cerrado (VERA et al., 2009).

Segundo Varanda (2006),

O homem moderno está exposto no seu dia-a-dia a inumerável quantidade de substâncias químicas sintéticas ou de origem natural. Não há dúvidas de que muitos destes compostos são essenciais para o conforto e a segurança do ser humano, como por exemplo, os medicamentos, os corantes, conservantes, cosméticos, inseticidas, desinfetantes e muitos outros. Por outro lado, muitos destes produtos podem causar grandes transtornos à sociedade como poluentes do ar, água e solo. Além disso, cresce o número de evidências acerca da associação entre a exposição a determinados agentes químicos e uma série de doenças e alterações metabólicas prejudiciais à saúde humana.

É bem documentado que mutações gênicas atuam em etapas do processo de carcinogênese e que ensaios que detectam componentes genotóxicos permitem identificar substâncias com risco potencial aos seres humanos (VARANDA, 2006). Substâncias genotóxicas têm em comuns propriedades químicas e físicas que permitem suas interações com os ácidos nucleicos. Devido à sua reatividade, podem levar a defeitos hereditários através de mutações em células germinativas, e quando a mutação ocorre em células somáticas, a consequência mais comum é a formação de tumores benignos ou malignos. Além disso, recentemente foi proposto que as mutações em células somáticas podem também estar

envolvidas na patogênese de algumas doenças crônico-degenerativas tais como as cardiovasculares, neurodegenerativas em adição ao processo de carcinogênese (ANDREASSI et al., 2000; ROSS; MARGOLIS, 2005).

As plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituíram modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas. No Brasil, há cerca de 100.000 espécies vegetais catalogadas, mas somente 8 % foram estudadas quanto à sua química, e estima-se que apenas 1.100 espécies tenham sido avaliadas quanto às suas propriedades terapêuticas (SIMÕES, 2000).

Devido à necessidade da descoberta de novas drogas incentivadas pelo surgimento de novas doenças e o aparecimento de microrganismos multirresistentes, vários estudos de caracterização biológica e pesquisa sobre os efeitos têm sido intensificados com os princípios ativos de plantas (VARANDA, 2006).

Compostos com atividades biológicas continuam sendo reconhecidos, entretanto, muitos deles ainda não podem ser utilizados na terapêutica devido às suas propriedades tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas (MARON; AMES, 1983).

O estudo das plantas medicinais tradicionalmente utilizadas é válido em dois aspectos: primeiramente, como uma pesquisa de drogas com potencial quimioterapêutico, e em segundo, como medida de segurança para o uso popular (VARANDA, 2006).

Para a avaliação da atividade mutagênica existem diversos ensaios, contudo, destacam-se os estudos nos quais foram usados os ensaios de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium (Salmonella/*microssoma). Várias substâncias mutagênicas primeiramente identificadas pelo Teste de Ames mostraram-se carcinogênicas em ensaios com animais (MARON; AMES, 1983).

Há uma crença geral de que os remédios de ervas são seguros porque são naturais (ESTEVES-PEDRO et al., 2012). Por outro lado, muitos produtos derivados de plantas de uso popular e tidos como medicinais podem apresentar efeitos nocivos como efeitos genotóxicos e o uso destas deveria ser feito com mais critério (VARANDA, 2006). Foi anteriormente realizado pela primeira vez pela equipe de pesquisa o teste para avaliar a segurança *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroalcoólico de *D. alata* Vogel utilizando o teste de Ames, sendo obtidos resultados que demonstraram que o extrato não apresentaram efeitos mutagênicos (ESTEVES-PEDRO et al., 2012).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dipteryx alata Vogel

A *D. alata* Vogel pertence à família *Leguminosae-Papilionoideae*, e é uma espécie nativa do cerrado brasileiro, encontrada principalmente em Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso. Esta espécie é conhecida popularmente como "baru" em Minas Gerais, "barujo" e "combaru" em Mato Grosso, e "cumaru" em outros estados. A planta tem grande potencial econômico por causa de seus usos múltiplos (SANO; BRITO; RIBEIRO, 2006).

O barueiro é uma árvore com intensa frutificação na fase adulta (CZEDER et al., 2012; SANO; BRITO; RIBEIRO, 2006), sendo os frutos do tipo drupa, ovoides, levemente achatados e de coloração marrom, com uma única semente (amêndoa) comestível e comercializada em empórios nos grandes centros, bastante apreciada pela população local. O fruto é rico em proteínas, fibras e ácidos graxos insaturados, é usado como alimento humano e animal, bem como em formulações cosméticas (FERNANDES et al., 2010; TAKEMOTO et al., 2001; VERA et al., 2009). Tradicionalmente, os habitantes locais usam o óleo extraído das amêndoas para tratar febres altas, e também para os acidentes ofídicos (PUEBLA et al., 2010).

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças, ou para amenizar os efeitos causados por envenenamento em acidentes com abelhas, vespas, escorpiões, anêmonas do mar e serpentes tem sido um complemento e / ou uma prática alternativa para terapias convencionais (MIRSHAFIEY, 2007). Estudos anteriores demonstraram que o extrato hidroalcoólico da casca de *D. alata* Vogel antagonizou o bloqueio neuromuscular *in vitro* causado pelo veneno de *Bothrops jararacussu* em preparações nervo frênico-diafragma de camundongos (NAZATO et al., 2010).

Posteriormente, o fracionamento por partição do extrato hidroalcoólico da *D. alata* Vogel utilizando solventes de diferentes polaridades, hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol resultaram no isolamento de 18 constituintes (Figura 1) sendo; quatro lupano tipo triterpenóides: lupeol (1), lupenona (2), 28-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (3), betulina (4); nove isoflavonóides: 8-O-metilretusin (5), 7-hidroxi-5,6,4'-trimethoxiisoflavona (6), afrormosin (8), 7-hidroxi-8,3',4'-trimethoxiisoflavona (9), 7,3'-dihidroxi-8,4'-dimetoxiisoflavona (10), odoratin (11), 7,8,3'-trihidroxi-4'-metoxisoflavona (13), 7,8,3'-trihidroxi-6,4'dimetoxisoflavona (15), dipteryxin (17); uma chalcona: isoliquiritigenina (7); uma aurona: sulfuretin (14) e três compostos fenólicos; ácido vanílico (12), vanilina (16), e ácido protocatecuico (18). As suas estruturas químicas foram elucidadas com base em dados espectroscópicos, incluindo Espectroscopia de massa de alta resolução (HRMS) e técnicas de Ressonância nuclear magnética (1D e 2D-NMR) descritos por (PUEBLA et al., 2010).



Figura 1 - Estrutura química dos componentes 1-18.

Fonte: PUEBLA, P. et al. Chemical Constituents of the Bark of Dipteryx alata Vogel an Active Species against Bothrops jararacussu Venom. **Molecules**, v. 15, p. 8193-8204, 2010.

Quanto aos compostos fenólicos naturais, estes possuem um anel aromático tendo um ou mais substituintes hidroxila ou eterificados e são conhecidos por sua capacidade de complexar proteínas por ligações de hidrogênio. Entre eles, compostos como o ácido protocatecuico e o ácido vanílico são universais entre as angiospermas (HARBORNE, 1998); e a vanilina aldeído, têm estruturas relacionadas (Figura 2), justificando, assim, a semelhança na sua atividade biológica (LEE; MONNAPPA; MITCHELL, 2012).

Dos 18 compostos isolados, o ácido protocatecuico, o ácido vanílico e a vanilina foram os compostos fenólicos escolhidos para avaliar a toxicidade e mutagenicidade pelos resultados em inibir o bloqueio induzido pelo veneno de Bothrops jararacussu (PUEBLA et al., 2010).

Figura 2 - Estrutura química dos ácidos fenólicos.



(ácido protocatecuico)

(ácido vanílico)

(vanilina)

A atividade biológica dos compostos fenólicos tem sido caracterizada e revelou o seu potencial para atuar em sistemas vivos como antioxidantes (KAGAN; TYURINOV, 1998) e como quelantes de metais (BRUNE; ROSSANDER; HALLBERG, 1989). Estas atividades biológicas explicam seu interesse na bio-prospecção para as aplicações nas áreas de medicamentos, alimentos nutricionais, indústria farmacêutica e cosmética, síntese química e também na área ambiental. Neste último, plantas já foram desmatadas causando um grande impacto ambiental. Daí, a exploração de plantas medicinais pode ser importante às pessoas, favorecendo o uso sustentável.

Um dos interesses medicinais dos compostos isolados do baru é o uso como antiofídico (PUEBLA et al., 2010), principalmente contra picadas de cobra da serpente Bothrops jararacussu, devido ao alto nível de dor, inflamação, hemorragia e mionecrose causada por enzimas e peptídeos no veneno como proteases/fosfolipases/trombina (MILANI JÚNIOR et al., 1997). Assim, estratégias com o objetivo de minimizar os efeitos no local da mordida também iriam minimizar as sequelas indesejadas, como a amputação de um membro.

Quanto aos flavonoides, esta é provavelmente a maior classe de metabólitos secundários vegetais e apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo frequentemente atividade mutagênica e, com menos frequência, atividade antimutagênica (MOREIRA et al., 2002).

Os flavonoides apresentam baixo peso molecular e são metabólitos secundários de plantas com mais de 9.000 variantes estruturais conhecidos. A diversidade de tamanho, forma tridimensional e as propriedades físicas e bioquímicas dos flavonoides lhes permitem interagir com alvos numa variedade de localizações intracelulares, para influenciar a atividade biológica, em plantas, animais e microrganismos.

Os flavonoides apresentam o esqueleto molecular (Figura 3) que consistem em dois anéis aromáticos fundidos de carbono que constituem o benzopirano (A e C), e um anel de benzeno (B). Estes compostos podem ser divididos em vários subgrupos com base no grau de oxidação do anel C, a hidroxilação na estrutura do anel e o substituinte na posição 3, incluindo calconas, flavonas, flavonóis, antocianinas e isoflavonas (RESENDE et al., 2012)

Figura 3 - Estrutura química dos flavonoides.



Fonte: RESENDE, F. A. et al. Mutagenicity of Flavonoids Assayed by Bacterial Reverse Mutation (Ames) Test. **Molecules**, v. 17, p. 5255-5268, 2012.

Tem sido referidos que muitos flavonoides apresentam capacidade mutagênica em diversas linhagens de *Salmonella typhimurium* no teste de Ames e citotoxicidade em sistemas que utilizam células de mamíferos (BOERSMA et al., 2000). Alguns flavonoides testados como a quercetina, a luteolina, a fisetina e a crisina demonstraram atividade mutagênica no Teste de Ames (RESENDE, VILEGAS, et al., 2012).

Na avaliação da atividade antimicrobiana de flavonoides, os resultados de atividades são conflitantes, provavelmente devido a diferentes características da estrutura química (CUSHNIE e LAMB, 2005).

Entre os 18 compostos isolados, a isoflavona; 7,8,3'-trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona (Figura 4), foi escolhida para investigação quanto a toxicidade e a mutagenicidade preliminar pelos resultados apresentados em inibir o bloqueio induzido pelo veneno de *Bothrops jararacussu* (PUEBLA et al, 2010).

Figura 4 - Estrutura química da 7,8,3'-trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona.



Fonte: PUEBLA, P. et al. Chemical Constituents of the Bark of Dipteryx alata Vogel an Active Species against Bothrops jararacussu Venom. **Molecules**, v. 15, p. 8193-8204, 2010.

2.2 Mutagenicidade

Provavelmente a propriedade mais acentuada dos organismos seja sua capacidade de se reproduzir por incontáveis gerações com fidelidade quase perfeita. Esta sequência de traços herdados implica em constância, ao longo de milhões de anos, na estrutura das moléculas que contem a informação genética. Poucos registros históricos de civilizações sobreviveram por mil anos mesmo quando riscados em superfícies de cobre ou talhados em pedra. Entretanto, existem boas evidências de que as instruções genéticas permaneceram praticamente intactas nos organismos vivos por períodos muito maiores; muitas bactérias possuem praticamente o mesmo tamanho, forma e estrutura interna, possuindo também o mesmo tipo de moléculas precursoras e enzimas de cerca de quatro bilhões de anos atrás. Esta ininterrupção da estrutura e da composição é o resultado da continuidade da estrutura do material genético. A perpetuação de uma espécie biológica requer que sua informação genética seja mantida de modo estável, expressa com exatidão na forma de produtos dos genes e reproduzida com o mínimo de erros (NELSON; COX, 2011).

O DNA ocupa uma posição única e central entre as macromoléculas biológicas. As sequências de nucleotídeos do DNA codificam a estrutura primária de todos os RNAs e proteínas celulares e, por meio das enzimas, afeta indiretamente a síntese de todos os outros constituintes celulares. O DNA é um mecanismo maravilhoso para o armazenamento estável da informação genética, contudo a expressão "armazenamento estável" indica um enganoso quadro estático. Essa expressão falha em capturar a complexidade dos processos pelos quais a informação genética é preservada em um estado incorruptível para, então, ser transmitida de uma geração de células à seguinte (NELSON; COX, 2011).

A continuidade do material genético de geração para geração depende da manutenção das taxas de mutação em níveis mínimos. As taxas de mutação elevadas na linhagem germinativa destruiriam a espécie, e as taxas de mutação elevada na linhagem somática destruiriam o indivíduo. As células vivas dependem do funcionamento correto de milhares de genes, e cada um deles pode ser lesado por uma mutação nos diversos sítios da sequência que codifica as suas proteínas, ou nas regiões de íntrons que promovem sua expressão ou o processamento de seu RNA mensageiro. Células especializadas do organismo adulto não poderão realizar suas funções se as taxas de mutação na linhagem somática forem elevadas. O câncer surge em células que perderam a capacidade de crescimento e divisão controlada em consequência de lesões nos genes que controlam o ciclo celular. Se as taxas de mutação nas células somáticas forem elevadas, a incidência de câncer será insustentável (WATSON et al., 2006).

Dois processos importantes são responsáveis pela variação genética: mutação e recombinação. A mutação é uma mudança na sequencia de DNA de um gene. O termo mutação cobre uma ampla gama de tipos diferentes de mudanças que variam de uma simples troca de um par de bases por outro, eventos que ocorrem dentro de genes individuais denominados mutações gênicas até o desaparecimento de um cromossomo inteiro denominado mutação cromossômica. A recombinação é o resultado de processos celulares que fazem com que alelos de genes diferentes se agrupem em novas combinações (GRIFFITHS et al., 2008).

As mutações incluem praticamente todas as alterações concebíveis na sequência de DNA. As mutações mais simples são as substituições de uma base por outra. Existem dois tipos: as **transições**, que são substituições de uma pirimidina por outra pirimidina ou de uma purina por outra, como T por C e A por G; e as **transversões**, que são substituições de uma pirimidina por uma purina ou uma purina por uma pirimidina, como T por G ou A e A por C ou T. Outras mutações simples são as inserções ou deleções de um nucleotídeo ou de um número reduzido de nucleotídeos. As mutações que alteram um único nucleotídeo são chamadas de **mutações de ponto, ou pontuais**. Outros tipos de mutações provocam alterações mais drásticas no DNA, como as **inserções** ou **deleções** longas de pares de nucleotídeos e os rearranjos grosseiros na estrutura do cromossomo. A taxa geral na qual as novas mutações surgem de forma espontânea em um determinado sítio do cromossomo varia de 10^{-6} a 10^{-11} por ciclo de replicação do DNA. Alguns sítios do cromossomo são pontos preferenciais de mutações ou "sítios quentes" (*hotspots*), nos quais as mutações aparecem em uma frequência elevada (WATSON *et al.*, 2006).

Nas linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizado neste trabalho existem sequências de bases nitrogenadas que direcionam as mutações para determinados pontos do DNA, os denominados *hot spots* (MARON; AMES, 1983). A adição ou deleção de um único par de bases de DNA muda a matriz de leitura do restante do processo de tradução, a partir do sítio

da mutação do par de bases até o próximo códon de fim na nova matriz de leitura. Assim essas lesões são chamadas de mudanças de matriz de leitura produzida pelo deslocamento do quadro de leitura (GRIFFITHS et al., 2008). O teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* utilizado neste trabalho, detecta mutações de ponto.

As mutações gênicas podem surgir espontaneamente ou ser induzidas. As mutações espontâneas são mutações de ocorrência natural e surgem em todas as células. As mutações induzidas surgem pela ação de alguns agentes, chamados mutágenos, que aumentam a taxa com a qual as mutações ocorrem (GRIFFITHS et al., 2008).

Segundo Griffiths e colaboradores (2008) os mutágenos induzem mutações por pelo menos três mecanismos diferentes. Eles podem substituir uma base no DNA, alterar uma base de modo que ela faça um pareamento especificamente errado com outra base, ou danificar uma base de modo que ela não possa mais parear em qualquer base sob condições normais.

• Incorporação de análogos de bases

Alguns compostos químicos são suficientemente similares às bases nitrogenadas normais do DNA de modo que sejam ocasionalmente incorporadas ao DNA em lugar das bases normais; tais compostos são chamados de **análogos de bases.** Após estarem no lugar, esses análogos tem propriedades de pareamento diferentes das bases normais; assim, podem produzir mutações fazendo com que nucleotídeos incorretos sejam inseridos em oposição a eles na replicação. Por exemplo, 5-bromouracil (5-BU) é um análogo de timina que tem um bromo na posição carbono-5 em lugar do grupo CH₃ encontrado na timina. Outro análogo é 2-amino-purina (2-AP). Esse análogo de adenina pode parear com timina.

• Mau pareamento específico

Alguns mutágenos não são incorporados no DNA, alterando uma base de tal modo que se forma um mau pareamento específico. Alguns agentes alquilantes, tais como o etilmetanossulfato (EMS) e a nitrosoguanidina (NG), operam por essa via adicionando grupos alquila (um grupo etila em EMS e um grupo metila em NG) para muitas posições em todas as quatro bases.

• Agentes intercalares

Os **agentes intercalares** incluem os corantes acridina tais como a proflavina, acridina laranja e uma classe de substâncias que são compostos de acridina com várias cadeias laterais, frequentemente de agentes alquilantes (GARDNER; SNUSTAD, 1987), esses agentes são moléculas planares que mimetizam pares de bases e são capazes de inserir-se (intercalar-se) entre bases nitrogenadas empilhadas no cerne da dupla hélice do DNA. Nessa posição

intercalada, tal agente pode causar uma inserção ou deleção de um único par de nucleotídeos resultando em mudanças no quadro de leitura.

Danos a bases

Um grande número de mutágenos danifica uma ou mais bases, e, assim, não é possível um pareamento específico de bases. O resultado é um bloqueio de replicação, porque a síntese de DNA não ocorrerá além de uma base que não possa especificar seu parceiro complementar por pontes de hidrogênio. A luz UV geralmente causa danos a bases nucleotídicas gerando tipos distintos de alterações no DNA, chamados de fotoprodutos (GRIFFITHS et al., 2008).

Os diversos agentes tóxicos são classificados dependendo do tipo de influência sobre os organismos. Os compostos genotóxicos lesam o genoma. Os agentes mutagênicos induzem a fixação de uma mutação estável no DNA, que pode ser transmitido, e carcinogênico os que influem em qualquer etapa do processo de carcinogênese. Compostos genotóxicos e mutagênicos também possuem potencial carcinogênico (BENIGNI; BOSSA, 2008).

Carcinogenicidade e mutagenicidade estão entre os efeitos toxicológicos que causam maior preocupação para a saúde humana, por isso, eles são objetos de intensa atividade de investigação, bem como de reconhecidos métodos de análise de regulamentação (BENIGNI; BOSSA, 2008). Geralmente, os flavonoides são caracterizados como antioxidantes capazes de proporcionar efeitos benéficos à saúde. No entanto, muitos flavonoides também têm sido referidos como sendo mutagênico em diversas estirpes de *Salmonella typhimurium* no teste de Ames, bem como em vários sistemas de células de mamífero utilizadas para avaliar diferentes pontos finais (*end point*) tóxicos (BOERSMA et al., 2000).

2.3 Teste de Ames (teste salmonella/microssoma)

Na década de 1970, Bruce Ames era uma referência para os ambientalistas. Permitiu testar produtos químicos para ver se eles causariam mutações em bactérias e talvez câncer em seres humanos. Sua pesquisa e testemunho levaram à proibição de produtos químicos sintéticos como, por exemplo, o Tris que era um retardador de chama utilizado em pijamas infantis (POSTREL, 1994).

Ames reconheceu que existia uma forte correlação entre a carcinogênese e a mutagênese dos compostos, observando que a medida das taxas de mutação nos sistemas bacterianos seria um modelo efetivo para avaliar a mutagenicidade de compostos como um primeiro nível de detecção de carcinógenos potenciais. Entretanto, ficou claro que nem todos os carcinógenos eram mutagênicos; alguns metabólitos carcinógenos produzidos no corpo são de fato agentes mutagênicos. Tipicamente, esses metabólitos são produzidos no fígado e as

reações enzimáticas que convertem carcinógenos em metabólitos bioativos não ocorrem em bactérias (GRIFFITHS et al., 2008, p. 452).

Os primeiros estudos usando testes relativamente rápidos na detecção de potencial mutagênico, realizados na década de 70, estabeleceram uma forte correlação entre mutagênese e carcinogênese (WATERS; STACK; JACKSON, 1999). Os ensaios que avaliam genotoxicidade em bactérias ainda são bastante utilizados. O teste *Salmonella/Microssoma* fornece uma correlação de 50 a 90 %, dependendo do grupo químico ao qual a substância pertence (ZEIGER, 2001).

O teste de Ames é também conhecido como ensaio *Salmonella/Microssoma* (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Por ser padronizado é amplamente aceito pela comunidade científica e pelas agências e corporações governamentais como a ANVISA, é aceito como um ensaio usado para identificar substâncias puras, em mistura e em amostras ambientais que podem produzir danos genéticos que levam a mutações gênicas. Este teste permite o conhecimento dos mecanismos de interação de mutágenos com o DNA, fornecendo informações sobre a natureza das alterações primárias na molécula, como a mutação induzida (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003)

O teste de Ames é um ensaio de curta duração, que busca identificar substâncias que causem danos genéticos que possam evoluir a mutações (AMES; MCCANN; YAMASAKI, 1975), foi revisado por Mortelmans e Zeiger (2000), sendo o ensaio mais utilizado atualmente para avaliação de mutagenicidade em amostras ambientais e validado em larga escala por diversos laboratórios. No Brasil vem sendo utilizado por órgãos ambientais para avaliação e monitoramento da qualidade das águas (CETESB, 1996-2013).

O teste de Ames (Figura 5) baseia-se na indução de mutações reversas empregando linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas (incapacidade de um organismo de sintetizar um composto orgânico necessário ao seu próprio crescimento) para o aminoácido histidina (*his-*), apresentando diferentes mutações no *operon* deste aminoácido, sendo construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) ou substituição de pares de base no DNA. Essas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, a menos que ocorram novas mutações no local dessas mutações pré-existentes, ou nas proximidades dos genes que restaurem a função do gene e permita as células a sua capacidade de síntese. Essas células recém-mutadas podem crescer na ausência de histidina e formar colônias. Por isso o teste é referido como ensaio de reversão. O número de revertentes é facilmente medido pela contagem de colônias

que crescem em meio mínimo, após a exposição de uma população de células à substância a ser testada (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Figura 5 – Esquema do Teste de Ames. Método de incorporação em placas.



Fonte: UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com Salmonella typhimurium (teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. Canoas: UL, 2003. p. 355.

As linhagens especiais da *S. typhimurium* tem um dos vários alelos mutantes de um gene responsável pela síntese da histidina que foram conhecidos como "reversa" (isto é, retornam ao fenótipo tipo selvagens) apenas com alguns tipos de eventos mutacionais

adicionais. Por exemplo, um alelo chamado TA100 pode ser revertido ao tipo selvagem apenas por mutação de substituição de bases (GRIFFITHS et al., 2008, p. 453).

As linhagens bacterianas não apresentam enzimas de metabolização, o que impossibilita sua capacidade para a identificação de agentes mutagênicos de ação indireta. Para contornar a ausência das enzimas, adicionam-se às culturas, durante os ensaios, a fração S9, que contém enzimas de metabolização de xenobióticos obtidas a partir de fígado de ratos (MARON; AMES, 1983).

O teste é sempre realizado na presença e na ausência de ativação metabólica exógena, realizada *in vitro* com homogeneizado de fígado de ratos. O uso da fração S9 revela se os compostos presentes na amostra necessitam ser metabolizados para se tomarem mutagênicos (mutágenos indiretos), se eles têm ação direta sobre o material genético em sua forma original ou, ainda, se são metabolizados por enzimas bacterianas endógenas (mutágenos diretos) (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

As linhagens possuem mutações para histidina em diferentes genes responsáveis pela biossíntese desse aminoácido. Elas apresentam características genéticas que lhes conferem maior sensibilidade e versatilidade na detecção de diversos tipos de mutágenos, como:

- Mutação *rfa*. Todas as linhagens apresentam a mutação denominada *rfa* que causa perda parcial da barreira de lipopolissacárides da parede bacteriana, facilitando a difusão de moléculas grandes, como as aminas aromáticas, hidrocarbonetos policíclicos, para dentro da célula.
- Deleção *uvrB*. A maioria das linhagens apresenta deleção do gene *uvrB*, um dos responsáveis pelo reparo de excisão, levando a um maior número de lesões reparadas por mecanismos sujeitos a erros, aumentando dessa maneira a sensibilidade das linhagens na detecção de mutágenos.
- Plasmídio *pKM101*. Em algumas linhagens foi introduzido o plasmídio *pKM101*, que contém o gene *mucAB*, responsável pelo aumento do sistema de reparo do tipo *error prone* (passível de erro), e sua presença aumenta, consequentemente, a mutagênese espontânea como a induzida.
- Plasmídio *pAQ1*. Na linhagem TA102 foi introduzido o plasmídio multicópia *pAQ1* que confere resistência à tetraciclina, sendo o marcador de sua presença.

Cada linhagem é mutada de forma diferente no *operon* de histidina, o que permite que tenham especificidade na detecção de um determinado tipo de mutágeno:

- TA98. A linhagem TA98 detecta mutágenos que causam defasagem no quadro de leitura do DNA (*frameshift mutation*), apresentando como ponto preferencial de lesão oito resíduos repetitivos GC no *operon* do gen *his*_{D3052} que codifica para enzima histidinol desidrogenase (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).
- TA100. A linhagem TA100 detecta mutágenos que causam substituição de pares de bases do DNA, através de uma mutação no gene *his_{G46}* que codifica a primeira enzima da biossíntese de histidina. Tem como ponto preferencial para a reversão o par GC, sendo a mutação a substituição de uma prolina por uma leucina (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).
- TA97a. A linhagem TA97a apresenta uma mutação no *operon* do gene da *his*₀₁₂₄₂, detecta mutágenos que causam erro no quadro de leitura do DNA (*frameshift mutation*). A mutação resulta na adição de mais uma citosina formando uma sequência de seis citosinas, que altera o quadro de leitura e consequentemente leva a reversão prototrófico (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).
- TA102. A linhagem TA102 ao contrário das outras linhagens contém pares de bases AT no sítio mutante da *his_{G428}*. Esta mutação foi introduzida no plasmídio multicópia pAQ1, com o objetivo de amplificar o número de sítios ativos. A mutação *his_{G428}* é uma mutação *ochre* (TAA) no gene *hisG*, a qual pode ser revertida por todas as seis possibilidades de trocas de pares de bases (transversão/transição). Esta mutação também é revertida por agentes que causam danos oxidativos. Como o gene *uvrB* não foi deletado, a bactéria é proficiente no sistema de reparo NER, aumentando assim a sua habilidade para detectar agentes indutores de pontes entre as cadeias do DNA (*interstrand DNA cross-linking*) (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

A Tabela 1 resume as características das principais linhagens utilizadas no teste de Ames. O teste de Ames pode ser aplicado na avaliação da genotoxicidade de compostos químicos puros ou misturas, produtos naturais, fluidos corpóreos, ou, ainda, amostras ambientais. O teste de Ames é parte das baterias de ensaios internacionalmente propostas para registro de medicamentos, outras drogas, formulações químicas, incluindo as substâncias ou misturas com ampla utilização na agricultura. Além disso, tem sido muito empregado em estudos para elucidação de mecanismos de mutagênese e antimutagênese e na avaliação de efeitos sinérgicos de misturas de compostos (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

| Cepa | Mutação em His | Plasmídeos | Outras mutações | Tipo de mu | ttação detectável |
|--------|----------------------|---------------------------------|-----------------------------|--------------|--------------------------|
| TA97 | hisD6610 his01242 | <i>pKM</i> 101 | rfa ∆(uvrB chl bio) | Frameshift | Adição de um par G:C |
| TA98 | hisD3052 | <i>pKM</i> 101 | $rfa \Delta(uvrB chl)$ bio) | Frameshift | Deleção de um par G:C |
| TA100 | hisG46 | <i>pKM</i> 101 | $rfa \Delta(uvrB chl)$ bio) | Substituição | G:C para A:T |
| TA102 | pAQ 1 (hisG428) | <i>pKM</i> 101, <i>pAQ</i> 1 | rfa | Substituição | A:T para G:C |
| TA1535 | hisG46 | - | rfa ∆(uvrB chl bio) | Substituição | G:C para A:T |
| TA1537 | hisC3076 | - | rfa ∆(uvrB chl bio) | Frameshift | Adição de um par G:C |
| TA1538 | hisG46 | - | rfa ∆(uvrB chl bio) | Frameshift | Deleção de um par G:C |

Tabela 1 – Características das linhagens de S. typhimurium.

Fonte: UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com Salmonella typhimurium (teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. Canoas: UL, 2003. p. 355.

Para a avaliação da mutagenicidade pelo Teste de Ames; entre os 18 compostos isolados, foram selecionados para os compostos fenólicos, o ácido protocatecuico, o ácido vanílico e a vanilina e para o flavonóide, foi selecionada a isoflavona 7,8,3'-trihidroxi-4'- metoxi-isoflavona para avaliar a mutagenicidade, justificado pelos resultados em inibir o bloqueio neuromuscular induzido pelo veneno de *Bothrops jararacussu* através de preparações nervo frênico-diafragma de camundongos (PUEBLA et al., 2010).

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade mutagênica de quatro compostos fitoquímicos do extrato da *Dypteryx alata* Vogel, sendo uma isoflavona, a 7,8,3'-trihidroxi-4'-metoxisoflavona (composto 13) e três compostos fenólico, o ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico (ácido vanílico) (composto 12), o 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vanilina) (composto 16) e o ácido 3,4-dihidroxibenzóico (ácido protocatecuico) (composto 18); entre os dezoito fitoquímicos isolados em trabalho anterior da nossa equipe de pesquisa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Utilizar o método de *Salmonella/microssoma* (Teste de Ames), em quatro linhagens de *Salmonela typhimurium* TA97a, TA98, TA100 e TA102, para avaliar a atividade mutagênica dos quatro fitoquímicos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fitoquímicos do extrato da Dypteryx alata Vogel

As frações hexano e diclorometano obtido do extrato etanólico de *Dipteryx alata* Vogel foram submetidas a cromatografia, exaustivamente, até obtenção de compostos elucidados (fitoquímicos), na Universidade de Salamanca, resultando em 18 fitoquímicos, destes obtidos foram testados quatro fitoquímicos no ensaio de mutagenicidade pelo Teste de Ames.

Obteve-se pequeno rendimento da isoflavona: 7,8,3'-trihidroxi-4'-metoxi-isoflavona (19 mg) e não tendo disponível o fitoquímico comercial, foi realizada a análise de mutagenicidade preliminar no testes de Ames com a quantidade isolada.

Para os ácidos fenólicos: Ácido protocatecuico (200 mg), Ácido vanílico (8 mg) e Vanilina (12mg), todos encontrados em frações do extrato de *Dipteryx alata* Vogel, tendo disponíveis comercialmente, esses fitoquímicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

4.2 Teste de Ames

4.2.1 Linhagens de Salmonella typhimurium

Foram utilizadas as linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. typhimurium*, gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley (Califórnia, EUA) com e sem ativação metabólica à Dra. Eliana Aparecida Varanda do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

4.2.2 Verificação das características genéticas das linhagens de S. typhimurium

As características genéticas das linhagens de *S. typhimurium* foram checadas periodicamente antes do preparo dos estoques para congelamento. Dentre estas características temos que a dependência da histidina, presença de mutação *rfa*, presença de deleção *uvrB*, presença de plasmídios de resistência e taxa de reversão espontânea foram verificadas de acordo com Maron e Ames (1983). Abaixo segue a descrição dos métodos:

Dependência da histidina. Alíquotas das culturas foram estriadas em placa teste de ágar mínimo sem histidina e com biotina e em placa controle de agar mínimo com 0,1 mL de histidina (26 mM – 0,054 g em 10 mL de água estéril) e biotina (0,5 mM - 0,00124 g em 10 mL de água estéril). Colocaram as placas em incubação a 37 °C por uma noite. A dependência de histidina foi confirmada pelo crescimento das linhagens

em placa com histidina e biotina e ausência de crescimento na placa com apenas biotina.

- Presença de mutação *rfa*. Foram semeadas uma linhagem por placa de ágar nutriente (CN + 1,5 % agar) 100 µL das suspensões das linhagens incorporadas em ágar de superfície, em seguida foram colocados na placa 3 discos de papel filtro estéril embebidos em 10 µL de solução de cristal violeta 0,1 % (0,01 g/10 mL de água estéril). Após 12 h de incubação a 37 °C, as linhagens contendo esta mutação apresentavam um halo de inibição de crescimento (cerca de 14 mm) ao redor do disco.
- Presença de deleção *uvr*B. Foram feitas estrias das bactérias (uma linhagem por placa) em placas de ágar nutriente, em seguida metade da placa foi coberta com gaze, sendo a outra metade irradiada com luz UV (245 nm e 15 watts) a uma distância de 33 cm por 8 segundos. Após incubação de 24 h a 37 °C, as linhagens que apresentavam esta mutação cresceram apenas no lado não irradiado (coberta) da placa.
- Presença de plasmídios de resistência pKM101. Foram feitas estrias das linhagens em placas ágar nutriente acrescidas de ampicilina 8 mg/mL (750 μg/placa). Após incubação de 24 h a 37 °C observou-se o crescimento das linhagens portadoras do plasmídio de resistência.
- Presença de plasmídios de resistência pAQ1. A linhagem portadora deste plasmídio, TA102 foi testada para resistência a ampicilina e tetraciclina. Foram feitas estrias das linhagens em placa ágar nutriente acrescidas de ampicilina 8 mg/mL e tetraciclina 8 mg/mL (60 µg/placa). Após incubação de 24 h a 37 °C observou-se o crescimento das linhagens portadoras do plasmídio de resistência.
- Taxa de reversão espontânea. No Laboratório de Mutagenicidade do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia de Araraquara, a taxa de reversão espontânea é monitorada periodicamente baseada nas frequências características de mutações espontâneas de cada linhagem testadas em condições de ausência e presença da mistura S9 apresentadas frente a valores aceitáveis em revertentes/placa, seguindo o preconizado por Mortelmans e Zeiger (2000). A Tabela 2 apresenta os valores da taxa de reversão espontânea por placa.

| Linhagem | Revertentes sem S9* | Revertentes com S9* | |
|----------|---------------------|----------------------------|--|
| TA 97a | 75 - 200 | 100 - 200 | |
| TA 98 | 20 - 50 | 20 - 50 | |
| TA 100 | 75 - 200 | 75 - 200 | |
| TA 102 | 100 - 300 | 200 - 400 | |

Tabela 2 - Taxa de reversão espontânea por placa.

*Número de colônias de crescimento espontâneo por placa no Controle espontâneo.

Fonte: MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microssome mutagenicity assay. Mutation Research, v. 455, p. 29-60, 2000.

4.2.3 Manutenção e estoque das linhagens de S. typhimurium

As linhagens de *S. typhimurium* ficaram estocadas em viais criogênicos (2,0 mL) e mantidas à -70 °C para que se mantivessem inalteradas todas as suas características genéticas. Para cada 0,9 mL de cultura foi adicionada 0,1 mL de dimetilsufóxido (DMSO – Sigma-Aldrich) que é um crioprotetor (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

4.2.4 Preparo dos inóculos de S. typhimurium

Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubada a 37 °C, por 11-14 h em *shaker* incubador (37 °C -100 rpm), de modo a obter uma densidade de 1-2 x 10⁹ bactérias/mL. Após o tempo, as culturas são removidas e mantidas refrigeradas em geladeira até o momento de uso (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

4.2.5 Meio de cultura e soluções

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron e Ames (1983) descrita abaixo.

- Caldo nutriente. O meio Nutrient Broth nº 2 (CM 0067 OXOID[®]) foi dissolvido em água purificada por osmose reversa na proporção de 0,75 g/30 mL. O meio foi autoclavado a 121 °C, por 20 min e após o arrefecimento foi mantido refrigerado entre 2 a 8 °C. Este caldo é utilizado para o crescimento de culturas bacterianas de *Salmonella typhimurium*.
- Top agar. O Bacto Agar purificado (BD[®] Ref 214010) 0,6 % (m/v) e o Cloreto de sódio (Sigma[®]) 0,5 % (m/v) foram dissolvidos em 100 mL de água purificada por osmose reversa. O meio foi autoclavado a 121 °C, por 20 min e após o arrefecimento foi mantido refrigerado entre 2 a 8 °C. O Top Agar é utilizado para crescimento das

colônias revertentes. No momento do uso, o Top ágar foi fundido em forno de microondas e adicionado de 10 mL de solução de biotina/histidina e homogeneizado.

- Solução de Biotina / Histidina (0,5 mM). A D-Biotina (Sigma[®]) 0,00124 g e a L-Histidina (Sigma[®]) 0,00096 g foram dissolvidas em 10 mL de água purificada por osmose reversa aquecida a 45 °C. A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min e após o arrefecimento foi mantido refrigerado entre 2 a 8 °C. Esta solução é utilizada para suplementar o Top Agar quanto à biotina e traços de histidina.
- Agar mínimo nutriente. O Bacto Agar purificado (BD[®] Ref. 214010) foi pesado 7,5 g e dissolvido em 465 mL de água purificada por osmose reversa e agitado até a dissolução. O Agar mínimo nutriente foi autoclavado a 121 °C por 20 min. Aguardou o esfriamento até aproximadamente 60 °C e dentro da Capela de Fluxo Laminar, ao erlenmeyer contendo o Agar mínimo foi adicionado 10 mL de solução de sais de Vogel Bonner (VB) e 25 mL de solução de glicose 40 % e agitado vigorosamente. Para a linhagem TA97a foi utilizado solução de glicose 8%. Foi vertida a solução de meio em placas de Petri esterilizadas e descartáveis, verificado a formação de bolhas e retiradas com a chama do bico de bunsen. As placas foram incubadas invertidas em estufa a 37 °C por 48 h.
- Solução de sais de Vogel Bonner (VB). Para a preparação de 100 mL da solução de sais de Vogel Bonner, foram pesados Sulfato de magnésio (Reagen[®]) 1,0 g, Ácido cítrico (Sigma[®]) 10,0 g, Fosfato de potássio dibásico (Merck[®]) 50,0 g, Fosfato de sódio e amônio (Merck[®]) 17,5 g e dissolvidos seguindo a sequencia em 67 mL de água purificada por osmose reversa mantidos a temperatura de aproximadamente 45 °C. A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min.
- Soluções de Glicose a 40 % e 8 %. Para a preparação de 100 mL e 50 mL da solução de Glicose a 40 % e 8 %, foram pesados respectivamente 40 g e 4 g de D-Glucose (Sigma[®]) e dissolvidos respectivamente em 90 mL e 50 mL de água purificada por osmose reversa. As soluções foram autoclavadas a 121 °C por 20 min. A solução de Glicose a 40% é usada para o preparo do Agar mínimo glicosado para as linhagens TA98, TA100 e TA102. A solução de Glicose 8% é usada para o preparo do Agar mínimo glicosado para a cepa TA97a.
- Tampão de fosfato de sódio 0,2 M pH 7,4. Para a preparação da Solução A, foi pesado uma massa de 2,76 g de Fosfato de sódio monobásico NaH₂PO₄ (Reagen[®]) e dissolvido em 100 mL de água purificada por osmose reversa. Para a preparação da Solução B, foi pesado 2,84 g de Fosfato de sódio dibásico Na₂HPO₄ (Merck[®]) e

dissolvido em 100 mL de água purificada por osmose reversa. As soluções A e B foram preparadas em dois béqueres separados. Após a calibração do pHmetro, foi colocado o eletrodo na solução A e adicionado aos poucos a solução B até o pH atingir valor de 7,4. A solução tampão final foi autoclavada a 121 °C por 20 min e após o arrefecimento foi mantida refrigerado entre 2 a 8 °C.

4.2.6 Mistura S9

Sabe-se que, muitos compostos iniciadores do processo de carcinogênese necessitam ser metabolizados antes de interagir com o material genético, desse modo é necessário realizar o teste de Ames na presença e ausência de um sistema de metabolização. O sistema mais comumente utilizado, a fração microssomal S9, é composta por um homogenato de células de fígado de rato, pré-tratado com a mistura bifenil policlorinada (Aroclor 1254), que induz um aumento de enzimas P-450 neste órgão (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

A mistura S9 é composta por:

- B-NAPD (β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) 0,1 M. Para a preparação de solução 0,1 M, foi pesado uma massa de 0,15308 g de B-NAPD (Sigma[®]) e dissolvido em 2 mL de água purificada, pelo sistema MilliQ, estéril. A solução foi preparada no momento do uso em frasco esterilizado.
- G6P (Glicose-6-fosfato) 1M. Para a preparação de solução 1 M, foi pesado uma massa de 0,084 g de G6P (Sigma[®]) e dissolvido em 300 µL de água purificada, pelo sistema MilliQ, estéril. A solução foi preparada no momento do uso em frasco esterilizado.
- Solução de KCl 1,65 M. Para a preparação de solução 1,65 M, foi pesado uma massa de 1,23 g de KCl (Sigma[®]) e dissolvido em 10 mL de água purificada por osmose reversa.

A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min e armazenado em freezer a -20 °C.

Solução de MgCl₂ 0,4 M. Para a preparação de solução 0,4 M, foi pesado uma massa de 0,81 g de MgCl (Sigma[®]) e dissolvido em 10 mL de água purificada por osmose reversa.

A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min e armazenado em freezer a -20 °C.

 Fração Microssomal S9. A Fração S9 (11'01L RAT LIVER LS-9 / Aroclor 1254induced male SD rat liver) utilizada no sistema de ativação metabólica foi adquirida liofilizada da MOLTOX[®], armazenado a -20 °C e reconstituído com 2,0 mL de água purificada, pelo sistema MilliQ, estéril no momento do uso. A fração microssomal S9 homogeneizada de fígado de rato Sprague Dawley (fração pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas, Aroclor 1254 - 500 mg/Kg), foi utilizada para induzir um conjunto de enzimas do sistema microssomal hepático.

A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. O sistema de ativação metabólica consiste de 4% de fração S9, 1% de 0,4 M de cloreto de magnésio, 1% de 1,65 M de cloreto de potássio, 0,5% de 1 M de glicose-6-fosfato e 4% de 0,1 M de b-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, além de 50% de 0,2 M de tampão fosfato pH 7,4 e 39,5% de água deionizada estéril (MARON; AMES, 1983). Essa mistura foi mantida resfriada em banho de gelo durante todo o ensaio. Esta solução de trabalho foi preparada sempre a fresco e utilizada num período máximo de 3 h.

4.2.7 Controles negativos e positivos

Os ensaios foram realizados sempre em presença de controles negativos e positivos (Figura 6) para assegurar a capacidade de resposta da linhagem e a eficácia do sistema de ativação metabólica.





Fonte: Elaboração própria.

O controle negativo utilizado foi o solvente DMSO (dimetilsulfóxido) utilizado para dissolver as amostras e o volume por placa o mesmo utilizado para as amostras (100 µL).

Como controles positivos foram usados produtos químicos reconhecidamente mutagênicos, específicos para cada linhagem de *S. typhimurium*, em concentrações definidas (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003), como descrito a seguir:

- NPD (4-nitro-*o*-fenilenodiamino) (Sigma[®]). Uma massa de 0,001 g de NPD foi analiticamente pesada e dissolvida em 5 mL de DMSO (Sigma[®]). Sendo este o controle utilizado para as linhagens TA98 e TA97a em ausência de S9. Foi utilizado 50 µL por placa em concentração de 10,0 µg/placa.
- NaN₃ (Azida sódica) (Sigma[®]). Uma massa de 0,0005 g de NaN₃ foi analiticamente pesada e dissolvida em 10 mL de água purificada, pelo sistema MilliQ, estéril. Sendo este o controle utilizado para a linhagem TA100 em ausência de S9. Foi utilizado 50 μL por placa em concentração de 1,25 μg/placa.
- MMC (Mitomicina C). Uma massa de 0,0001 g de MMC foi analiticamente pesada e dissolvida em 10 mL de água purificada, pelo sistema MilliQ, estéril. Sendo este o controle utilizado para a linhagem TA102 em ausência de S9. Foi utilizado 50 μL por placa em concentração de 0,5 μg/placa.
- 2-AA (2-aminoantraceno) (Sigma[®]). Uma massa de 0,0003 g de 2-AA foi analiticamente pesada e dissolvida em 10 mL de DMSO (Sigma[®]). Sendo este o controle utilizado para as linhagens TA98, TA97a e TA100 na presença de S9. Foi utilizado 50 μL por placa em concentração de 1,25 μg/placa.
- 2-AF (2-aminofluorene) (Sigma[®]). Uma massa de 0,0005 g de 2-AF foi analiticamente pesada e dissolvida em 5 mL de DMSO (Sigma[®]). Sendo este o controle utilizado para a linhagem TA102 na presença de S9. Foi utilizado 50 μL por placa em concentração de 10,0 μg/placa.

4.3 Protocolo de ensaio

O método escolhido para a realização do teste de Ames foi o de incorporação em placas com pré-incubação, sendo este o recomendado pela literatura (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). O teste foi realizado na presença e na ausência de ativação metabólica com as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102.

4.3.1 Teste de incorporação em placas

O teste de incorporação em placas consiste na exposição das linhagens de *S*. *typhimurium* e a amostra a testar em placa de agar glicose mínimo na presença e ausência do sistema de ativação metabólica mistura S9 de acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983). O experimento se desenvolveu através da avaliação de cinco diferentes concentrações dos compostos vanilina, ácido vanílico e ácido protocatecuico dissolvidos em DMSO. As concentrações foram selecionadas com base em

testes preliminares de toxicidade. As concentrações variaram de 0,10 a 0,78 mg/placa para a Vanilina, de 0,39 a 3,13 mg/placa para o ácido vanílico e de 0,78 a 6,25 mg/placa para o ácido protocatecuico.

4.3.2 Método de pré-incubação

O método de pré-incubação (MARON; AMES, 1983) é caracterizado por uma etapa de incubação antes do plaqueamento. As culturas de bactérias e a mistura contendo a amostra teste, em presença e ausência do sistema de metabolização, são pré-incubadas por período de 20-30 min a 37 °C.

Primeiramente realizou-se a identificação dos tubos, na sequencia, adicionou-se a amostra. As amostras a serem testadas foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) ou em água purificada, pelo sistema MilliQ estéril.

O teste foi realizado em triplicata.

Na sequencia, adicionaram-se os controles positivos e negativos, nos tubos correspondentes. A presença desses controles é importante para assegurar a capacidade de resposta da linhagem e a eficácia do sistema de ativação metabólica.

Como controle negativo, utilizou-se o DMSO, o mesmo solvente utilizado para diluir a amostra, cuja quantidade segue sempre a máxima dose de amostra utilizada no teste.

Utilizaram-se como controles positivos, compostos mutagênicos em concentrações definidas. A Tabela 1 lista os principais controles utilizados para as linhagens mais comuns de *S. typhimurium*, de acordo com a literatura (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; VARGAS; MOTTA; HENRIQUES, 1993). Em seguida, adicionou-se o tampão fosfato e a bactéria, em todos os tubos, inclusive nos controles. Os tubos são colocados na estufa, para uma pré-incubação de 20-30 min a 37 °C.

Depois de cumprido o tempo de incubação, adicionou-se 2,0 mL de top Agar a 45 °C, suplementado com solução de biotina/histidina, em todos os tubos. Os tubos foram homogeneizados e vertidos sobre a superfície da placa contendo ágar glicose mínimo.

Com a solidificação do top ágar, as placas são incubadas invertidas, por 48 h a 37 °C. Depois de cumprido o tempo desta segunda incubação, procede-se então a contagem do número de revertentes por placa.

Os ensaios com ativação metabólica seguem o mesmo procedimento descrito anteriormente, porém, em uma das etapas, inverte-se apenas o tampão fosfato pela adição da fração S9.
4.3.3 Teste de Toxicidade

Os testes de toxicidade foram realizados para os fitoquímicos e avaliados as características de crescimento da última população de bactérias na placa de ágar glicose mínimo após 48 h de incubação. Durante a contagem das placas, a toxicidade da amostra foi evidenciada pela ausência completa de crescimento, redução no número de revertentes His+ ou como um crescimento de fundo (*backgroud*) nas placas teste de ágar glicose mínimo em comparação com as placas de controle negativo e controle espontâneo. Uma diminuição no crescimento de colônias com mutação reversa abaixo do controle espontâneo pode indicar toxicidade parcial, neste caso as bactérias sobreviventes formam ainda micro colônias. A ausência de crescimento de colônias e de crescimento de fundo indica um elevado grau de toxicidade que impede o crescimento da bactéria e a formação do crescimento de fundo (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; VARGAS; MOTTA; HENRIQUES, 1993).

Inicialmente foram testadas concentrações preliminares dos fitoquímicos dissolvidos em DMSO com a linhagem TA98 para os testes de toxicidade nas concentrações de 100 mg/placa para a vanilina e de 50 mg/placa para o ácido vanílico e o ácido protocatecuico. Nestas concentrações iniciais testadas, todas apresentaram toxicidade na linhagem da *S. typhimurium* não havendo crescimento bacteriano nas placas. Em seguida, as concentrações foram diminuídas, respectivamente a 50 mg/placa para a vanilina; a 25 mg/placa para o ácido vanílico e o ácido protocatecuico; nessas concentrações ainda apresentaram toxicidade no crescimento das bactérias.

A partir dos resultados dos testes de toxicidade, observando-se a curva de dose e resposta em toxicidade, foram escolhidas as concentrações adequadas, respectivamente a 0,78 mg/placa para a vanilina; a 3,13 mg/placa para o ácido vanílico e 6,25 mg/placa para o ácido protocatecuico.

4.3.4 Análise dos resultados

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (U.S.Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA), segundo BERNSTEIN et al. (1982). Os dados (revertentes/placa) foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido de uma regressão linear. O índice de mutagenicidade (IM) também foi calculado para cada concentração testada, de acordo com a fórmula a seguir.

 $IM = \frac{\text{número de revertente}_{\text{placa com a amostra (revertentes induzidas)}}}{\text{número de revertentes}_{\text{placa do controle negativo}}}$

A amostra foi considerada mutagênica quando houve uma relação dose/resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos e/ou quando o IM foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

O número de revertentes no controle negativo é a taxa de reversão espontânea obtida nas condições do ensaio. Ao tratar essa mesma cultura com doses crescentes do agente com atividade mutagênica, o número de revertentes por placa aumenta, proporcionalmente ao aumento das doses de exposição, até um platô, no qual as doses aplicadas são letais para as células por causarem excesso de danos ao DNA.

Os dados podem ser calculados através do *software* SALANAL (Salmonella Assay Analysis, v. 1.0; Integrated Laboratory Systems, Research Triangle Park, NC, USA), desenvolvido especificamente para análise estatística do teste de Ames, que incluí análise de variância (ANOVA) e regressão linear, que consiste na retirada de uma ou mais doses da análise usando somente os resultados que representam a porção linear da curva dose-resposta (OLIVEIRA, 2005).

Graficamente, os resultados são expressos por meio da curva dose-resposta, estabelecendo-se na abscissa as concentrações da amostra e na ordenada o número de revertentes induzidos em cada dose. Em geral, diferenças significativas entre doses testadas, o controle negativo e a relação dose-resposta, comprovadas estatisticamente, indicam atividade mutagênica da amostra.

Por outro lado, para as linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a, índices menores do que 2 acompanhados de ANOVA significativa e efeito dose, resposta reprodutível, indicam que a amostra apresenta indícios de mutagênese (VARGAS; MOTTA; HENRIQUES, 1993).

A resposta é considerada negativa quando a ANOVA não for significativa e nem for observado um efeito dose-resposta.

5 RESULTADOS

Os resultados são apresentados na forma de artigos científicos que avaliam a mutagenicidade dos fitoquímicos, conforme apresentado a seguir;

- Artigo 1: Este artigo foi submetido na revista *Molecules* com o título "Antibothropic activity of three natural phenolic compounds from *Dipteryx alata* Vogel and its safety evaluation by *Salmonella* mutagenicity assay" e apresentam os resultados referentes aos 3 compostos fenólicos.
- Artigo 2: Este artigo foi publicado na revista *Molecules* com o título "Antibothropic activity of three natural phenolic compounds from *Dipteryx alata* Vogel and its safety evaluation by *Salmonella* mutagenicity assay" e apresenta o resultado da isoflavona.

A apresentação dos resultados em formato de artigo científico segue as orientações estabelecidas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

5.1 Artigo 1

Type of the Paper (Article)

Antibothropic activity of three natural phenolic compounds from *Dipteryx alata* Vogel and its safety evaluation by *Salmonella* mutagenicity assay

Edson H. Yoshida¹, Miriéle C. Ferraz¹, Renata V. da S. Tavares¹, José C. Cogo², Márcio G. dos Santos³, Luiz M. Franco⁴, Cháriston A. Dal Belo⁵, Rone A. De Grandis⁶, Flávia A. Resende⁶, Eliana A. Varanda⁶, Pilar Puebla⁷Arturo San Feliciano⁷, and Yoko Oshima-Franco^{1,*}

- ¹ Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Course, University of Sorocaba (UNISO), Rodovia Raposo Tavares, Km 92.5, 18023-000 Sorocaba, SP, Brazil; e-mails: edsonyoshida@bol.com.br (E.H.Y.); miriele.ferraz@gmail.com (M.C.F.); renavasques@yahoo.com.br (R.V.S.T.)
- ² Serpentarium of the Vale do Paraíba University (CEN—UNIVAP), Av Shishima Hifumi 2911, 12244-000 São José dos Campos, SP, Brazil; E-Mail: jccogo@univap.br
- ³ Post-Graduate Course in Environmental Sciences, Federal University of Tocantins (UFT), Av NS 15 ALC NO 14, 109 Norte, 77001-090 Palmas, TO, Brazil; E-Mail: galdino@uft.edu.br
- ⁴ Methodist University of Piracicaba, Rodovia do Açucar, Km 156, 13423-170 Piracicaba, SP, Brazil; E-Mail: lenof@terra.com.br
- ⁵ LANETOX, Federal University of Pampa (UNIPAMPA), Avenida Antonio Trilha 1847, 97300-000 São Gabriel, RS, Brazil; E-Mail: charistonbelo@unipampa.edu.br
- ⁶ Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Rodovia Araraquara-Jau, Km 1, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil; E-Mails: degrandis.rone@gmail.com (D.A.D.G.); flaviabiomed@yahoo.com.br (F.A.R.); eavaranda@gmail.com (E.A.V.)
- ⁷ Department of Pharmaceutical Chemistry, Salamanca University, CIETUS, IBSAL, Salamanca 37007, Spain; E-Mails: puebla@usal.es (P.P.); asf@usal.es (A.S.F.)
- * Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: yoko.franco@prof.uniso.br; Tel.: +55-15-2101-7104; Fax: +55-15-2101-7112.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: Phenolic compounds from *Dipteryx alata* Vogel were assayed for the first time against the *in vitro* neurotoxic effect-induced by *Bothrops jararacussu* (Bjssu) venom. Mutagenicity was assessed by the Ames test using *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA97a, TA100 and TA102, in experiments with and without metabolic activation. Antibothropic activity was carried out using mouse phrenic nerve diaphragm preparation and myographic technique. Control experiments with physiological Tyrode solution was used for keeping the preparation alive (n=4). Concentrations of phenolic compounds were chosen as follow: protocatechuic and vanillic acids (200 µg/mL, n=4), vanillin (50 µg/mL, n=4), alone or preincubated with the venom (40 µg/mL), 30 min prior the addition to the organ bath (n=4). Phenolic compounds significantly inhibited the neuromuscular blockade of Bjussu with the following order of potency: vanillic acid > protocatechuic = vanillin. The mutagenicity assay indicated that all phytochemicals were unable to increase the number of revertants, demonstrating the absence of mutagenic activity. The absence of mutagenic activity in bacterial assays demonstrates the therapeutical potential of those phytochemicals as novel complementary antiophidian agents.

Keywords: Ames test; *Baru*; *Bothrops jararacussu* venom; Protocatechuic acid; Vanillic acid; Vanillin.

1. Introduction

Natural phenolic compounds possesses an aromatic ring bearing one or more hydroxyl or etherified substituents and are known because of their ability to complex protein by hydrogen bonding. Among them, compounds such as protocatechuic (1, PCA) and vanillic (2, VA) acids, are universal among the angiosperms [1]; and the aldehyde vanillin (3, VN), have closely related structures (Fig. 1), thus justifying the similarity in their biological activity [2].

Dipteryx alata Vogel (Leguminosae), a native plant from the Brazilian savannah and popularly known as *baru* [3], contains 18 compounds already identified and, among them, three phenolic derivatives of biomedical relevance [4].

Figure 1. The structures of tested antibothropic phenolics. **1**: protocatechuic acid (PCA), **2**: vanillic acid (VA), **3**: vanillin (VN)



1: $R^1 = COOH$, $R^2 = H$ **2**: $R^1 = COOH$, $R^2 = CH_3$ **3**: $R^1 = CHO$, $R^2 = CH_3$ The biological activity of these compounds has been characterized, and revealed their potential as antioxidants [5], scavengers of active oxygen species and electrophiles [6], blockers of nitration [7], and as metal chelators [8]. Despite of their environmental relevance since the endangered situation of the Cerrado biome, the preliminary survey for biological activities, also justifies the bio-prospection by unveiling the potential of *baru* as source of medicinal, nutritional foods, pharmaceutical and cosmetic compounds, hence contributing for the valorization of plants from Cerrado, and the sustainable use of that indispensable environment.

One of the medicinal interests of *baru* compounds is the use as antiophidian. *Bothrops* snake bites, including the *Bothrops jararacussu* snake, are the most relevant in Brazil, not only because of the number of accidents, but also by the severity of symptoms which include high level of pain, inflammation, hemorrhage and myonecrosis. The ascribed clinical signs are a result of the action of proteases/phospholipases/thrombin-like enzymes and peptides present in the venom [9,10]. Despite of the systemic antigen-antibody action of the antiserum, the local manifestations of *Bothrops* envenomation is only partially avoided [11]. Thus, strategies aiming to minimize the effects at the local site of bite would corroborate to minimize unwanted sequels such as, for example, the amputation of a member.

The nanotechnology, an innovation of the pharmaceutical sciences, can contribute to the development of a supplementary medicine in order to improve serum therapy [12]. Nevertheless, before this step is achieved, the safety assessment is crucial protocol.

In this study, PCA, VA and VN from *Dipteryx alata* were assayed in a preincubation model, using mouse phrenic nerve-diaphragm preparation to measure the *in vitro* neuromuscular activity of *B. jararacussu* venom [13]. The mutagenic activities of these compounds were assessed by the *Salmonella* microsome assay (Ames test), using *S. typhimurium* tester strains TA98, TA97a (to detect frameshift mutations), TA100 (to detect base-pair-substitution mutations) and TA102 (normally used to detect mutagens that cause oxidative damage and base-pair-substitution mutations), in the presence or absence of *in vitro* metabolizing systems [14-16]. Therefore, results of genetic toxicological tests combining with an adequate pharmacology profile, has been used to approve clinical trials of novel drug candidates [17].

2. Results and Discussion

Nowadays, the deforestation process and its associated factors are being target of study [18], accordingly to United States Environmental Protection Agency (EPA), using science and technology to protect human health and the environment, and promoting innovative green business practices. The study of plants with medicinal value engages the sustainability concept, i.e. "everything that we need for our survival and well-being depends, either directly or indirectly, on our natural environment". Sustainability creates and maintains the conditions under which humans and nature can exist in productive harmony, that permit fulfilling the social, economic and other requirements of present and future generations [19].

The biome known as *cerrado*, in Brazil, has been extensively threatened in the last decades. Many species of plants can disappear before some added medicinal value is known [20]. *D. alata* is a specie very appreciate by population due studies in several areas showing its great value as wood, industry, recovery of deforested areas, but mainly as food [21] and medicine, until now, as a great antiophidian [4, 22,23].

Here, we showed for the first time the performance as antiophidian of three natural phenolic compounds PCA (1), VA (2) and VN (3) found in *D. alata* [4], whose structures are shown in Fig. 1.

VA is an oxidized form of VN and exhibits more free radical scavenging activity than VN [24]. VA has antioxidant, antimicrobial and anti-mutagenic activities and can exhibit a chemopreventive effect in experimentally induced carcinogenesis in rats [25-28].

Moreover, it can scavenge free radical species with ability to act as cardioprotective and to repress fibrogenesis and inflammation in chronically injured liver [29-31]. VN is used as flavoring agents in food and cosmetics, has antimicrobial activity [32,33], and their antimutagenicity, antioxidant activity and anti-carcinogenicity are well described in the literature [27,28,33-35].

VA and PCA are commonly derivative of hydroxybenzoic acid or benzoic acid. According to Anter et al. [36], PCA did not exhibited any genotoxic effect; however it has an antigenotoxic effect against the hydrogen peroxide effect, exhibited tumoricidal activity and also induced apoptosis in HL-60 leukemia cells.

Figure 2 shows the pharmacological effects of the phenolic compounds. VN exhibited a major potency (around 4X) than VA and PCA, since only 50 μ g/mL vanillin was used in comparison to 200 μ g/mL of VA and PCA. VN also exhibited a facilitatory effect measured by an increase of twitches amplitude, at least during 40 minutes (p<0.05 compared to control).

Figure 2. Pharmacological activity evaluation (mouse phrenic nerve-diaphragm preparation, indirect stimuli). The phenolic compounds profile at the selected concentrations and number of experiments, n, are shown in the figure legend. Each point represents the mean \pm SEM. * = p<0.05 in comparison with the venom.



Despite of facilitatory effect of VN most probably associated to its reactive electrophilic character, looking for to these results, a preliminary judgment for predicting the ideal phytochemical for futher neutralization assays with *B. jararacussu* venom, VA showed the better profile since had no statistical difference with control (Tyrode solution). Note that, VN and PCA were significantly different of the control from 80 to 120 minutes interval.

Although speculations are permitted all hypothesis must be confirmed. Thus, Fig. 3 shows the *in vitro* preincubation between each phytochemical and the crude venom, isolately, before addition into the bath containing the isolated preparation. *B. jararacussu* venom (Bjssu) is known by its *in vitro* irreversible neuromuscular blockade [13].

Figure 3. Pharmacological activity evaluation (mouse phrenic nerve-diaphragm preparation, indirect stimuli). Each phenolic compounds was isolately preincubated with *Bothrops jararacussu* venom (Bjssu) before addition into the bath. The concentrations and the number of experiments, n, are shown in the figure legend. Each point represents the mean \pm SEM. * = p<0.05 in comparison with the venom.



B. jararacussu venom has two basic phospholipase A2 homologues, namely bothropstoxin-I (BthTX-I, a Lys49-PLA2) [37] and –II (BthTX-II, an Asp49-PLA2) [38,39]. BthTX-I is considered the main myotoxin from this venom since it is able to reproduce *in vitro* neurotoxicity and myonecrosis as the crude venom [37], one of the reasons by which this myotoxin arouses interest. To BthTX-I also was attributed a pre synaptic nature at 0.35 μ M, a concentration not enough to cause muscle fiber depolarization [40]. The Asp49 to Lys49 substitution in the catalytic center (just in the calcium-binding loop) explains the lack of enzymatic action in BthTX-I, due to the loss of ability to bind Ca²⁺ [41].

Chemically, the mechanisms by which the snake venom-plant interactions can occur include hydrogen-bonds, eletrostactic bonds, Vand der Waals forces, hydrophobic bonds, formation of inactive acid-base complexes, protein precipitation and covalent bonds [42-46].

The tested phenolic compounds protected the preparation against the neurotoxic effect of the venom in the following order: VA > PCA = VN.

Here, any argument in favor to acid-base complexes fails since PCA did not show the same ability in neutralizing the neuromuscular blockade of the venom as VA, i.e., it was not enough be an acid compound and the phenolic groups would have an important role. Chemically, the difference between VA and PCA lies on the methylation of the meta-hydroxyl group. It seems that such methylation did facilitate the interaction of the *para*-hydroxyl group with venom's constituents, making VA a better inhibitor than PCA, in which both hydroxyl groups are intramolecularly bonded. Interestingly, VA was isolated from the active fraction 7 of *D. alata* against *B. jararacussu* venom [22], showing the importance of biomonitoring studies.

Moreover, the balance between the therapeutic and toxicological effects of a compound is a very important measure of the usefulness of a pharmacological drug. Therefore, the determination of the potential mutagenic effect of any drug under development is mandatory [47]. The Ames assay, which is recommended for testing the mutagenicity of chemical compounds with potential pharmacological application [48], was used in the present study.

In previous studies, Esteves-Pedro et al. [49] showed that the *D. alata* Vogel extract had no mutagenic effect by Ames test on the strains tested, either in the presence or absence of metabolic activation. To complement these preliminary results [49] and in view of the promising results obtained in this study, the mutagenic activity of isolated compounds of *D. alata* Vogel extract were also assessed, as given in Tables 1, 2 and 3, which lists the mean number of revertants/plate (M), the standard deviation (SD) and the mutagenic index (MI) after the treatments with VA, PCA and VN respectively, observed in *S. typhimurium* strains TA98, TA100, TA102 and TA97a in the presence (+S9) and absence (-S9) of metabolic activation.

Table 1 Revertants/plate, standard deviation and mutagenicity index (in brackets) for the strains TA98, TA100, TA102 and TA97a of *S. typhimurium* after treatment with various doses of phytochemical 4-hydroxy-3-methoxybenzoic (Vanillic acid) isolated from *D. alata Vogel*, with (+S9) and without (-S9) metabolic activation

| Treatments | | Number of revertants (M ± SD)/plate and MI | | | | | | | | |
|----------------------|-------------------------|--|---------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--|
| | | TA 98 | | TA 100 | | TA 102 | | TA 97a | | |
| | mg/plate | - S9 | + S9 | - S9 | + S9 | - S9 | + S9 | - S9 | + S9 | |
| oxy-3-methoxybenzoic | 0.0 ^a | 28 ± 2 | 24 ± 2 | 104 ± 15 | 95 ± 6 | 271 ± 18 | 461 ± 21 | 125 ± 15 | 96 ± 10 | |
| | 0.39 | $28 \pm 5 \; (1.0)$ | $21 \pm 3 \; (0.9)$ | 113 ± 11 (1.1) | 95 ± 11 (1.0) | 241 ± 25 (0.9) | 518 ± 13 (1.1) | 98 ± 13 (0.8) | 98 ± 5 (1.0) | |
| | 0.78 | 41 ± 2 (1.5) | $18 \pm 3 \; (0.8)$ | 115 ± 15 (1.1) | $88 \pm 14 \; (0.9)$ | 237 ± 13 (0.9) | 522 ± 16 (1.1) | $108 \pm 10 \; (0.9)$ | 108 ± 2 (1.1) | |
| | 1.56 | 31 ± 5 (1.1) | $21 \pm 2 \; (0.9)$ | $91 \pm 7 \ (0.9)$ | $89 \pm 7 \ (0.9)$ | $268 \pm 10 \; (1.0)$ | 500 ± 20 (1.1) | $113 \pm 9 \ (0.9)$ | $103 \pm 13 \; (1.1)$ | |
| | 2.34 | 27 ± 2 (1.0) | $20 \pm 1 \; (0.8)$ | 96 ± 11 (0.9) | $84 \pm 7 \ (0.9)$ | 315 ± 8 (1.2) | 487 ± 15 (1.1) | $96 \pm 3 (0.8)$ | $103 \pm 18 \; (1.1)$ | |
| | 3.13 | $27 \pm 5 \; (1.0)$ | $21 \pm 4 \; (0.9)$ | $99 \pm 8 \ (0.9)$ | 92 ± 12 (1.0) | 293 ± 19 (1.1) | 471 ± 13 (1.0) | 84 ± 6 (0.7) | 97 ± 5 (1.0) | |
| 4-hidr | Control + | 2064 ± 87^{b} | 1213 ± 33^{e} | $1252 \pm 124^{\circ}$ | 1870 ± 69^{e} | 1173 ± 47^d | $1822\pm102^{\rm f}$ | 1968 ± 77^{b} | 1850 ± 67^{e} | |

 $M \pm SD =$ mean and standard deviation; MI = mutagenicity index; ^aNegative control: dimethylsulfoxide (DMSO - 50 µL/ plate); Ctrol + = Positive control - ^b4 -nitro-*o*-phenylenediamine (NOPD - 10.0 µg/ plate - TA98, TA97a); ^csodium azide (1.25 µg/ plate - TA100); ^dmitomycin (0.5 µg/ plate - TA102), in the absence of S9 and ^e2-anthramine (1.25 µg/ plate - TA 97a, TA98, TA100); ^f2-aminofluorene (10.0 µg/ plate - TA102), in the presence of S9.

Table 2 Revertants/plate, standard deviation and mutagenicity index (in brackets) for the strains TA98, TA100, TA102 and TA97a of *S. typhimurium* after treatment with various doses of phytochemical 3,4-dihydroxybenzoic acid (Protocatechuic acid) isolated from *D. alata Vogel*, with (+S9) and without (-S9) metabolic activation

| | Treatments | Number of revertants (M ± SD)/plate and MI | | | | | | | |
|-------------|-------------------------|--|---------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| | TA 98 | | A 98 | TA 100 | | TA 102 | | TA 97a | |
| | mg/plate | - S9 | + S9 | - S9 | + S9 | - S9 | + S9 | - S9 | + S9 |
| | 0.0 ^a | 28 ± 2 | 24 ± 2 | 104 ± 15 | 95 ± 6 | 271 ± 18 | 461 ± 21 | 125 ± 15 | 96 ± 10 |
| <i>joic</i> | 0.78 | 30 ± 7 (1.1) | $24 \pm 6 (1.0)$ | 113 ± 17 (1.1) | 94 ± 11 (1.0) | 273 ± 6 (1.0) | 502 ± 34 (1.1) | 116 ± 10 (0.9) | $105 \pm 16 \; (1.1)$ |
| penz | 1.56 | $26 \pm 2 \; (0.9)$ | $22 \pm 5 \; (0.9)$ | 104 ± 3 (1.0) | 100 ± 9 (1.0) | 261 ± 18 (1.0) | 475 ± 51 (1.0) | 121 ± 24 (1.0) | 101 ± 4 (1.1) |
| roxy | 3.13 | $24 \pm 2 \; (0.9)$ | $19 \pm 4 \; (0.8)$ | 100 ± 9 (1.0) | $96 \pm 6 (1.0)$ | $257 \pm 6 (0.9)$ | 492 ± 37 (1.1) | 124 ± 12 (1.0) | 120 ± 2 (1.3) |
| ihid | 4.69 | $25 \pm 2 \; (0.9)$ | 21 ± 2 (0.9) | $94 \pm 19 \; (0.9)$ | 97 ± 7 (1.0) | 299 ± 29 (1.1) | $498 \pm 7 \ (1.1)$ | 124 ± 4 (1.0) | 113 ± 26 (1.2) |
| ,4-d | 6.25 | 32 ± 9 (1.1) | 17 ± 3 (0.7) | $114 \pm 10 \; (1.3)$ | 103 ± 7 (1.1) | 372 ± 10 (1.4) | $490 \pm 21 \; (1.1)$ | $107 \pm 6 \ (0.9)$ | $120 \pm 18 \; (1.3)$ |
| (,) | Ctrol + | 2064 ± 87^{b} | 1213 ± 33^e | $1252\pm124^{\rm c}$ | 1870 ± 69^{e} | 1173 ± 47^{d} | $1822\pm102^{\rm f}$ | 1968 ± 77^{b} | 1850 ± 67^e |

 $M \pm SD =$ mean and standard deviation; MI = mutagenicity index; ^aNegative control: dimethylsulfoxide (DMSO - 50 µL/ plate); Ctrol + = Positive control - ^b4 -nitro-*o*-phenylenediamine (NOPD - 10.0 µg/ plate - TA98, TA97a); ^csodium azide (1.25 µg/ plate - TA100); ^dmitomycin (0.5 µg/ plate - TA102), in the absence of S9 and ^e2-anthramine (1.25 µg/ plate - TA 97a, TA98, TA100); ^f2-aminofluorene (10.0 µg/ plate - TA102), in the presence of S9.

Table 3 Revertants/plate, standard deviation and mutagenicity index (in brackets) for the strains TA98, TA100, TA102 and TA97a of *S. typhimurium* after treatment with various doses of phytochemical 4-hydroxy-3-metoxibenzaldehído (Vanillin) isolated from *D. alata Vogel*, with (+S9) and without (-S9) metabolic activation

| Treatments | | Number of revertants (M ± SD)/plate and MI | | | | | | | | |
|----------------|-------------------------|--|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|---------------------|--------------------|--------------------|--|
| | TA 98 | | 98 | TA 100 | | TA 102 | | TA 97a | | |
| | mg/plate | - S9 | + S9 | - S9 | + S9 | - S9 | + S9 | - S9 | + S9 | |
| | 0.0 ^a | 20 ± 2 | 30 ± 2 | 115 ± 7 | 121 ± 9 | 313 ± 24 | 411 ± 17 | 151 ± 8 | 143 ± 8 | |
| | 0.10 | 20 ± 3 (1.0) | 33 ± 3 (1.1) | $103 \pm 8 (0.9)$ | 142 ± 9 (1.2) | 375 ± 15 (1.2) | 453 ± 27 (1.1) | 171 ± 11 (1.1) | $192 \pm 6 (1.3)$ | |
| op | 0.20 | $17 \pm 1 \; (0.9)$ | 35 ± 3 (1.2) | 111 ± 11 (1.0) | 148 ± 11 (1.2) | 430 ± 19 (1.4) | 496 ± 13 (1.2) | 205 ± 22 (1.4) | 167 ± 12 (1.2) | |
| ehihi | 0.39 | 19 ± 3 (0.9) | $30 \pm 4 \; (1.0)$ | 110 ± 2 (1.0) | $143 \pm 10 \; (1.2)$ | 422 ± 43 (1.4) | 503 ± 14 (1.2) | 186 ± 12 (1.2) | 163 ± 7 (1.1) | |
| -3- zald | 0.59 | $16 \pm 2 \; (0.8)$ | 37 ± 3 (1.2) | $108 \pm 6 \ (0.9)$ | 144 ± 13 (1.2) | 367 ± 26 (1.2) | 489 ± 27 (1.2) | 167 ± 17 (1.1) | 167 ± 5 (1.2) | |
| roxy- ciben | 0.78 | 20 ± 2 (1.0) | 34 ± 6 (1.1) | $108 \pm 10 \; (0.9)$ | 116 ± 3 (1.0) | 325 ± 41 (1.0) | 445 ± 21 (1.1) | $173 \pm 7 (1.1)$ | 170 ± 13 (1.2) | |
| t-hid toto | Ctrol + | 1319 ± 41^{b} | 1696 ± 41^e | 1708 ± 27^{c} | 1480 ± 52^{e} | 1220 ± 24^{d} | $1825\pm55^{\rm f}$ | 1875 ± 62^{b} | 1623 ± 48^{e} | |

 $M \pm SD =$ mean and standard deviation; MI = mutagenicity index; ^aNegative control: dimethylsulfoxide (DMSO - 50 µL/ plate); Ctrol + = Positive control - ^b4 -nitro-*o*-phenylenediamine (NOPD - 10.0 µg/ plate - TA98, TA97a); ^csodium azide (1.25 µg/ plate - TA100); ^dmitomycin (0.5 µg/ plate - TA102), in the absence of S9 and ^e2-anthramine (1.25 µg/ plate - TA 97a, TA98, TA100); ^f2-aminofluorene (10.0 µg/ plate - TA102), in the presence of S9.

The mutagenicity assays show that none of the phenolic compounds induced any increase in the number of revertant colonies compared to the negative control group, indicating the absence of any mutagenic activity. The absence of such an effect by these compounds against *S. typhimurium* bacterial strains in the Ames assay is a positive step towards determining its safe use in medicine. Considering the biological properties these compounds, a lack of mutagenic effect in bacterial systems is highly relevant.

Adding to this issue, the genotoxic and anti-genotoxic effects of VA were determinated on mitomycin C-induced DNA damage in human blood lymphocyte cultures *in vitro* by cytokinesis block micronucleus test and alkaline comet assay. The results showed that VA could prevent oxidative damage to DNA and chromosomes when used at an appropriately low dose [50]. VA also induced an inhibitory effect on the mutagenicity of 3-(5-nitro-2-furyl)acrylic acid (5NFAA) and sodium azide [51]. Stagos et al. [52] evaluated the (anti) mutagenicity of the PCA; the results showed no any mutagenic effect and had no significant effect on bleomycin-induced mutagenicity. According to Shaughnessy et al. [53], VN is dietary antimutagens that, when added to assay plates, reduces the spontaneous mutant frequency in *S. typhimurium* strain TA104 (*hisG428, rfa, uvrB*, pKM101) by 50%.

Taken together our results, which are also corroborated with data from literature, these phytochemicals are not mutagenic, and they act as antimutagens according to elsewhere [33-36,50,52]. These results can stimulate new research to provide medicines using these safe molecules and nanotechnology to treat several pathological conditions, as snakebite envenoming.

3. Experimental Section

3.1. Plant material and extraction

The barks of an adult *Dipteryx alata* Vogel tree were collected in Pedro Afonso (Tocantins, Brazil) in December 2007, and identified by Dr. Roseli B. Torres (Institute of Agronomy of Campinas). The voucher specimen was deposited (IAC 50629) at the herbarium of Institute of Agronomy of Campinas. The *D. alata* barks (1.269 kg) were dried at 37°C over 48 hours and then powdered, ground in a mill, macerated (200 g, during 5 days) in 2 L of 70% ethanol and the suspension was then percolated (under protection against light) at 20 drops/min, resulting in a 20% (m/v) hydroalcoholic extract. After, the obtained extract was concentrated under reduced pressure and lyophilized providing a residue of 170 g, reaching 85% efficiency [49].

3.1.1. Isolation

Part of above residue (50 g) was dissolved in a 80:20 MeOH:H₂O mixture and partitioned successively with the corresponding solvents to give a hexane (1.5 g), dichloromethane (CH₂Cl₂, 18 g), ethyl acetate (EtOAc, 3.7 g) and methanol (MeOH residue, 21 g). The CH₂Cl₂ fraction was subjected to silica gel flash column chromatography and eluted with hexane-EtOAc (9:1 to EtOAc) to give 12 subfractions, that were further successively flash-

chromatographed on silica gel and purified by Sephadex LH-20 column chromatography, eluted with hexane-CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (2:2:1) to yield 18 compounds among them, the phenolic derivatives protocatechuic acid (PCA, 1), vanillic acid (VA, 2) and vanillin (VN, 3) [4].

3.1.2. Compounds solubilization

For using the natural compounds in pharmacological assays (see below), they were solubilized: PCA (compound 1) in 30 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); VA and VN (compounds 2 and 3, respectively) in 15 μ L of polyethylene glycol (PEG 400). These concentrations of solubilizing agents did not cause changes on basal response of neuromuscular preparation, according to Cintra-Francischinelli et al. [54].

3.2. Pharmacological assays

3.2.1. Crude snake venom

Bothrops jararacussu venom (Bjssu) was collected from two adults specimens kept in Serpentário do Centro de Estudos da Natureza - CEN. The venom was lyophilized and certified by Professor Dr. José Carlos Cogo from University of Vale do Paraiba, Univap, SP, Brazil.

3.2.2. Animals

Male Swiss white mice (26-32 g) were supplied by Anilab (Animais de Laboratório, Paulínia, SP, Brazil). The animals were housed at 25 ± 3 °C on a 12 h light/dark cycle and had access to food and water *ad libitum*. This project (protocol number A013/CEUA/2011) was approved by the institutional Committee for Ethics in Research from University of Vale do Paraiba, and the experiments were performed within the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation.

3.2.3. Mouse phrenic nerve-diaphragm muscle (PND) preparation

The phrenic nerve-diaphragm [55] was obtained from mice anesthetized with halothane (Cristália, Brazil) and killed by exsanguination. The diaphragm was removed and mounted under a tension of 5g/cm in a 5 mL organ bath containing aerated Tyrode solution (control) of the following composition (mM): NaCl 137; KCl 2.7; CaCl₂ 1.8; MgCl₂ 0.49; NaH₂PO₄ 0.42; NaHCO₃ 11.9; and glucose 11.1. After equilibration with 95% O₂/5% CO₂ (v/v), the pH of this solution was 7.0. The preparations were indirectly stimulated with supramaximal stimuli (4X threshold, 0.06 Hz, 0.2 ms) delivered from a stimulator (model ESF-15D, Ribeirão Preto, Brazil) to the nerve by bipolar electrodes. Isometric twitch tension was recorded with a force displacement transducer (cat. 7003, Ugo Basile, Italy) coupled to a 2-Channel Recorder Gemini physiograph device (cat. 7070, Ugo Basile) via a Basic Preamplifier (cat. 7080, Ugo

Basile). The PND myographic recording was performed according to Ferraz et al. [23]. PND was allowed to stabilize for at least 20 min before the following experiments (below).

3.2.4. Experimental protocols

Controls were carried out using only the nutritive solution of Tyrode for maintaining the biological preparation (n=4). The concentrations used were: PCA and VA (200 μ g/mL, n=4), VN (50 μ g/mL, n=4) and *B. jararacussu* venom 40 μ g/mL (n=4), based in previous studies [23]. The same concentrations were maintained for *in vitro* preincubation, during 30 min prior to addition into the organ bath, in order to verify the ability of phenolic compounds in neutralizing the *in vitro* neurotoxic effect of crude venom (n=4).

3.3. In vitro mutagenicity assay

Mutagenic activity was tested by the Salmonella/microsome assay, using the S. typhimurium tester strains TA98, TA100 and TA102 [56], kindly provided by B.N. Ames (Berkeley, CA, USA), with and without metabolization by the preincubation method [15]. The strains from frozen cultures were grown overnight for 12-14 h in Oxoid Nutrient Broth No. 2. The S9 fraction, prepared from livers of Sprague-Dawley rats treated with the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 (500 mg/kg), was purchased from Molecular Toxicology Inc. (Boone, NC, USA) and freshly prepared before each test. The metabolic activation system consisted of 4% of S9 fraction, 1% of 0.4M MgCl₂, 1% of 1.65M KCl, 0.5% of 1M D-glucose-6-phosphate disodium and 4% of 0.1M NADP, 50% of 0.2M phosphate buffer and 39.5% sterile distilled water [15]. The phenolic compounds of D. alata extract were dissolved in DMSO in order to obtain the non toxic concentrations. The concentrations were selected on the basis of a preliminary toxicity test. In all subsequent assays, the upper limit of the dose range tested was either the highest non toxic dose or the lowest toxic dose determined in this preliminary assay. Toxicity was apparent either as a reduction in the number of histidine revertants (His+), or as an alteration in the auxotrophic background (i.e., background lawn). The concentrations varied from 0.78 to 6.25 mg/ plate for PCA, 0.39 to 3.13 mg/plate for VA and 0.1 to 0.78 mg/plate for VN.

The various concentrations of phenolic compound to be tested were added to 0.5 mL of 0.2M sodium phosphate buffer (pH 7.4), or to 0.5 mL de 4% S9 mixture, with 0.1 mL of bacterial culture and then incubated at 37°C for 20 min. Next, 2 mL of top agar (0.6% agar, histidine and biotin 0.5 mM each, and 0.5% NaCl) was added and the mixture was poured on to a plate containing minimal glucose agar (1.5% Bacto-Difco agar and 2% glucose in Vogel-Bonner medium E). The plates were incubated at 37°C for 48 h and the His(+) revertant colonies were counted manually. All experiments were carried out in triplicate. The standard mutagens used as positive controls in experiments without S9 mix were 4-nitro-*O*-phenylenediamine (10 μ g/plate) for TA102 and TA97a, sodium azide (1.25 μ g/plate) for TA100 and mitomycin (0.5 μ g/plate) for TA102. 2-anthramine (1.25 μ g/plate) was used with TA98, TA97a and TA100 and 2-aminofluorene (1.25 μ g/plate) with TA102 in the experiments with metabolic activation. DMSO served as the negative (solvent) control (50 μ L/plate).

The mutagenic index (MI) was calculated for each concentration tested, this being the average number of revertants per plate with the test compound divided by the average number of revertants per plate with the negative (solvent) control. A sample was considered mutagenic when a dose-response relationship was detected and a two-fold increase in the number of mutants (MI \geq 2) was observed with at least one concentration [57].

3.4. Statistical analysis

Each experimental protocol from pharmacological assays was repeated at least four times and the results are shown as the mean \pm SEM. The number of experiments (n) is indicated in the legend of each figure. Student's *t*-test was used for statistical comparison of the data and the confidence level was set as 5% (alpha=0.05). The results of the mutagenicity tests were analyzed with the Salanal statistical software package (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, version 1.0, from Research Triangle Institute, RTP, North Carolina, USA), adopting the Bernstein et al. [58] model. The data (revertants/plate) were assessed by analysis of variance (ANOVA), followed by linear regression.

4. Conclusions

Phenolic compounds from *D. alata* significantly protected the neuromuscular preparation against the irreversible neuromuscular blockade-induced by *B. jararacussu* venom, at different levels: VA > PCA = VN, by unclear mechanisms. Moreover, the results indicated the absence of any mutagenic activity by Ames test; it is important to guarantee its safe use in humans.

Acknowledgments

The authors thank to Roseli B. Torres for the plant identification. This study was supported by FAPESP (04/09705-8; 07/53883-6; 08/50669-6; 08/52643-4; 08/11005-5); Capes/Prosup; Probic/Uniso; and USAL: 18KAC9/463AC01.

Author Contributions

EHY and MCF were students responsible by the methodology execution. RVST was the responsible for fractionation of lyophilized extract. JCC was the responsible by snake venom obtention and certification. MGS and CADB were responsible for collection of plant samples obtained in Tocantins. LMF, PP, ASF and YOF were responsible by isolation and identification of phenolic compounds from *D. alata*. RADG helps in Ames Test and FAR and EAV were responsible by interpretation of *Salmonella* mutagenicity assay. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1. Harborne, J.B. Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, 3rd ed.; Chapman & Hall: London, UK, 1998.
- 2. Lee, S.; Monnappa, A.K.; Mitchell, R.J. Biological activities of lignin hydrolysaterelated compounds. B.M.B. Reports Online 2012, 45, 265-275.
- 3. Lorenzi, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativasdo Brasil. Plantarum: Nova Odessa, Brazil, 1992.
- 4. Puebla, P.; Oshima-Franco, Y.; Franco, L.M.; Santos, M.G.; Silva, R.V.; Rubem-Mauro L.; Feliciano, A.S. Chemical constituents of the bark of *Dipteryx alata* Vogel, an active species against *Bothrops jararacussu* venom. *Molecules* **2010**, *15*, 8193-8204.
- 5. Kagan, V.E.; Tyurinov, Y.Y. Recycling and redox cycling of phenolic antioxidants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.***1998**, *854*, 425-434.
- 6. Zhou Y. C.; Zheng, R. L. Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *42*, 1177-1179.
- 7. Kono, Y.; Shibata, H.; Kodama, Y.; Sawa, Y. The suppression of `the N-nitrosating reaction by chlorogenic acid. *Biochem. J.* **1995**, *312*, 947-953.
- 8. Brune, M.; Rossander, L.; Hallberg, L. Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1989**, *43*, 547-548.
- Milani Júnior, R.; Jorge, M.T.; de Campos, F.P.; Martins, F.P.; Bousso, A.; Cardoso, J.L.; Ribeiro, L.A.; Fan, H.W.; França, F.O.; Sano-Martins, I.S.; Cardoso, D.; Ide Fernandez, C.; Fernandes, J.C.; Aldred, V.L.; Sandoval, M.P.; Puorto, G.; Theakston, R.D.; Warrell, D.A. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. *Q. J. Med.* **1997**, *90*, 323-334.
- 10. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. In *Saúde FND*, 2nd ed.; Ministério da Saúde: Brasília, 2001, pp. 1-120.
- 11. Warrell, D.A. The global problem of snaked bite: its prevention and treatment. In *Recent advances in toxinology research*; Gopalakrishnakone, P., Tan, C.K., Eds.; National University of Singapore: Singapore, Singapore, **1992**; pp. 121-153.
- 12. Dwivedi, R. Silver nanoparticles ecofriendly green synthesis by using two medicinal plant extract. *Int. J. Bio-Technol. Res.* **2014**, 3, 61-68.
- 13. Rodrigues-Simioni, L.; Borgese, N.; Ceccarelli, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. *Neuroscience* **1983**, *10*, 475–489.
- 14. Ames, B.N.; McCann, J.; Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat.Res.*, *31*, 347-364.
- 15. Maron, D.M.; Ames, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **1983**, *113*, 173–215.
- Gatehouse, D.; Haworth, S.; Cebula, T.; Gocke, E.; Kier, L.; Matsushima, T.; Melcion, C.; Nohmi, T.; Ohta, T.; Venitt, S.; et al. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutat. Res.* 1994, *312*, 217-233.
- 17. Santos, J.L.; Varanda, E.A.; Lima, L.M.; Chin, C.M. Mutagenicity of new lead compounds to treat sickle cell disease symptoms in a *Salmonella*/microsome assay. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 779-788.

- El-Abbas, M.M.; Csaplovics, E.; Deafalla, T.H. Remote sensing and spatial analysis based study for detecting deforestation and the associated drivers. *Proc. SPIE* 8893, Earth Resources and Environmental Remote Sensing/GIS Applications IV, 889300 (October 24, 2013); doi:10.1117/12.2029252
- 19. U. S. Environmental Protection Agency (EPA). http://www.epa.gov/sustainability/basicinfo.htm. Accessed in: february 2014.
- dos Santos, M.G.; Lolis, S.F.; Dal Belo, C.A. Levantamentos etnobotânicos realizados em duas comunidades de remanescentes de negros da região do Jalapão, Estado do Tocantins. In *Sociabilidade Negras. Comunidades Remanescentes, Escravidão e Cultura*, 1st ed.; Pires, A. L., Cardoso, S., Oliveira, R., Eds.; Daliana: Belo Horizonte, Brazil, 2006; pp. 29–49.
- 21. Togashi, M.; Sgarbieri, V.C. Avaliação nutricional da proteína e do óleo de semente de baru (*Dipteryx alata* Vog.). *Food Sci.Technol.* **1995**, *15*, 66-69.
- 22. Nazato, V.S.; Rubem-Mauro, L.; Vieira, N.A.G.; Rocha-Junior, D.S.; Silva, M.G.; Lopes, P.S.; Dal-Belo, C.A.; Cogo, J.C.; Santos, M.G.; Cruz-Höfling, M.A.; et al. *In vitro* antiophidian properties of *Dipteryx alata* Vogel bark extracts. *Molecules* **2010**, *15*, 5956–5970.
- Ferraz, M.C.; Parrilha, L.A.C.; Moraes, M.S.D.; Amaral Filho, J.; Cogo, J.C.; dos Santos, M.G.; Franco, L.M.; Groppo, F.C.; Puebla, P.; San Feliciano, A.; et al. The effect of lupane triterpenoids (*Dipteryx alata* Vogel) in the *in vitro* neuromuscular blockade and myotoxicity of two snake venoms. *Curr. Org. Chem.* 2012, *16*, 2717– 2723.
- Sasaki, Y.F.; Ohta, T.; Imanishi. H.; Watanabe, M.; Matsumoto, K.; Kato, T.; Shirasu, Y. Suppressing effects of vanillin, cinnamaldehyde, and anisaldehyde on chromosome aberrations induced by x-rats in mice. *Mutat.Res.*1990, 243, 299-302.
- Tsuda, H.; Uehara, N.; Iwahori, Y.; Asamoto, M.; Iigo, M.; Nagao, M.; Matsumoto, K.; Ito, M.; Hirono, I. Chemopreventive effects of beta-carotene, alpha-tocopherol and five naturally occurring antioxidants on initiation of hepatocarcinogenesis by 2-amino-3methylimidazo[4,5-f]quinoline in the rat. *Jpn. J. Cancer Res.* **1994**, 85, 1214-1219.
- 26. Raja, B.; Mol, S.D. The protective role of vanillic acid against acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *J. Pharm. Res.* **2010**, *3*, 1480-1484.
- 27. Tai, A.; Sawano, T.; Yazama, F.; Ito, H. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1810*, 170-177.
- 28. Tai, A.; Sawano, T.; Ito, H. Antioxidative properties of vanillic acid esters in multiple antioxidant assays. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76*, 314-318.
- 29. Prince, P.S.M.; Dhanasekar, K.; Rajakumar, S. Preventive effects of vanillic acid on lipids, bax, bcl-2 and myocardial infarcted size on isoproterenol- induced myodardial infracted rats: a biochemical and *in vitro* study. *Cardiovasc. Toxicol.* **2011**, *11*, 58-66.
- Itoh, A.; Isoda, K.; Kondoh, M.; Kawase, M.; Kobayashi, M.; Tamesada, M.; Yagi, K. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biol.Pharm. Bull.*2009, *32*, 1215-1219.
- Itoh, A.; Isoda, K.; Kondoh, M.; Kawase, M.; Watari, A.; Kobayashi, M.; Tamesada, M.; Yagi, K. Hepatoprotective effect of syringic and vanillic acid on CCl 4-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.* 2010, 33, 983-987.
- 32. Santosh Kumar, S.; Priyadarsini, K.I.; Sainis, K.B. Free radical scavenging activity of vanillin and o-vanillin using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. *Redox Rep.* **2002**, *7*, 35-40.
- 33. Lirdprapamongkol, K.; Kramb, J.P.; Suthiphongchai, T.; Surarit, R.; Srisomsap, C.; Dannhardt, G.; Svasti, J. Vanillin suppresses metastatic potential of human cancer cells

through PI3K inhibition and decreases angiogenesis *in vivo*. J. Agric.Food Chem. **2009**, 58, 3055-3063.

- 34. Liang, J.A.; Wu, S.L.; Lo, H.Y.; Hsiang, C.Y.; Ho, T.Y. Vanillin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression through down-regulation of nuclear factor-kappaB signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* **2009**, *75*, 151-157.
- 35. Tabassum, S.; Amir, S.; Arjmand, F.; Pettinari, C.; Marchetti, F.; Masciocchi, N.; Lupidi, G.; Pettinari, R. Mixed-ligand Cu(II)-vanillin Schiff base complexes; effect of coligands on their DNA binding, DNA cleavage, SOD mimetic and anticancer activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *60*, 216-232.
- Anter, J.; Romero-Jiménez, M.; Fernández-Bedmar, Z.; Villatoro-Pulido, M.; Analia, M.; Alonso-Moraga, A.; Muñoz-Serrano, A. Antigenotoxicity, cytotoxicity, and apoptosis induction by apigenin, bisabolol, and protocatechuic acid. *J. Med. Food* 2011, 14, 276-283.
- Heluany, N.F.; Homsi-Brandeburgo, M.I.; Giglio, J.R.; Prado-Franceschi, J.; Rodrigues-Simioni, L. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. *Toxicon* 1992, 30, 1203–1210.
- 38. Gutiérrez, J.M.; Núñez, J.; Díaz, C.; Cintra, A.C.; Homsi-Brandeburgo, M.I.; Giglio, J.R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu. Exp. Mol. Pathol.* **1991**, *55*, 217-229.
- 39. Pereira, M.F.; Novello, J.C.; Cintra, A.C.; Giglio, J.R.; Landucci, E.T.; Oliveira, B.; Marangoni, S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacucu) venom with low phospholipase A2 activity. *J. Protein Chem.* **1998**, *17*, 381-386.
- 40. Oshima-Franco, Y.; Leite, G.B.; Dal Belo, C.A.; Hyslop, S.; Prado-Franceschi, J.; Cintra, A.C.O.; Giglio, J.R.; Cruz-Höfling, M.A.; Rodrigues-Simioni, L. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *95*, 175–182.
- 41. Angulo, Y.; Olamendi-Portugal, T.; Alape-Girón, A.; Possani, L.D.; Lomonte, B. Structural characterization and phylogenetic relationships of myotoxin II from Atropoides (*Bothrops*) nummifer snake venom, a Lys49 phospholipase A(2) homologue. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2002**, *34*, 1268-1278.
- 42. M. de Oliveira, M.; Cavalcante, W.L.; Arruda, E.Z.; Melo, P.A.; Dal-Pai Silva, M.; Gallacci, M. Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. *Toxicon* **2003**, *42*, 373-379.
- Melo, R.F.; Farrapo, N.M.; Rocha Junior, D.S.; Silva, M.G.; Cogo, J.C.; Dal Belo, C.A.; Rodrigues Simioni, L.; Groppo, F.C.; Oshima-Franco, Y. Antiophidian mechanisms of medicinal plants. In *Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources*; Keller, R.B., Ed.; Nova Science: New York, NY, USA, 2009; pp. 249–262.
- 44. Cotrim, C.A.; de Oliveira, S.C.; Diz Filho, E.B.; Fonseca, F.V.; Baldissera, L.Jr.; Antunes, E.; Ximenes, R.M.; Monteiro, H.S.; Rabello, M.M.; Hernandes, M.Z.; de Oliveira Toyama, D.; Toyama, M.H. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. *Chem.Biol. Interact.* **2011**, *189*, 9-16.
- 45. Dos Santos, J.I.; Cardoso, F.F.; Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA₂ inhibition. *PLoS One* **2011**, *6*, e28521.
- 46. Li, C.M.; Zhang, Y.; Yang, J.; Zou, B.; Dong, X.Q.; Hagerman, A.E. The interaction of a polymeric persimmon proanthocyanidin fraction with Chinese cobra PLA2 and BSA. *Toxicon* **2013**, 67, 71-79.

- Resende, F.A.; Barbosa, L.C.; Tavares. D.C.; de Camargo, M.S.; de Souza Rezende, K.C.; e Silva, M.L.; Varanda, E.A. Mutagenicity and antimutagenicity of (-)-hinokinin a trypanosomicidal compound measured by *Salmonella* microsome and comet assays. *BMC Complement. Altern. Med.* 2012, *12*, 203.
- Müller, R.; Kikuchi, Y.; Probst, G.; Schechtman, L.; Shimada, H.; Sofuni, T.; Tweats, D. Tweats, ICH-harmonised guidance on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution. *Mutat. Res.* 1999, 436, 195–225.
- 49. Esteves-Pedro, N.M.; Borim, T.; Nazato, V.S.; Silva, M.G.; Lopes, P.S.; dos Santos, M.G.; Dal Belo, C.A.; Cardoso, C.R.P.; Varanda, E.A.; Groppo, F.C.; et al. *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of *Dipteryx alata* Vogel extract. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, *12*, 9.
- 50. Erdem, M.G.; Cinkilic, N.; Vatan, O.; Yilmaz, D.; Bagdas, D.; Bilaloglu, R. Genotoxic and anti-genotoxic effects of vanillic acid against mitomycin C-induced genomic damage in human lymphocytes *in vitro*. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2012**, *13*, 4993-4998.
- 51. Birosová, L.; Mikulásová, M.; Vaverková, S. Antimutagenic effect of phenolic acids. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacký Olomouc Czech. Repub.* **2005**, *149*, 489-491.
- 52. Stagos, D.; Kouris, S.; Kouretas, D. Plant phenolics protect from bleomycin-induced oxidative stress and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA102. *Anticancer Res.* **2004**, *24*, 743-745.
- 53. Shaughnessy, D.T.; Setzer, R.W.; DeMarini, D.M. The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in *Salmonella* TA104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites. *Mutat.Res*.2001, 480-481, 55-69.
- 54. Cintra-Francischinelli, M.; Silva, M.G.; Andreo-Filho, N.; Cintra, A.C.O.; Leite, G.B.; Cruz-Höfling, M.A.; Rodrigues-Simioni, L.; Oshima-Franco, Y. Effects of commonly used solubilizing agents on a model nerve-muscle synapse. *Lat. Am. J. Pharm.* **2008**, 27, 721–726.
- 55. Bülbring, E. Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **1946**, *1*, 38–61.
- 56. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Bacterial Reverse Mutation Test. Adopted: 21st July 1997. Available online: http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948418.pdf (accessed on 27 January 2014).
- 57. Varella, S.D.; Pozetti, G.L.; Vilegas, W.; Varanda, E.A. Mutagenic activity of sweepings and pigments from a household-wax factory assayed with *Salmonella typhimurium*. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*, 2029–2035.
- 58. Bernstein, L.; Kaldor, J.; McCann, J.; Pike, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.* **1982**, *97*, 267–281.

5.2 Artigo 2

Molecules 2014, 19, 5790-5805; doi:10.3390/molecules19055790



Article

An Isoflavone from *Dipteryx alata* Vogel is Active against the *in Vitro* Neuromuscular Paralysis of *Bothrops jararacussu* Snake Venom and Bothropstoxin I, and Prevents Venom-induced Myonecrosis

Miriéle C. Ferraz¹, Edson H. Yoshida¹, Renata V.S. Tavares², José C. Cogo³, Adélia C.O. Cintra⁴, Cháriston A. Dal Belo⁵, Luiz M. Franco⁶, Márcio G. dos Santos⁷, Flávia A. Resende⁸, Eliana A. Varanda⁸, Stephen Hyslop⁹, Pilar Puebla¹⁰, Arturo San Feliciano¹⁰ and Yoko Oshima-Franco^{1,*}

- ¹ Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, University of Sorocaba (UNISO), Rodovia Raposo Tavares, Km 92.5, 18023-000 Sorocaba, SP, Brazil; E-Mails: miriele.ferraz@gmail.com (M.C.F.); edsonyoshida@bol.com.br (E.H.Y.)
- ² Post-Graduate Program in Technological and Environmental Processes, University of Sorocaba (UNISO), Rodovia Raposo Tavares, Km 92.5, 18023-000 Sorocaba, SP, Brazil; E-Mail: renavasques@yahoo.com.br
- ³ Serpentarium of the Vale do Paraíba University (CEN—UNIVAP), Av Shishima Hifumi 2911, 12244-000 São José dos Campos, SP, Brazil; E-Mail: jccogo@univap.br
- ⁴ Department of Clinical, Toxicological and Bromatological Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University (USP), Via do Café S/N, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil; E-Mail: acocintra@hotmail.com
- ⁵ LANETOX, Federal University of Pampa (UNIPAMPA), Avenida Antonio Trilha 1847, 97300-000 São Gabriel, RS, Brazil; E-Mail: charistonbelo@unipampa.edu.br
- ⁶ Methodist University of Piracicaba, Rodovia do Açucar, Km 156, 13423-170 Piracicaba, SP, Brazil; E-Mail: lenof@terra.com.br
- ⁷ Post-Graduate Course in Environmental Sciences, Federal University of Tocantins (UFT), Av NS 15 ALC NO 14, 109 Norte, 77001-090 Palmas, TO, Brazil; E-Mail: galdino@uft.edu.br
- ⁸ Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Rodovia Araraquara-Jau, Km 1, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil; E-Mails: flaviabiomed@yahoo.com.br (F.A.R.); eavaranda@gmail.com (E.A.V.)

- ⁹ Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, 13083-887 Campinas, SP, Brazil; E-Mail: hyslop@fcm.unicamp.br
- ¹⁰ Department of Pharmaceutical Chemistry, Salamanca University, CIETUS, IBSAL, Salamanca 37007, Spain; E-Mails: puebla@usal.es (P.P.); asf@usal.es (A.S.F.)
- * Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: yoko.franco@prof.uniso.br; Tel.: +55-15-2101-7104; Fax: +55-15-2101-7112.

Received: 10 March 2014; in revised form: 22 April 2014 / Accepted: 24 April 2014 / Published:

Abstract: Snakebite is a neglected disease and serious health problem in Brazil, with most bites being caused by snakes of the genus Bothrops. Although serum therapy is the primary treatment for systemic envenomation, it is generally ineffective in neutralizing the local effects of these venoms. In this work, we examined the ability of 7,8,3'-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone (TM), an isoflavone from *Dipteryx alata*, to neutralize the neurotoxicity (in mouse phrenic nerve-diaphragm preparations) and myotoxicity (assessed by light microscopy) of Bothrops jararacussu snake venom in vitro. The toxicity of TM was assessed using the Salmonella microsome assay (Ames test). Incubation with TM alone (200 µg/mL) did not alter the muscle twitch tension whereas incubation with venom (40 µg/mL) caused irreversible paralysis. Preincubation of TM (200 µg/mL) with venom attenuated the venom-induced neuromuscular blockade by $84\% \pm 5\%$ (mean \pm SEM; n = 4). The neuromuscular blockade caused by bothropstoxin-I (BthTX-I), the major myotoxic PLA₂ of this venom, was also attenuated by TM. Histological analysis of diaphragm muscle incubated with TM showed that most fibers were preserved (only 9.2% \pm 1.7% were damaged; n = 4) compared to venom alone $(50.3\% \pm 5.4\%)$ of fibers damaged; n = 3), and preincubation of TM with venom significantly attenuated the venom-induced damage (only 17% \pm 3.4% of fibers damaged; n = 3; p < 0.05 compared to venom alone). TM showed no mutagenicity in the Ames test using Salmonella strains TA98 and TA97a with (+S9) and without (-S9) metabolic activation. These findings indicate that TM is a potentially useful compound for antagonizing the neuromuscular effects (neurotoxicity and myotoxicity) of *B. jararacussu* venom.

Keywords: ames test; bothropstoxin-I; 7,8,3'-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone; neuromuscular junction; *Salmonella* mutagenicity; snake venoms

1. Introduction

Envenomation by *Bothrops* snakes is characterized by local (pain, edema, inflammation, blistering, hemorrhage and necrosis) and systemic (coagulopathy, systemic hemorrhage, acute

kidney injury and circulatory shock) manifestations [1]. *Bothrops jararacussu* is a large pit viper found in southeastern Brazil and northern Argentina [2]. Envenomation by this species shares many of the foregoing features with other *Bothrops* species [3], with most of the clinical manifestations of envenoming being mediated predominantly by snake venom metalloproteases (SVMPs), serine proteases, phospholipases (PLA₂) and C-type lectins. Transcriptomic analysis has confirmed that these are indeed the major protein classes in this venom, with PLA₂ being particularly abundant: Lys49-PLA₂ homologs accounted for 83.2% of PLA₂ transcripts, acidic Asp49-for 0.6% and basic Asp49-PLA₂ for 0.1% [4].

In addition to the features indicated above, clinical studies in the early 1900s suggested that bites by *B. jararacussu* also involved systemic manifestations reminiscent of envenoming by the South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*, viz., neurotoxicity, blindness, blurred vision, difficulty in swallowing and paralysis [5], in addition to other unspecified signs of neurotoxicity [6–8]. In agreement with this, various studies using isolated vertebrate nerve-muscle preparations *in vitro* have shown that *B. jararacussu* venom [9,10] and PLA₂ from this venom [11–16] can cause neuromuscular blockade by pre- and post-synaptic mechanisms.

Serum therapy, the treatment of choice for snakebites, efficiently neutralizes the systemic manifestations but is generally ineffective against the local effects (edema, inflammation, hemorrhage and necrosis) of venoms [17]. Extensive local tissue damage leading to tissue loss after *Bothrops* bites can result in permanent disability and amputations [18,19]. Hence, there is a clinical and therapeutic impetus to develop alternatives for treating these local manifestations, with plant-derived bioactive products providing important candidate or lead molecules [20,21].

Several studies have shown that the neurotoxic and myotoxic effects of *B. jararacussu* venom and its PLA₂ myotoxins can be neutralized by some plant extracts and their isolated compounds [21–30]. In particular, a methanolic extract of bark from *Dipteryx alata* Vogel, a plant species native to the Brazilian cerrado, fully protects against the neuromuscular blockade caused by *B. jararacussu* venom, whereas a dichloromethane extract provides partial protection against the blockade caused by *B. jararacussu* and *C. d. terrificus* venoms [31]. Lupane triterpenoids (lupeol, lupenone, betulin and 28-OH-lupenone) from *D. alata* prevent the paralysis induced by *B. jararacussu* venom [32], whereas betulin and lupenone only partially neutralize the paralysis induced by *C. d. terrificus* venom [33].

To increase our understanding of the components involved in the protective action of *D. alata* extracts, in this study we examined the ability of 7,8,3'-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone (TM), an isoflavone from *D. alata* [32], to attenuate the neurotoxicity and myotoxicity of *B. jararacussu* venom and its main myotoxin, bothropstoxin-I (BthTX-I), in mouse phrenic nerve-diaphragm preparations *in vitro*. The mutagenicity (toxicity) of TM, as an indicator of it potential use as a clinical agent, was assessed in the Ames test using *Salmonella* strains TA 98 and TA 97a.

2. Results and Discussion

This work was based on three premises: (1) an understanding of the principal clinical manifestations of *B. jararacussu* envenomation [1]; (2) the low efficacy of antivenom against the local effects of *Bothrops* venoms [18,19]; and (3) the availability of a molecule, 7,8,3'-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone (TM) from *D. alata*, with potentially interesting activity against *B. jararacussu* snake venom.

2.1. Molecule

Figure 1 shows the chemical structure of TM from *D. alata* [32], a compound also found in *Xanthocercis zambesiaca* (Baker) plant extract [34].

Figure 1. Chemical structure of 7,8,3'-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone isolated from *D. alata* Vogel [32].



In preliminary screening for anti-snake venom activity, fraction F7 of a dichloromethane extract of *D. alata* bark [32] showed the best activity out of 11 fractions when tested against the neuromuscular activity of *B. jararacussu* venom [31]. Isoflavonoids are a large and very distinctive subclass of flavonoids, but only a few plants, including *D. alata*, have been reported to contain isoflavonoids [35]. Isoflavones are biologically active plant-food constituents that are common in the human diet and food industry, and are widely used as preservatives in pharmaceutical products [36]. This range of activities and uses suggested the possibility that isoflavones could be potentially useful as an adjuvant treatment for snakebites alongside standard serum therapy, particularly since antiserum shows little or no neutralizing activity towards the local effects of *Bothrops* venoms [18,19].

2.2. Pharmacological Assays

The ability of TM to inhibit the neuromuscular blockade caused by *B. jararacussu* venom was investigated in mouse phrenic nerve-diaphragm (PND) preparations. Figure 2 shows the characteristic irreversible neuromuscular blockade induced by *B. jararacussu* venom *in vitro* (Bjssu, 40 µg/mL, n = 6, * p < 0.05 compared to control), in agreement with that originally reported by Rodrigues-Simioni et al. [9]. Incubation with TM alone (200 µg/mL, n = 4) did not change the muscle twitch-tension responses, which were similar to those of preparations incubated with Tyrode solution (negative control; n = 6). Preincubation of TM (200 µg/mL)

with venom (40 μ g/mL) for 30 min prior to testing totally abolished the venom-induced neuromuscular blockade (n = 4, * p < 0.05 compared to venom alone).

Bothrops jararacussu venom is rich in PLA₂, most of which are Lys49-PLA₂, with considerably fewer basic and acidic Asp49-PLA₂ [4]. Bothropstoxin-I (BthTX-I) is the major Lys49-PLA₂ myotoxin and totally reproduces the *in vitro* neurotoxicity and myotoxicity of *B. jararacussu* venom [11]. This toxin acts presynaptically before causing membrane depolarization [15,37]. As shown in Figure 3A, incubation of PND preparations with BthTX-I (20 μ g/mL) mimicked the characteristic progressive, irreversible decrease in muscle twitch-tension caused by the venom. As with the venom, preincubation of BthTX-I (20 μ g/mL) with TM (200 μ g/mL) fully protected the PND against toxin-induced neuromuscular blockade (Figure 3B). When TM was added 10 min after BthTX-I there was still attenuation of the neuromuscular blockade, although this was much less marked than with the preincubation protocol (Figure 3C). These findings suggest that the protective action of TM against venominduced neuromuscular blockade most likely resulted from the inhibition of BthTX-I, presumably by attenuating the presynaptic activity of the toxin [15,37].

Figure 2. Twitch tension responses of indirectly stimulated PND incubated with 7,8,3'-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone (TM, 200 µg/mL), *B. jararacussu* (Bjssu) venom (40 µg/mL) or a mixture of TM (200 µg/mL) and venom (40 µg/mL). The TM + venom mixture was preincubated at 37 °C for 30 min prior to testing. The points are the mean \pm SEM of the number of experiments indicated in the figure. * p < 0.05 for TM + venom compared to venom alone.



Figure 3. Neuromuscular responses of indirectly stimulated PND incubated with BthTX-I (20 µg/mL) in the absence (**A**) and presence (**B**,**C**) of 7,8,3'-trihydroxy-4'- methoxyisoflavone (TM, 200 µg/mL). In (**B**), TM (200 µg/mL) was preincubated with BthTX-I (20 µg/mL) at 37 °C for 30 min before addition to the bath, whereas in (**C**) TM (200 µg/mL) was added separately (at *) 10 min after the addition of BthTX-I (20 µg/mL). Arrows show the moment of sample addition to the bath. Bar = tension of 5 g/cm; W = wash.



2.3. Quantitative Histological Analysis

To assess the anti-myotoxic activity of TM, diaphragm muscles exposed to different treatments (TM, venom or TM + venom) were analyzed by light microscopy, as described by Queiroz et al. [38] for mouse tibialis anterior muscle. Figure 4A shows a characteristic myographic recording of PND contractile activity during incubation with TM (200 μ g/mL) for 120 min; similar responses were observed in preparations incubated with Tyrode solution alone (results not shown). The percentage of damage cells in these two protocols was <10% [9.7% ± 1.6% (*n* = 6) for Tyrode solution and 9.2% ± 1.7% (*n* = 4) for TM-treated muscles].

In indirectly stimulated PND, *B. jararacussu* venom (40 µg/mL, n = 6) induced a transient contracture that was followed by progressive neuromuscular blockade of muscle twitches during the following 120 min (Figure 5A). In contrast to the foregoing controls, there was a marked increase in the percentage of damaged fibers (to $50.3\% \pm 5.4\%$; p < 0.05 compared to the Tyrode control) in diaphragms incubated with venom alone (40 µg/mL, n = 3) for 120 min (Figure 5B). In diaphragm muscle incubated with a mixture of TM (200 µg/mL) + venom (40 µg/mL) (Figure 5C, n = 3) there was a significant decrease in the percentage of damaged fibers ($17\% \pm 3.4\%$; p < 0.05 compared to venom alone). Although the venom produced complete neuromuscular blockade, quantitative analysis of the fibers showed that only 50% were damaged. This discrepancy may reflect the fact that muscle cross-sections do not allow observation of the entire fiber length. Although diaphragm muscle has a striking effect on the

physiological excitation-contraction coupling mechanism. As shown here, the preincubation of venom with TM was effective in protecting the muscle against venom-induced myotoxicity.

Figure 4. Histological analysis of muscle damage in PND incubated with or without 7,8,3'-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone (TM). Panel (**A**) shows a representative trace of PND incubated with TM (n = 4). The arrow indicates the addition of TM. Bar = tension of 5 g/cm. W = wash. Panels B and C show cross-sections of diaphragm muscle incubated with Tyrode solution alone (negative control; n = 6) (**B**) or TM alone (n = 4) (**C**). Note the normal appearance of the fibers (polygonal aspect and peripheral nuclei) in both panels. Bar = 50 µm in B and C.



In this work, we focused on the ability of TM to antagonize the neuromuscular action (neurotoxicity and myotoxicity) of *B. jararacussu* venom and its main PLA₂ myotoxin, BthTX-I. However, *B. jararacussu* venom has a variety of other biological activities (edema-formation, hemorrhage and lethality) against which it would be interesting to assess the neutralizing capacity of TM. Nevertheless, with the isolation procedure used in this study, the amount of isoflavone obtained was low, which severely limited the number of protocols and activities that could be tested. This limitation (low yield/availability of purified TM) is common to other phytochemical compounds with biological activity [40]. Nonetheless, as shown here, TM faithfully mimicked the protection against the venom-induced neuromuscular blockade seen with a crude extract of *D. alata* [31].

Figure 5. Neuromuscular responses of indirectly stimulated PND incubated with *B. jararacussu* venom (40 µg/mL) for 120 min (**A**). Notice the irreversible blockade. Venom was added at the arrow. Bar = tension of 5 g/cm. W = wash. Panel (**B**)—Cross-section of diaphragm muscle incubated with venom alone (40 µg/mL, n = 6). Note the edema and intense myonecrosis (muscle fiber atrophy, hyaline aspect, sarcolemmal disruption and myofibril lysis). Panel (**C**)—Cross-section of diaphragm muscle incubated with a mixture of TM (200 µg/mL) + venom (40 µg/mL). Note the normal appearance of the fibers (polygonal aspect and peripheral nuclei), but with occasional edema. Bar = 50 µm for B and C.



Several mechanisms have been proposed to explain the anti-snake venom activity of phytochemical compounds [21], with the specific interactions depending on the plant compound (tannins, coumarins, flavonoids, *etc.*) and the snake genus involved. In the case of TM, we suggest that its interaction with *B. jararacussu* venom and BthTX-I involves the hydroxyl groups at positions C-8 and C-7 of the isoflavone (see Figure 1). Since the neighboring hydroxyls are susceptible to radical formation [35], this chemical interaction would ultimately lead to a very reactive 7,8-quinone moiety that could modify specific sites in enzymes responsible for the local and systemic effects of the venom.

2.4. Salmonella Mutagenicity Assay

The toxicology of TM was assessed in the *Salmonella* mutagenicity assay, using test strains TA97a and TA98 that can be reverted by frameshift mutagens [41,42]. Although the Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) [41] recommends the use of at least five *Salmonella* strains to meet regulatory demands, the low yield of isoflavonoid limited the use of five strains in this work. On the other hand, satisfactory toxicological results have been obtained using only TA97a and TA98 [43] or TA97a and TA100 [44], and

were considered as valid mutagenic screening. In our experimental conditions a GC frameshift was evaluated. The mutagenicity assays showed that TM did not increase the number of revertant colonies relative to the negative control, indicating no mutagenicity for this compound (Table 1).

Table 1. Assessment of the mutagenicity of 7,8,3'-trihydroxy-4'methoxyisoflavone (TM) against *S. typhimurium*. The table shows the revertants per plate, the standard deviation and the mutagenicity index (in brackets) for strains TA98 and TA97a after treatment with TM.

| TM | | | | | | | | |
|-----------|------------------|----------------------------|---------------------|------------------------|--|--|--|--|
| Treatment | | TA 98 | TA 97a | | | | | |
| mg/plate | -S9 | +S9 | -S9 | +\$9 | | | | |
| DMSO | 20 ± 2 | 30 ± 2 | 151 ± 8 | 143 ± 8 | | | | |
| 0.19 | 20 ± 4 (1.0) | 34 ± 3 (1.1) | 194 ± 4 (1.3) | 172 ± 4 (1.2) | | | | |
| Control+ | $1319\pm41~^a$ | 1696 ± 41 ^b | $1875 \pm 62^{\ a}$ | 1623 ± 48 $^{\rm b}$ | | | | |

The values are the mean \pm SEM of two determinations. DMSO: dimethyl sulfoxide (50 µL/plate; negative control); Control+: positive control; ^a 4-nitro-*o*-phenylenediamine (10 µg/plate); ^b 2-anthramine (1.25 µg/plate).

The genes affected in *Salmonella* strains TA98 and TA97a were *his*D6610 and *his*D3052, respectively, although these strains also contained the mutations Δurv B, *rfa* and pKM101. The former was designed to enhance the mutagenicity of compounds, presumably through the nucleotide excision repair system [42] that extended into a gene for biotin synthesis and required the addition of biotin to the culture medium because of the deletion in this region. The *rfa* mutation changes the properties of the bacterial cell wall and results in partial loss of the lipopolysaccharide (LPS) barrier, thereby increasing the permeability of cells to certain chemicals; this mutation is generally detected based on the altered sensitivity to crystal violet. The R factor plasmid (pKM101) makes the strains more responsive to a variety of mutagens [45].

3. Experimental

3.1. Plant Material and Extraction

Bark samples were collected from an adult *D. alata* Vogel tree in Pedro Afonso (Tocantins, Brazil) in December 2007 and identified by Dr. Roseli B. Torres (Institute of Agronomy of Campinas—IAC). A voucher specimen was deposited in the herbarium of the IAC (IAC 50629). The bark (1.269 kg) was dried at 37 °C for 48 h and then powdered, ground in a mill, macerated for 5 days (200 g in 2 L of 70% ethanol) and the suspension then percolated (protected from light) at 20 drops/min, resulting in a 20% (m/v) hydroalcoholic extract. The extract was concentrated under reduced pressure and lyophilized to yield a final residue of 170 g that corresponded to an extraction efficiency of 85% [46].

3.1.1. Isolation of 7,8,3'-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone

For isolation of the isoflavone, lyophilized extract (50 g) was dissolved in a methanolwater mixture (80:20, v/v) and partitioned successively with the corresponding solvents to yield, after concentration, hexane (1.5 g), CH₂Cl₂ (18 g), EtOAc (3.7 g) and MeOH (21 g) residues. The CH₂Cl₂ fraction was subjected to silica gel flash column chromatography and eluted with hexane-EtOAc (9:1). This procedure yielded 12 subfractions that were further successively flash-chromatographed on silica gel and purified by Sephadex LH-20 column chromatography and eluted with hexane-CH₂Cl₂-MeOH (2:2:1) to yield 18 compounds, including 19 mg of 7,8,3'-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone (TM), characterized [32] as a yellow amorphous solid. IR (KBr) cm⁻¹: 3429, 1619, 1604, 1290, 1124. ¹H-NMR (CD₃OD) δ : 3.80 (s, 3H), 6.93 (s, 1H), 6.94 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.17 (s, 1H). ¹³C-NMR (CD₃OD) δ : 56.4 (CH₃), 112.6 (CH), 115.4 (CH), 117.3 (CH), 117.4 (CH), 118.8 (C), 121.6 (CH), 125.3 (C), 126.3 (C), 134.1 (C), 147.4 (C), 147.8 (C), 149.2 (C), 171.0 (C), 154.6 (CH), 178.5 (C).

3.1.2. Isoflavone Solubilization

For the pharmacological assays, fresh solutions of TM were prepared daily by dissolving in 30 μ L of DMSO (CAQ – Casa da Química Ind. E Com. Ltd, Diadema, SP, Brazil); this volume of solvent did not alter the basal response of the neuromuscular preparation [47,48].

3.2. Pharmacological Assays

3.2.1. Venom and Purification of BthTX-I

Bothrops jararacussu venom was collected from two adult specimens kept in the **Serpentário do Centro de Estudos da Natureza (CEN)**. The venom was lyophilized and certified by Dr. José Carlos Cogo (Vale do Paraiba University—UNIVAP, São José dos Campos, SP, Brazil). BthTX-I was purified and its identity confirmed as described by Homsi-Brandeburgo et al. [11].

3.2.2. Animals

Male Swiss white mice (26-32 g) were supplied by Anilab (Animais de Laboratório, Paulínia, SP, Brazil). The animals were housed at $25 \pm 3 \text{ °C}$ on a 12 h light/dark cycle and had access to food and water *ad libitum*. This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research of Vale do Paraiba University (protocol no. A013/CEUA/2011) and the experiments were done in accordance with the general guidelines of the Brazilian Society for Laboratory Animal Science (SBCAL).

3.2.3. Mouse Phrenic Nerve-Diaphragm Muscle (PND) Preparation

The PND preparation [49] was obtained from mice anesthetized with halothane (Cristália, Itapira, SP, Brazil) and killed by exsanguination. The diaphragm was removed and mounted under a tension of 5 g/cm in a 5 mL organ bath containing aerated Tyrode solution (control) of the following composition (mM): NaCl 137, KCl 2.7, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 0.49, NaH₂PO₄ 0.42, NaHCO₃ 11.9 and glucose 11.1. After equilibration with 95% O₂/5% CO₂ (ν/ν), the pH of this solution was 7.0. The preparations were indirectly stimulated with supramaximal stimuli (4× threshold, 0.06 Hz, 0.2 ms) delivered from a stimulator (model ESF-15D, Ribeirão Preto, SP, Brazil) to the nerve by bipolar electrodes. Isometric twitch tension was recorded with a force displacement transducer (cat. no. 7003, Ugo Basile, Varese, Italy) coupled to a 2-channel Gemini physiograph recorder (cat. no. 7070, Ugo Basile) via a basic preamplifier (cat. no. 7080, Ugo Basile) [33]. The preparations were allowed to stabilize for at least 20 min before initiating the treatments described below.

Control preparations were incubated with Tyrode solution alone (n = 6), whereas other preparations were incubated with TM (200 µg/mL, n = 4), venom (40 µg/mL, n = 6) or a mixture of TM + venom preincubated for 30 min at 37 °C prior addition to the organ bath (n = 4) [33]. BthTX-I (20 µg/mL) was assayed in two protocols: in one, PND preparations were incubated with toxin followed by the addition of TM (200 µg/mL) while in the other the toxin was preincubated with TM (200 µg/mL) prior to testing in PND.

3.2.4. Quantitative Histological Analysis

At the end of the incubations (120 min), the preparations from the various protocols (control, TM, venom and venom + TM) were processed for histological analysis. The preparations (n = 3 for each treatment) were fixed in Bouin solution and processed by routine morphological techniques. Cross-sections (5 µm thick) of diaphragm muscle were stained with 0.5% (w/v) hematoxylin-eosin for examination by light microscopy. Tissue damage (edema, intense myonecrosis characterized by muscle fiber atrophy, a hyaline aspect, sarcolemmal disruption and myofibril lysis) was expressed as a myotoxicity index (MI), defined as (the number of damaged muscle cells/the total number of cells) × 100 in three non-overlapping, non-adjacent areas of each preparation [28].

3.2.5. In vitro Mutagenicity Assay

Mutagenic activity was evaluated by the *Salmonella* microsome assay, using the *Salmonella typhimurium* test strains TA98 and TA97a, kindly provided by Dr. B.N. Ames (Berkeley, CA, USA), with (+S9) and without (–S9) metabolization, by the preincubation method [50]. As discussed in the Results section, the OECD [41] recommends the use of five strains (*S. typhimurium* 1535, TA97a, TA98, TA100, TA102), but this was not feasible in this study because of the low yield of isoflavonoid during extraction. The strains were grown from frozen cultures overnight for 12–14 h in Oxoid Nutrient Broth No. 2. The metabolic activation mixture (S9 fraction), prepared from livers of Sprague–Dawley rats treated with the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 (500 mg/kg), was purchased from Molecular

Toxicology Inc. (Boone, NC, USA) and freshly prepared before each test. The metabolic activation system consisted of 4% S9 fraction, 1% 0.4 M MgCl₂, 1% 1.65 M KCl, 0.5% 1 M D-glucose-6-phosphate disodium, 4% 0.1 M NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), 50% 0.2 M phosphate buffer and 39.5% sterile distilled water. The isoflavone was dissolved in DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) to provide a non-toxic concentration of 0.19 mg/plate. This concentration was added to 0.5 mL of 0.2 M phosphate buffer, or to 0.5 mL of 4% S9 mixture, with 0.1 mL of bacterial culture and then incubated at 37 °C for 20-30 min. Subsequently, 2 mL of top agar [0.6% agar, histidine and biotin (0.5 mM each) and 0.5% NaCl] was added and the mixture poured onto a plate containing minimal agar. The plates were incubated at 37 °C for 48 h and the His+ revertant colonies were counted manually. All experiments were done only in duplicate because of the low amount of isoflavone available. The use of duplicate plating is acceptable when scientifically justified [41]. The results were analyzed with the statistical software package Salanal 1.0 (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, from Research Triangle Institute, Research Triangle Park, NC, USA), using the model of Bernstein et al. [51]. The mutagenic index (MI), defined as the average number of revertants per plate with the test compound divided by the average number of revertants per plate with the negative (solvent) control, was also calculated. A sample was considered positive when the MI was equal to or greater than two for at least one of the concentrations, and if it had a reproducible dose-response curve [52]. The standard mutagen used as a positive control in experiments without the S9 mix was 4-nitro-o-phenylenediamine (NOPD, 10 µg/plate). In experiments with S9 activation, 2-anthramine (2-AA, 1.25 µg/plate) was used. DMSO (50 μ L/plate) served as the negative (solvent) control.

3.2.6. Statistical Analysis

Each pharmacological protocol was repeated at least four times and the results are shown as the mean \pm SEM. The number of experiments (*n*) is indicated in the corresponding figure legend. Student's *t*-test was used for statistical comparison of the data and the confidence level was set as 5% ($\alpha = 0.05$).

4. Conclusions

In conclusion, the bioactive isoflavone, 7,8,3'-trihydroxy-4'-methoxyisoflavone (TM) from *D. alata* Vogel efficiently counteracted the myotoxicity and neuromuscular activity of *B. jararacussu* venom and its major myotoxin, BthTX-I, *in vitro*. TM was not mutagenic in *S. typhimurium* strains TA 97a and TA 98, indicating its safety. The results of this study reinforce the potential of TM for therapeutic use in the treatment of venomous snakebites.

Acknowledgments

The authors thank Roseli B. Torres for plant identification. This study was supported by FAPESP (grant nos. 04/09705-8, 07/53883-6, 08/50669-6, 08/52643-4 and 08/11005-5), CAPES/Prosup, PROBIC/Uniso and USAL:18KAC9/463AC01.

Author Contributions

MCF and EHY did the experimental work. RVST was responsible for fractionation of the lyophilized extract. JCC provided and certified the snake venom. ACOC purified the myotoxin and confirmed its identity. MGS and CADB were responsible for collection of plant samples in Tocantins. FAF and EAV interpreted the *Salmonella* microsome assay. SH contributed to the writing and editing of the manuscript. LMF, PP, ASF and YOF were responsible for isolation and identification of the isoflavonoid from *D. alata*. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Warrell, D.A. Snakebites in central and south america: Epidemiology, clinical features and clinical management. In *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*; Campbell, J.A., Lamar, W.W., Eds.; Comstock Publishing Associates/Cornell University Press: Ithaca; NY, USA, **2004**; Volume 2, pp. 709–761.
- Campbell, J.A.; Lamar, W.W. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere; Comstock Publishing Associates/Cornell University Press: Ithaca; NY, USA, 2004; p. 870.
- Milani Junior, R.; Jorge, M.T.; e Campos, F.P.; Martins, F.P.; Bousso, A.; Cardoso, J.L.C.; Ribeiro, L.A.; Fan, H.W.; França, F.O.S.; Sano-Martins, I.S.; et al. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): Clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. *Q. J. Med.* **1997**, *90*, 323–334.
- Kashima, S.; Robert, P.G.; Soares, A.M.; Astolfi-Filho, S.; Pereira, J.O.; Giuliati, S.; Faria Junior, M.; Xavier, M.A.S.; Fontes, M.R.M.; Giglio, J.R.; et al. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I—gene expression profile of highly expressed phospholipases A₂. *Biochimie* 2004, *86*, 211–219.
- 5. Brazil, V. Do envenamento ophidico e seu tratamento. *Collet. Trab. Inst. Butantan* **1901**, *1*, 31–55.
- Vellard, J.A. Serpentes venenosas. In *Terapêutica Clínica*; Cardini, C., Beretervide, J.J., Eds.; Libreria y Editorial "El Ateneo": Buenos Aires; Argentina, **1945**; Volume 4, pp. 265–273.

- Alves, E. *Medicina de Urgência*, 3rd ed.; Livraria Atheneu: Rio de Janeiro, Brazil, 1956; p. 562.
- 8. Teixeira, R. Forma grave do acidente por ofídios da sub família Crotalinae. *Ann. Acad. Med. Bahia* **1979**, *2*, 109–135.
- Rodrigues-Simioni, L.; Borgese, N.; Ceccarelli, B. The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on frog nerve-muscle preparation. *Neuroscience* 1983, 10, 475–489.
- Zamunér, S.R.; Cruz-Höfling, M.A.; Corrado, A.P.; Hyslop, S.; Rodrigues-Simioni, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon* 2004, 44, 259–271.
- Homsi-Brandeburgo, M.I.; Queiroz, L.S.; Santo-Neto, H.; Rodrigues-Simioni, L.; Giglio, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon* 1988, 26, 615–627.
- Heluany, N.F.; Homsi-Brandeburgo, M.I.; Giglio, J.R.; Prado-Franceschi, J.; Rodrigues-Simioni, L. Effects induced by bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. *Toxicon* 1992, *30*, 1203–1210.
- Andrião-Escarso, S.H.; Soares, A.M.; Rodrigues, V.M.; Ângulo, Y.; Díaz, C.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M.; Giglio, J.R. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: Effects of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie* 2000, 82, 755–763.
- Bonfin, V.L.; Toyama, M.H.; Novello, J.C.; Hyslop, S.; Oliveira, C.R.; Rodrigues-Simioni, L.; Marangoni, S. Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. *J. Protein Chem.* 2001, 20, 239–245.
- Oshima-Franco, Y.; Leite, G.B.; Dal Belo, C.A.; Hyslop, S.; Prado-Franceschi, J.; Cintra, A.C.O.; Giglio, J.R.; Cruz-Höfling, M.A.; Rodrigues-Simioni, L. The presynaptic activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2004, 95, 175–182.
- Ponce-Soto, L.A.; Bonfim, V.L.; Rodrigues-Simioni, L.; Novello, J.C.; Marangoni, S. Determination of primary structure of two isoforms 6–1 and 6–2 PLA₂ D49 from *Bothrops jararacussu* snake venom and neurotoxic characterization using *in vitro* neuromuscular preparation. *Protein J.* 2006, 25, 147–155.
- Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B.; León, G.; Rucavado, A.; Chaves, F.; Angulo, Y. Trends in snakebite envenomation therapy: Scientific, technological and public health considerations. *Curr. Pharm. Des.* 2007, 13, 2935–2950.
- Da Silva, N.M.V.; Arruda, E.Z.; Murakami, Y.L.B.; Moraes, R.A.M.; El-Kik, C.Z.; Tomaz, M.A.; Fernandes, F.F.A.; Oliveira, C.Z.; Soares, A.M.; Gigliio, J.R.; *et al.* Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venom in mouse model. *Toxicon* 2007, *50*, 196– 205.

- Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B.; León, G.; Alape-Girón, A.; Flores-Díaz, M.; Sanz, L.; Angulo, Y.; Calvete, J.J. Snake venomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J. Proteomics* 2009, 72, 165–182.
- 20. Mors, W.B.; Nascimento, M.C.; Pereira, B.M.; Pereira, N.A. Plant natural products active against snake bite—The molecular approach. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 627–642.
- Melo, R.F.; Farrapo, N.M.; Rocha Junior, D.S.; Silva, M.G.; Cogo, J.C.; Dal Belo, C.A.; Rodrigues Simioni, L.; Groppo, F.C.; Oshima-Franco, Y. Antiophidian mechanisms of medicinal plants. In *Flavonoids: Biosynthesis, Biological Effects and Dietary Sources;* Keller, R.B., Ed.; Nova Science: New York, NY, USA, 2009; pp. 249–262.
- 22. Melo, P.A.; Nascimento, M.C.; Mors, W.B.; Suarez-Kurtz, G. Inhibition of the myotoxic and hemorrhagic activities of crotalid venoms by *Eclipta prostrata* (Asteraceae) extracts and constituents. *Toxicon* **1994**, *32*, 595–603.
- Oshima-Franco, Y.; Alves, C.M.V.; Andréo Filho, N.; Gerenutti, M.; Cintra, A.C.O.; Leite, G.B.; Rodrigues-Simioni, L.; Silva, M.G. Neutralization of the neuromuscular activity of bothropstoxin-I, a myotoxin from *Bothrops jararacussu* snake venom, by a hydroalcoholic extract of *Casearia sylvestris* sw (guaçatonga). *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 2005, 11, 465–478.
- Cavalcante, W.L.; Campos, T.O.; Dal Pai-Silva, M.; Pereira, P.S.; Oliveira, C.Z.; Soares, A.M.; Gallacci, M. Neutralization of snake venom phospholipase A₂ toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. *J. Ethnopharmacol.* 2007, *112*, 490–497.
- Cintra-Francischinelli, M.; Silva, M.G.; Andréo-Filho, N.; Gerenutti, M.; Cintra, A.C.O.; Giglio, J.R.; Leite, G.B.; Cruz-Höfling, M.A.; Rodrigues-Simioni, L.; Oshima-Franco, Y. Antibothropic action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae) extracts. *Phytother. Res.* 2008, 22, 784–790.
- Camargo, T.M.; Nazato, V.S.; Silva, M.G.; Cogo, J.C.; Groppo, F.C.; Oshima-Franco, Y. Bothrops jararacussu venom-induced neuromuscular blockade inhibited by Casearia gossypiosperma Briquet hydroalcoholic extract. J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. 2010, 16, 432–441.
- Farrapo, N.M.; Silva, G.A.A.; Costa, K.N.; Silva, M.G.; Cogo, J.C.; Dal Belo, C.A.; Santos, M.G.; Groppo, F.C.; Oshima-Franco, Y. Inhibition of *Bothrops jararacussu* venom activities by *Plathymenia reticulata* Benth extracts. *J. Venom Res.* 2010, 2, 52– 58.
- Oshima-Franco, Y.; Rosa, L.J.R.; Silva, G.A.A.; Amaral Filho, J.; Silva, M.G.; Lopes, P.S.; Cogo, J.C.; Cintra, A.C.O.; da Cruz-Höfling, M.A. Antibothropic action of *Camellia sinensis* extract against the neuromuscular blockade by *Bothrops jararacussu* snake venom and its main toxin, bothropstoxin-I. In *Pharmacology*; Gallelli, L., Ed.; Intechopen: Croatia, Croatia, 2012; pp. 469–489.
- 29. Tribuiani, N.; da Silva, A.M.; Ferraz, M.C.; Silva, M.G.; Bentes, A.P.G.; Graziano, T.S.; dos Santos, M.G.; Cogo, J.C.; Varanda, E.A.; Groppo, F.C.; et al. *Vellozia flavicans*

Mart. ex Schult. hydroalcoholic extract inhibits the neuromuscular blockade induced by *Bothrops jararacussu* venom. *BMC Complement. Altern. Med.* **2014**, *14*, 48.

- Veronese, E.L.; Esmeraldino, L.E.; Trombone, A.P.; Santana, A.E.; Bechara, G.H.; Kettelhut, I.; Cintra, A.C.; Giglio, J.R.; Sampaio, S.V. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops jararacussu* venom and its two major myotoxins, BthTX-I and BthTX-II, by the aqueous extract of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. (Apocynaceae). *Phytomedicine* 2005, *12*, 123–130.
- Nazato, V.S.; Rubem-Mauro, L.; Vieira, N.A.G.; Rocha-Junior, D.S.; Silva, M.G.; Lopes, P.S.; Dal-Belo, C.A.; Cogo, J.C.; Santos, M.G.; Cruz-Höfling, M.A.; et al. *In vitro* antiophidian properties of *Dipteryx alata* Vogel bark extracts. *Molecules* 2010, *15*, 5956–5970.
- Puebla, P.; Oshima-Franco, Y.; Franco, L.M.; dos Santos, M.G.; da Silva, R.V.; Rubem-Mauro, L.; San Feliciano, A. Chemical constituents of the bark of *Dipteryx alata* Vogel, an active species against *Bothrops jararacussu* venom. *Molecules* 2010, *15*, 8193–8204.
- Ferraz, M.C.; Parrilha, L.A.C.; Moraes, M.S.D.; Amaral Filho, J.; Cogo, J.C.; dos Santos, M.G.; Franco, L.M.; Groppo, F.C.; Puebla, P.; San Feliciano, A.; et al. The effect of lupane triterpenoids (*Dipteryx alata* Vogel) in the *in vitro* neuromuscular blockade and myotoxicity of two snake venoms. *Curr. Org. Chem.* 2012, *16*, 2717–2723.
- Bezuidenhout, S.C.; Bezuidenhout, B.C.B.; Ferreira, D. α-Hydroxydihydrochalcones and related 1,3-diarylpropan-2-ones from *Xanthocercis zambesiaca*. *Phytochemistry* **1988**, 27, 2329–2334.
- 35. Dewick, P.M. Isoflavonoids. In *The Flavonoids Advances in Research Since 1986*; Harborne, J.B., Ed.; Chapman & Hall/CRC: London, UK, **1994**; pp. 117–386.
- 36. Lampe, J.W. Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *J. Nutr.* **2003**, *133*, (Suppl.) 956s–964s.
- Correia-de-Sá, P.; Noronha-Matos, J.B.; Ferreirinha, F.; Marques, P.; Soares, A.M.; Carvalho, C.; Cavalcante, W.L.; Gallacci, M. Bothropstoxin-I reduces evoked acetylcholine release from rat motor nerve terminals: Radiochemical and real-time videomicroscopy studies. *Toxicon* 2013, *61*, 16–25.
- Queiroz, L.S.; Santo Neto, H.; Rodrigues-Simioni, L.; Prado-Franceschi, J. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 1984, 22, 339–346.
- Chaudhry, I.A.; Nitahara, K.; Nagashima, H.; Vizi, E.S. Neurochemical evidence that [Ca²⁺]_o antagonizes the effect of neomycin on acetylcholine release from mouse hemidiaphragm preparation: An attempt to assess the margin to safety. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **1995**, *39*, 494–497.
- 40. Harborne, J.B. *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, 3rd ed.; Chapman & Hall: London, UK, **1998**.
- 41. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Bacterial Reverse Mutation Test. Adopted: 21st July 1997. Available online: http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948418.pdf (accessed on 27 January 2014).
- Kaur, K.; Mathur, N.; Bhatnagar, P. Comparative study of usage of microbial strains for monitoring waste water treatment plants. *Univers. J. Environ. Res. Technol.* 2012, 2, 26– 37.
- 43. Vedmaurthy, R.B.; Padmanabhan, S.; Vijayan, M.; Jamal, Z.A.; Kunjumman, J.; Narayanan, M.L. Compatibility of different solvents with *Salmonella typhimurium* mutant strains in bacterial reverse mutation assay. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2012**, *4*, 283–284.
- 44. Swartz, C.; Parks, N.; Schaaper, R.M.; Demarini, M. General enhancement of mutagenic potency of various mutagens due to deleted genes in the *uvr*B strains TA 98 and TA 100 of *Salmonella* compared with strains containing only a point mutation in *uvr*B. U.S. Environmental Protection Agency. Presented at The 9th International Conference on Environmental Mutagens, and 36th Annual Meeting of the International Conference on Environmental Mutagen Society, San Francisco, CA, USA, 3–8 September 2005. Available online: http://www.sciencedirect.com/science/journal/00275107/577/supp/S (accessed on 28 January 2014).
- 45. Mortelmans, K.; Zeiger, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* **2009**, *455*, 29–36.
- Esteves-Pedro, N.M.; Borim, T.; Nazato, V.S.; Silva, M.G.; Lopes, P.S.; dos Santos, M.G.; Dal Belo, C.A.; Cardoso, C.R.P.; Varanda, E.A.; Groppo, F.C.; et al. *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of *Dipteryx alata* Vogel extract. *BMC Complement. Altern. Med.* 2012, *12*, 9.
- Cintra-Francischinelli, M.; Silva, M.G.; Andreo-Filho, N.; Cintra, A.C.O.; Leite, G.B.; Cruz-Höfling, M.A.; Rodrigues-Simioni, L.; Oshima-Franco, Y. Effects of commonly used solubilizing agents on a model nerve-muscle synapse. *Lat. Am. J. Pharm.* 2008, 27, 721–726.
- 48. Oshima, M.; Leite, G.B.; Rostelato-Ferreira, S.; Cruz-Höfling, M.A.; Rodrigues-Simioni, L.; Oshima-Franco, Y. Insights of the effects of polyethylene glycol 400 on mammalian and avian nerve terminals. *Muscle Nerve* **2010**, *41*, 540–546.
- 49. Bülbring, E. Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br. J. Pharmacol.* **1946**, *1*, 38–61.
- 50. Maron, D.M.; Ames, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* **1983**, *113*, 173–215.
- 51. Bernstein, L.; Kaldor, J.; McCann, J.; Pike, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.* **1982**, *97*, 267–281.
- 52. Varella, S.D.; Pozetti, G.L.; Vilegas, W.; Varanda, E.A. Mutagenic activity of sweepings and pigments from a household-wax factory assayed with *Salmonella typhimurium*. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*, 2029–2035.

Sample Availability: Not available. © 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/).

6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que a isoflavona, 7,8,3 '-trihidroxi-4'-metoxiisoflavona da *Dipteryx alata* Vogel, é segura sob o parâmetro mutagênico investigado com as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA97a e TA98. Além disso, os resultados obtidos na investigação dos compostos fenólicos de *D. alata* indicaram a ausência de qualquer atividade mutagênica pelo teste de Ames, que é uma importante garantia da utilização segura em humanos dos compostos fenólicos.

REFERÊNCIAS

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

ANDREASSI, M. G. et al. Genetic instability and atherosclerosis: can somatic mutation account for the development of cardiovascular diseases? **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 4, p. 265-269, 2000.

BENIGNI, R.; BOSSA, C. Structure alerts for carcinogenicity, and the Salmonella assay system: A novel insight through the chemical relational databases technology. **Mutation Research**, n. 659, p. 248–261, 2008.

BERNSTEIN, L. et al. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from Salmonella test. **Mutation Research**, v. 97, p. 267-281, 1982.

BOERSMA, M. G. et al. Regioselectivity and reversibility of the glutathione conjugation of quercetin quinone methide. **Chemical research in toxicology**, v. 13, n. 3, p. 185-191, Mar 2000.

BRUNE, M.; ROSSANDER, L.; HALLBERG, L. Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 43, p. 547-548, 1989.

CETESB. **Companhia Ambiental do Estado de São Paulo**, 1996-2013. Disponivel em: <<u>http://www.cetesb.sp.gov.br/tecnologia-ambiental/laboratorios/113-ensaios></u>. Acesso em: 23 jan. 2013.

CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents, n. 26, p. 343-356, 2005.

CZEDER, L. P. et al. Baru almonds from different regions of the Brazilian Savanna: Implications on physical and nutritional characteristics. **Agricultural Sciences**, v. 3, n. 5, p. 745-754, 2012.

ESTEVES-PEDRO, N. M. et al. In vitro and in vivo safety evaluation of Dipteryx alata Vogel extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 9, p. 1-9, 2012. ISSN 1472-6882.

FERNANDES, D. C. et al. Nutritional composition and protein value of the baru (Dipteryx alata Vog.) almond from the Brazilian Savanna. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 90, p. 1650-1655, 2010.

GARDNER, J. G.; SNUSTAD, D. P. Genética. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à Genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 726 p.

HARBORNE, J. B. Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. 3. ed. London: Chapman & Hall, 1998.

IBAMA. **Monitoramento do bioma cerrado**. Brasília, DF. Ministério do Meio Ambiente. 2008-2009.

IBAMA. Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite acordo de cooperação técnica MMA/IBAMA. Brasília, DF. Ministério do Meio Ambiente. 2011.

KAGAN, V. E.; TYURINOV, Y. Y. Recycling and redox cycling of phenolic antioxidants.. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 854, p. 425-434, 1998.

LEE, S.; MONNAPPA, A. K.; MITCHELL, R. J. Biological activities of lignin hydrolysaterelated compounds. **Biochemistry and Molecular Biology Reports**, v. 45, p. 265-275, 2012.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.

MENDONÇA, R. C. et al. Flora vascular do Bioma Cerrado: checklist com 12.356 espécies. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado:** ecologia e flora. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. v. 2, p. 1279.

MILANI JÚNIOR, R. et al. Snake bites by the jararacuçu (Bothrops jararacussu): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. **The Quarterly Journal of Medicine**, v. 90, p. 323-334, 1997.

MIRSHAFIEY, A. Venom therapy in multiple sclerosis. **Neuropharmacology**, v. 53, p. 353-361, 2007.

MOREIRA, R. R. D. et al. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de Paepalanthus latipes (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 11-19, 2002.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microssome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29-60, 2000.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, Feb 2000.

NAZATO, V. S. et al. In Vitro Antiophidian Properties of Dipteryx alata Vogel Bark Extracts. **Molecules**, v. 15, p. 5956-5970, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

OLIVEIRA, D. P. **Corantes como importante classe de contaminantes ambientais - um estudo de caso**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, 2005.

POSTREL, V. Of Mice and Men - Entrevista com Bruce Ames. **Reason.com**, Nov 1994. ISSN http://reason.com/archives/1994/11/01/of-mice-and-men.

PUEBLA, P. et al. Chemical Constituents of the Bark of Dipteryx alata Vogel an Active Species against Bothrops jararacussu Venom. **Molecules**, v. 15, p. 8193-8204, 2010.

RESENDE, F. A. et al. Mutagenicity of Flavonoids Assayed by Bacterial Reverse Mutation (Ames) Test. **Molecules**, v. 17, p. 5255-5268, 2012.

ROSS, C. A.; MARGOLIS, R. L. Neurogenetics: insights into degenerative diseases and approaches to schizophrenia. **Clinical Neuroscience Research**, v. 5, n. 1, p. 3-14, Sep 2005.

SANO, S. M.; BRITO, M. A. D.; RIBEIRO, J. F. B. Baru: Biologia e uso. In: VIEIRA, R. F., et al. **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa , 2006.

SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Florianópolis: Editora Universidade UFSC, 2000.

TAKEMOTO, E. et al. Chemical composition of seeds and oil of baru (Dipteryx alata Vog.) native from Pirenópolis, State of Goiás. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, p. 113-117, 2001. ISSN 0073-9855.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com Salmonella typhimurium (teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 81-112.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências** Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006. ISSN 1808-4532.

VARGAS, V. M. F.; MOTTA, W. E. P.; HENRIQUES, J. A. E. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. **Mutation Research**, v. 319, p. 31-45, 1993.

VERA, R. et al. Chemical characteristics of baru almonds (Dipteryx alata Vog.) from the Savannah of Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, p. 112-118, 2009.

WATERS, M. D.; STACK, H. F.; JACKSON, M. A. Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 437, p. 21-49, 1999.

WATSON, J. D. et al. Biologia molecular do gene. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or falty tests? **Mutation Research**, Amsterdam, v. 492, p. 29-38, 2001.