

**EFEITOS GENOTÓXICOS DOS EXTRATOS AQUOSOS DA ERVA-DE-SANTA-MARIA
(*CHENOPODIUM AMBROSIoidES*) EM CÉLULAS SOMÁTICAS *DROSOPHILA
MELANOGASTER***

Rosiane Gomes da Silva¹

Júlio César Nepomuceno²

RESUMO: A erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*) pertence à família *Chenopodiaceae*, originária da América do Sul. É uma planta herbácea com até 1m de altura de odor muito forte, amplamente disseminada, vegetando essencialmente em lugares férteis. Todas as partes da planta têm poderes analgésicos, estomáticos e vermífugos. O *Chenopodium ambrosioides* é constituído por hidrocarbonetos terpênicos (cimeno, limoneno e terpineno) e principalmente por ascaridol. Com o objetivo de detectar a existência de agentes genotóxicos e as possíveis alterações que o *Chenopodium ambrosioides* pode trazer ao material genético, foi utilizado o teste para detecção de mutação e recombinação somática em asas de *Drosophila melanogaster* (SMART). O extrato aquoso da erva-de-santa-maria foi preparado nas seguintes concentrações: extrato aquoso puro, extrato aquoso 50% e extrato aquoso 25%. Para tanto, foram realizados os cruzamentos: padrão (Standard Cross - ST) e de alta capacidade de bioativação (High Bioactivation Cross - HB) dos quais foram obtidos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Foram analisados os indivíduos MH descendentes do cruzamento HB, nos quais as manchas são induzidas por mutação ou por recombinação mitótica. Os extratos aquosos da erva-de-santa-maria testados não apresentaram aumento significativo no número de total de manchas, em nenhuma das concentrações, quando comparados com controle positivo. Contudo, foram observados aumentos, estatisticamente significativos, no número de manchas gêmeas, indicando uma provável ação recombinogênica. No entanto, quando essas concentrações foram associadas a doxorrubicina (DXR 0,125 mg/ mL), houve redução significativa no número total de manchas mutantes. A redução nas frequências de manchas pode sugerir a primeira vista, um efeito protetor. Contudo, não pode ser descartada uma possível ação citotóxica, da erva-de-santa-maria, levando à destruição de

¹ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Patos de Minas – MG. E-mail: rosianegomes2003@yahoo.com.br

² Professor Adjunto do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia – MG / Professor Titular do Centro Universitário de Patos de Minas – MG.

manchas mutantes induzidas pela DXR. Essa ação tóxica da erva-de-santa-maria pôde ser percebida pela redução no número de moscas, principalmente, no extrato puro.

PALAVRAS-CHAVE: *Chenopodium ambrosioides*. *Drosophila melanogaster*. Genotoxicidade. SMART.

ABSTRACT: The erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*) belongs to the *Chenopodiaceae* family and is originated of South America. It is an herbaceous plant that goes to even 1 meter high, it has a strong odor, is amply disseminated and grows essentially in fertile places. The *Chenopodium ambrosioides* is constituted by terpene hydrocarbon (cymene, lymonene and terpinene) and especially by ascaridole. With the aim of detecting the existence of genotoxic agents and possible alterations that *Chenopodium ambrosioides* may bring to the genetic material, we used the test to detect mutation and somatic recombination in wings of *Drosophila melanogaster* (SMART). The aqueous extract of erva-de-santa-maria was prepared in the following concentrations: pure aqueous extract, aqueous extract 50% and aqueous extract 25%. For this, the following crosses were fulfilled: standard cross (ST) and High Bioactivation Cross (HB), from which we obtained marked heterozygous descendants (MH) and balanced heterozigotos (BH). The MH individuals descendant from HB crosses were analyzed, where spots are induced by mutation and mitotic recombination. The aqueous extracts of erva-de-santa-maria tested did not present a significant increase in the total number of spots, in any of the concentrations, when compared to positive control. However, we could observe statistically significant increases in the number of twin spots, which indicates a probable recombinagenic action. However, when these concentrations were associated to doxorubicina (DXR 0, 125 mg/ mL), there was a significant decrease in the total number of mutant spots. The decrease in the frequencies of spots may suggest at first sight a protector effect. Yet we cannot eliminate the possibility of a citotoxic action of erva-de-santa-maria, which could lead to the destruction of mutant spots induced by DXR. This toxic action of erva-de-santa-maria could be perceived by the decrease in the number of flies especially in the pure extract.

KEYWORDS: *Chenopodium ambrosioides*. *Drosophila melanogaster*. Genotoxicity. SMART.

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Genética é o nome dado ao estudo da hereditariedade, o processo pelo qual as características são passadas dos genitores para a prole, de modo que todos os organismos,

inclusive os seres humanos, se assemelhem a seus ancestrais (BROWN, 1999). A genética como um conjunto de princípios e procedimentos analíticos só começou em 1860, quando um monge agostiniano chamado Gregor Mendel fez uma série de experimentos que indicaram a existência de elementos biológicos, hoje conhecidos como genes, presentes numa seção de moléculas helicoidais filamentosas – o DNA (SUZUKI, 2002).

Em seus experimentos, Mendel utilizou a ervilha *Pisum sativum* como organismo experimental. Mais tarde, no século XX, os trabalhos mendelianos foram redescobertos e serviram como base para técnicas mais sofisticadas desenvolvidas por Thomas Hunt Morgan e por seus colaboradores, os quais possibilitaram o mapeamento das posições dos genes nos cromossomos eucarióticos. Morgan descobriu um organismo idealmente adequado ao programa de pesquisa que queria desenvolver. Esse organismo foi a *Drosophila melanogaster*, conhecida como a mosca das frutas.

Segundo Morgan, a *Drosophila* possui várias características que a tornam muito adequada à análise genética, tais como a forma das asas e a cor do corpo. Hoje as técnicas descobertas pelo grupo de Morgan se tornaram métodos padrão da análise genética (BROWN, 1999).

1.1 MUTAÇÕES

As mutações gênicas e as recombinações são as principais fontes de variabilidade genética, proporcionando a diversidade de características individuais em cada espécie, bem como a multiplicidade das espécies, ao longo da evolução (LOURO, 2002).

As mutações são modificações genotípicas que podem ocorrer em células da linhagem germinativa, bem como em células somáticas. No entanto, apenas as primeiras podem ser perturbadas de uma geração à seguinte, sendo, desse modo, responsáveis pelas doenças hereditárias. Por outro lado, as que ocorrem nas células somáticas podem resultar na morte do portador ou na diminuição da função celular (LOURO, 2002).

As mutações podem ser induzidas quando ocorrerem em resposta a um agente obviamente externo (BURNS; BOTTINO, 1991), seja ele agente físico, seja biológico, seja químico, denominados agentes mutagênicos (LOURO, 2002).

Existem vários tipos de mutágenos, cada um agindo de forma diferente. Com ação secundária, os mutágenos ocorrem naturalmente no meio e causam alterações estruturais nas moléculas de DNA (BROWN, 1999). Como exemplo, podemos citar os análogos de bases, nos quais algumas substâncias que possuem estruturas moleculares similares às bases comuns (por exemplo, a 5-bromouracil) podem ser incorporadas, caso esteja presente no filamento de DNA em replicação (BURNS; BOTTINO, 1991).

Das mutações, podem decorrer múltiplos efeitos que, na grande maioria, os resultados são maléficos como malformações congênitas, envelhecimento celular e orgânico, teratogênese e cânceres (SILVA, 2003).

Todos os cânceres de células somáticas são causados por uma série de mutações especiais que se acumulam em uma célula. Essas mutações vão atribuir às células alta habilidade de proliferação celular, diminuição da suscetibilidade à apoptose ou aumento da taxa geral de mutação da célula (SUZUKI, 2002).

Cânceres são agregados de células, todas derivadas de uma célula inicial fundadora aberrante que, embora rodeada de tecido normal, não se integra mais ao ambiente. As células cancerosas diferem de suas vizinhas normais por várias alterações fenotípicas específicas, tais como uma rápida taxa de divisão e um formato anormal (SUZUKI, 2002).

As células cancerosas são definidas por duas propriedades hereditárias: elas e sua progênie (1) reproduzem apesar dos impedimentos normais e (2) invadem e colonizam territórios normalmente reservados para células. E a combinação dessas características cria um perigo especial. As células que apresentam a primeira propriedade e não a segunda, isto é, que proliferam excessivamente, mas permanecem juntas, como uma massa única, formam um tumor, mas, nesse caso, o tumor é chamado de *benigno*. Ele pode ser completamente removido por cirurgia. Um tumor somente é canceroso se suas células têm capacidade de invadir os tecidos circundantes e, nesse caso, é chamado de *maligno*. Células de tumor maligno, com essa propriedade invasiva, podem deixar o tumor primário e invadir a corrente sanguínea ou os vasos linfáticos e formarem tumores secundários ou metástase, em outros locais do organismo. Quanto mais disperso o câncer, mais difícil será erradicá-lo (ALBERTS, 1999).

1.2 PLANTAS MEDICINAIS E O CÂNCER

O uso de plantas medicinais (inteiras ou suas partes como folhas, cascas, sementes e seus produtos extrativos como as resinas e os óleos) é tão antigo quanto a história da humanidade. Há relatos em obras de 2.700 a.C, sendo empregadas na medicina, na cosmética e até em cerimônias religiosas.

Algumas plantas utilizadas como medicamentos contêm componentes provenientes do metabolismo secundário e funções fisiológicas que atuam como princípios ativos. Tais princípios têm atividades biológicas diversas, como, emulsionante e estabilizante, antiinflamatórios, cicatrizantes, anti-reumáticos, anti-sépticos, antimicrobiano, antiespasmódicos, antipiréticos, antioxidantes e outros (OKA e ROPERTO, 2000).

Atualmente, um número cada vez maior de pessoas preocupadas com o excesso das civilizações industriais, traduzidos em danos e ameaças à integridade da saúde física, mental e moral, recorre à fitoterapia num movimento quase que instintivo de reconciliação com a natureza (BIESKI, 2005).

No Brasil, as plantas medicinais são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, aplicando-se, na maioria das vezes, a automedicação, que não respeita os limites de uso dos fitoterápicos e não fornece informações sobre efeitos colaterais. Esses fatores contribuem para que a intoxicação por meio dessas plantas se torne um sério problema de saúde pública. Agregue-se a isso a realização de misturas entre diversas plantas medicinais, o que pode resultar na anulação dos efeitos benéficos ou, na pior das hipóteses, em um composto altamente tóxico (BORGES, 2005).

Diversos estudos são realizados com o intuito de conhecer os potenciais químicos e farmacológicos de várias espécies de plantas medicinais e muitos dados já demonstraram que algumas espécies possuem substâncias mutagênicas e carcinogênicas.

O poder medicinal das plantas se deve a um conjunto de componentes ativos sintetizados em seus tecidos que, a princípio, podem ser considerados terapêuticos, mas também podem causar efeitos indesejados ou tóxicos. Esses componentes, quando introduzidos nos organismos animais, promovem respostas fisiológicas e homeostasia e, de um modo geral, os princípios ativos apresentam mecanismos de ação semelhantes às drogas sintéticas (SIMÕES et al., 2001).

1.3 ERVA-DE-SANTA-MARIA (*CHENOPODIUM AMBROSIOIDES*)

A erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*) é da família *Chenopodiaceae*, originária da América Tropical. É uma planta herbácea com até 1m de altura (MARTINS, 1995). No Brasil, é amplamente disseminada, vegetando essencialmente em lugares férteis, em torno de habitações, jardins e roças, principalmente em estações chuvosas (CARDOSO et al., []).

Além de erva-de-santa-maria, essa planta também é conhecida popularmente como mastruço, mastruz, ambrósia, erva-formigueira e erva-mata-pulgas (TAVARES, 2002). A planta tem um odor muito forte, as flores e as sementes são pequenas e verdes, sendo estas verdes quando frescas e pretas, quando secas (*CHENOPODIUM AMBROSIOIDES*, 2001). O *Chenopodium ambrosioides* é constituído de hidrocarbonetos terpênicos (cimeno, limoneno, terpineno, etc.) e de ascaridol (CARDOSO et al., []).

Todas as partes da planta têm poder analgésico, antihelmintico, antiinflamatório, estomático, vermífugo e, mais recentemente, está sendo testada no tratamento contra células tumorais (NASCIMENTO, 2005). Externamente, pode ter uso tópico em hemorróidas, para desintoxicar mordida de serpentes e outros venenos e é usada em feridas devido a suas propriedades já citadas.

O óleo essencial presente na semente e nas folhas da planta é altamente tóxico. Seu excesso pode causar vômitos, convulsões e até mesmo a morte. Além disso, a planta pode também causar a dermatite ou outras reações (MORRIS, 1997). Qualquer uso deve, preferivelmente, ser feito sob a supervisão de um profissional qualificado.

Esta planta, sob forma de infusão, não deve ser prescrita para mulheres grávidas, pois é considerada abortiva por induzir a menstruação (ZHANG, 2002). Pode também ser usada no tratamento de algumas doenças, como a úlcera, devido às suas propriedades analgésicas e sedativas (ZHANG, 2002).



Figura1: Erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*).

1.4 DOXORRUBICINA

O cloridrato de doxorubicina, um antibiótico citotóxico antraciclínico isolado de culturas de *Streptomyces peucetius var. caesius* foi utilizado neste teste para monitorar o número de mutações, quando a *D. melanogaster* for exposta a um agente químico (controle positivo).

O cloridrato de doxorubicina é conhecido comercialmente por Adriblastina RD, um pó liofilizado composto por metilparabeno, lactose, além da doxorubicina, sendo usado restritamente por hospitais e laboratórios com emprego específico em neoplasias malignas. A doxorubicina é eficaz em leucemias agudas e linfomas malignos, ativa em tumores

sólidos e é um componente valioso de vários esquemas de quimioterapia, como do carcinoma de mama e carcinoma de pequenas células dos pulmões. A droga ainda é benéfica em uma ampla variedade de sarcomas como o osteogênico, de Ewing, e sarcomas de tecidos moles (GILMAN et al., 1996).

Além disso, a doxorubicina é usada com êxito para produzir regressão em carcinomas de bexiga, tireóide, carcinoma ovariano, linfomas de Hodgkin e não Hodgkin, neuroblastomas, tumor de Wilms e outros tumores sólidos (ADRIBLASTINA RD.: pó liofilizado. Responsável farmacêutica bioquímica Dr.^a F. Cutrupi. Milão: Pharmacia & Upjohn S.p.A, 2002. Bula de remédio).

As propriedades citotóxicas da doxorubicina (DXR) sobre as células malignas e seus efeitos parecem estar relacionadas com a intercalação de seus anéis planos tetraciclina, entre os pares de bases nucleotídicas, causando conseqüentes danos à síntese de DNA e sobre a membrana lipídica celular, podendo, ainda, desencadear a quebra do DNA (ADRIBLASTINA RD.: pó liofilizado. Responsável farmacêutica bioquímica Dr.^a F. Cutrupi. Milão: Pharmacia & Upjohn S.p.A, 2002. Bula de remédio).

A DXR é ativa durante todo o ciclo celular, incluindo a intérfase, provocando efeitos antiproliferativos aos tecidos tumorais, mas também a outros tecidos sensíveis, como a medula óssea, a mucosa gastrintestinal e oral, os folículos capilares e outros (ADRIBLASTINA RD. pó liofilizado. Responsável farmacêutica bioquímica Dr.^a F. Cutrupi. Milão: Pharmacia & Upjohn S.p.A, 2002. Bula de remédio).

1.5 SMART (SOMATIC MUTATION AND RECOMBINATION TEST) - TESTE PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÃO E RECOMBINAÇÃO SOMÁTICA (GRAF ET AL., 1984)

O SMART é um teste usado para avaliar a genotoxicidade de misturas complexas, como partículas aéreas, extrato de plantas, bebidas como o café, chás e vinhos, dentre várias outras substâncias (RIBEIRO, 2003).

O teste SMART de asa de *Drosophila melanogaster* fundamenta-se na premissa de que, durante o desenvolvimento embrionário, grupos de células (os discos imaginiais das asas) proliferam-se mitoticamente até o ponto em que se diferenciam, durante a metamorfose, em estruturas que originam as asas das moscas adultas (RIBEIRO, 2003).

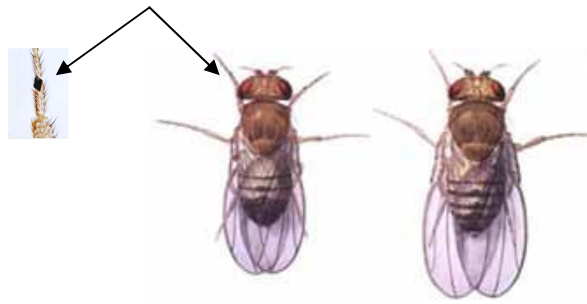


Figura 2. Casal de *Drosophila melanogaster*. O macho (esquerda) é a mosca menor e apresenta o pente sexual como ilustrado e a fêmea (direita) a maior.

Este bioensaio faz uso de dois genes marcadores para a forma dos pêlos das asas: pêlos múltiplos (*mwh*, 3-0,3) cujo marcador é um gene recessivo, mantido em homozigose na linhagem *mwh*. Este gene está localizado próximo à extremidade do braço esquerdo do cromossomo 3 e, na condição homozigota, expressa-se como pêlos múltiplos, ou seja, 3 ou mais pêlos dentro de uma única célula das asas dos adultos – ao contrário do gene selvagem que origina um único pêlo (RIBEIRO, 2003).

Outro gene marcador *flr^s* também é um gene recessivo que afeta a forma dos pêlos, cujo formato lembra uma “chama de vela” – do inglês *flare* (*flr^s*, 3-38,8) – e está também localizado no braço esquerdo do cromossomo 3, porém em uma região mais proximal (3-38,8). Todos os alelos *flr^s* conhecidos são letais zigóticos recessivos (RIBEIRO, 2003).

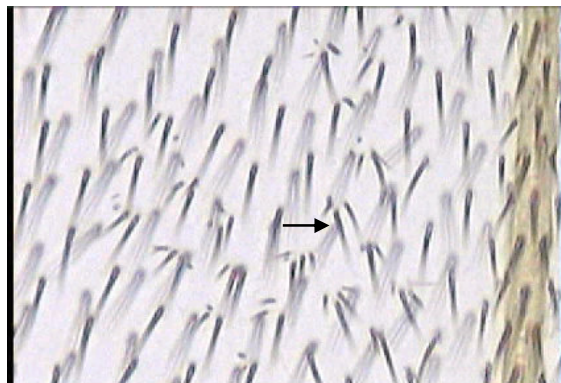


Figura 3: Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, dos pêlos da asa de *Drosophila melanogaster*, obtida no Laboratório de Citogenética e Mutagênese - Centro Universitário de Patos de Minas, Patos de Minas. Apresentação de pêlos múltiplos (seta).

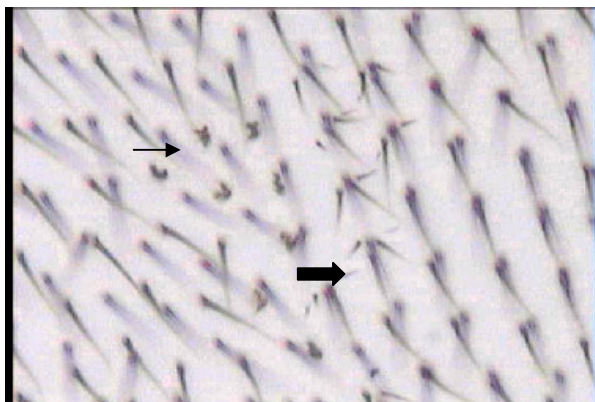


Figura 4: Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz, dos pêlos da asa de *Drosophila melanogaster*, obtida no Laboratório de Citogenética e Mutagênese - Centro Universitário de Patos de Minas. Apresentação de pêlos múltiplos (seta maior) e apresentação de pêlos *flare* (seta menor).

No entanto, células do disco imaginal das asas, que são homozigotas para este gene, expressam o fenótipo *flr³*, sendo visíveis. Em função dessa característica, os alelos *flr³* são mantidos na linhagem marcadora em estado de heterozigose na presença de um cromossomo balanceador *TM3*, que carrega múltiplas inversões (*TM3/ Bd^S*) (RIBEIRO, 2003).

Devido à alta sensibilidade, o teste SMART é considerado um excelente modelo para estudo de genotoxicidade, podendo fornecer respostas relevantes para o homem, com um alto índice de acerto.

Para a realização deste teste, foram utilizadas três linhagens mutantes de *D. melanogaster*, portadoras dos marcadores genéticos *multiple wing hairs (mwh, 3-0,3)* e *flare-3 (flr³, 3-38,8)*

1. *multiple wing hairs (mwh)*, com constituição genética *y: mwh jv*.
2. *Flare - 3 (flr³)*, com constituição genética *flr³/ In(3LR)TM3 , ri p^p sepl(3)89Aa bx^{34e} e Bd^f*.
3. *ORR; flare - 3 (ORR; flr³)* com constituição genética *ORR; flr³/ In(3LR)TM3 , ri p^p sepl(3)89Aa bx^{34e} e Bd^f*.

A fim de verificar os possíveis efeitos genotóxicos do extrato da planta erva-de-santa-maria, por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática em asas de *Drosophila melanogaster*, os seguintes cruzamentos foram realizados:

- 1 - Cruzamento padrão (*ST- Standard Cross*) (GRAF et al., 1989)

Fêmeas virgens *flr³/ In(3LR)TM , ri p^p sepl(3)89Aa bx^{34e} e Bd^f* cruzadas com machos *mwh/mwh*.

2 - Cruzamento de alta biotivação (*HB - High Bioactivation Cross*) (GRAF; VAN SCHAİK, 1992).

Fêmeas virgens *ORR; flr³/ In(3LR)TM, ri p^o sepl(3)89Aa bx^{34e} e Bd^f* cruzadas com machos *mwh/mwh*.

Desses cruzamentos, foram obtidos dois tipos de descendentes: marcador trans-heterozigoto (MH: *mwh +/+ flr³*), e balanceador heterozigoto (BH: *mwh +/TM3, Bd^f*). Os indivíduos MH expressam pêlos mutantes nas asas originados de alterações mutagênicas e recombinogênicas ocorridas no locus gênico *mwh* e *flr³*. Já os descendentes BH possuem um cromossomo balanceador *TM3/Bd^f* que inibe recombinação, ocorrendo apenas eventos mutagênicos devido a inversões múltiplas. O fenótipo do descendente heterozigoto marcado (MH) desenvolve asa normal, com borda lisa, enquanto que, no heterozigoto balanceado (BH), as asas são mal formadas, com aparência picotada ou serrilhada, denominadas "serrate" (GUZMÁN-RINCON; GRAF, 1995). As larvas, de ambos os genótipos, emergentes desses cruzamentos, foram tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso da erva-de-santa-maria.

Este trabalho tem por objetivo verificar os possíveis efeitos genotóxicos do extrato aquoso da planta erva-de-santa-maria, por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática em asas de *Drosophila melanogaster*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DA ERVA-DE-SANTA-MARIA

A erva-de-santa-maria foi cedida pela Casa de Repouso de Lagoa Formosa. A partir do concentrado aquoso da erva-de-santa-maria, foram preparadas, no laboratório de Citogenética e Mutagênese do UNIPAM, as seguintes concentrações: (1) Erva-de-santa-maria extrato aquoso puro; (2) erva-de-santa-maria extrato aquoso 50%; e (3) erva-de-santa-maria extrato aquoso 25%

2.2 AGENTES QUÍMICOS

Doxorrubicina

Cloridrato de doxorrubicina, conhecido comercialmente por Adriblastina RD, dissolvido em água destilada.

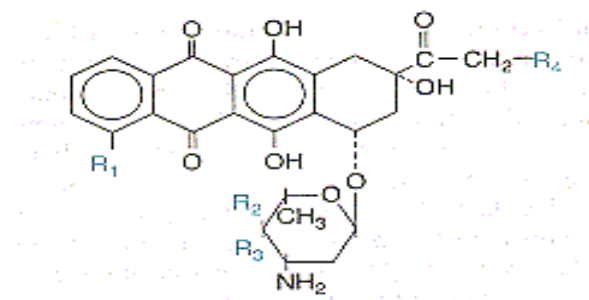


Figura 5. Fórmula estrutural da doxorubicina (Fonte: Katzung, 2001).

Sendo R1 - OCH3

R2 - H

R3 - OH

R4 - OH

Erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*)

As larvas dos tratamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB) alimentaram-se do extrato aquoso da erva-de-santa-maria cedida pela Casa de Repouso de Lagoa Formosa - MG. Esta é uma planta herbácea da família Chenopodiaceae e sua principal composição química é o ascaridol (aproximadamente 90%), uma substância tóxica usada principalmente no tratamento contra *Ascaris lumbricoides*.

2.3 DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO UTILIZADO NO TRATAMENTO

Larvas de 72 horas de idade, provenientes dos cruzamentos padrão e de alta capacidade de bioativação, foram transferidas para frascos contendo 1,5 g purê da batata (meio alternativo para *Drosophila melanogaster*), aos quais foram adicionados, separadamente, extrato aquoso de erva-de-santa-maria bruto, extrato aquoso de erva-de-santa-maria 50% e 25%. As mesmas concentrações de erva-de-santa-maria foram, também, associadas à doxorubicina (0,125 mg/mL). Um controle negativo (água destilada) e doxorubicina (controle positivo) foram incluídos em ambos os cruzamentos.

Os ovos foram coletados por um período de 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (4% de ágar em água) e uma camada de fermento (*S. cerevisiae*) suplementado com açúcar. Após 72 +/- 4 horas, as larvas de 3º estágio foram lavadas com água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina. Grupos de aproximadamente 100 larvas foram transferidos para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura), contendo 1,5 g de meio de cultura instantâneo (fórmula 4-24 Carolina

Biological Supply Co., Burlington, NC, USA) e 5,0 mL de diferentes concentrações do extrato aquoso da erva-de-santa-maria.

Após o tratamento, foram obtidos dois tipos de descendentes: o marcador trans-heterozigoto (*mwh +/- flr³*), com asas fenotipicamente do tipo selvagem, e o balanceador heterozigoto (*mwh +/- TM3 Bds*), com asas fenotipicamente do tipo serrilhada. As moscas adultas emergentes desse tratamento foram coletadas e fixadas em etanol 70%, para posterior montagem das lâminas e análise microscópica e estatística.

2.4 MONTAGEM E ANÁLISE DE LÂMINAS

As moscas conservadas tiveram suas asas destacadas do corpo e fixadas na lâmina aos pares, sendo 5 pares de asas de moscas fêmeas e 5 pares de moscas machos, completando 20 asas em filas paralelas. Em seguida, foram submetidas à secagem em placa aquecedora onde permaneceram por 4 horas, sendo 2 horas sem lamínula e 2 horas com lamínula prensadas com presos de metal para evitar a formação de bolhas.

Após secagem, as lâminas foram submetidas à análise microscópica em microscópio óptico na objetiva de 40, observando-se os sete setores de cada asa; foram registrados todos os tipos e tamanhos de manchas mutantes.

Neste trabalho, foram analisadas somente as moscas descendentes do cruzamento de alta bioativação (HB). Não foi possível realizar análise dos descendentes do cruzamento padrão (ST), devido à morte das larvas durante os tratamentos com os diferentes extratos de erva-de-santa-maria.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação dos efeitos genotóxicos da erva-de-santa-maria, as frequências das manchas por mosca foram comparadas com as do controle negativo (água). As análises foram feitas de acordo com o teste qui-quadrado (X^2) para proporções (FREI; WURGLER, 1988), que se baseia em duas hipóteses:

- 1) a frequência de mutação (induzida mais espontânea) na série tratada não é maior do que a frequência de mutação no controle apropriado;
- 2) a frequência de mutação induzida na série tratada não é menor do que a maior frequência de mutação espontânea observada no controle.

Essas hipóteses foram levantadas para decidir se o resultado foi:

- ✓ Positivo: rejeita-se a primeira hipótese e aceita-se a segunda;
- ✓ Fraco positivo: rejeitam-se ambas hipóteses
- ✓ Inconclusivo: aceitam-se ambas as hipóteses;
- ✓ Negativo: aceita-se a primeira hipótese e rejeita-se a segunda.

Essa análise propicia o alcance dos objetivos propostos e elucida a ação que a erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*) exerce sobre o organismo testado, possuidor de um sistema enzimático e genético semelhante ao humano.

3 RESULTADOS

As tabelas 1 e 2, apresentam-se os resultados obtidos dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH), do cruzamento de alta bioativação (HB), tratados com extrato aquoso da erva-de-santa-maria nas diferentes concentrações: extrato aquoso puro, extrato aquoso a 50% e extrato aquoso a 25% isoladas e associados a DXR.

As siglas apresentadas nas tabelas significam, respectivamente, MSP – manchas simples pequenas; MSG – manchas simples grandes; MG – manchas gêmeas e TM – total de manchas.

A tabela 1 mostra que, nos descendentes MH, do cruzamento HB, nas concentrações de 25% e 50% ocorreu um aumento, estatisticamente significativo, nas freqüências de manchas gêmeas, quando comparadas com o controle água. Contudo, no número total de manchas, nestas concentrações (25 e 50%), ocorreu um aumento. Entretanto, esse aumento foi não significativo, indicando um aumento da atividade recombinogênica.

A tabela 2 apresenta os resultados da análise dos descendentes MH do cruzamento HB tratados com diferentes concentrações do extrato aquoso da erva-de-santa-maria associados a doxorrubicina (DXR), sendo que, nas concentrações de extrato puro + DXR, extrato 25% + DXR e extrato 50% + DXR, o resultado da análise de manchas simples grandes, manchas gêmeas e total de manchas foi positivo, demonstrando diminuição significativa do número de manchas em todas as freqüências. O número de manchas simples pequenas apresentou resultado positivo com diminuição significativa nas concentrações 25% + DXR e 50% + DXR, enquanto na concentração extrato puro + DXR a diminuição do número de manchas simples pequenas não foi significativa, quando comparadas ao controle positivo.

Tabela 1: Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes “MH” de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento de altabiativação (HB), tratados com diferentes concentrações de erva de santa Maria .

Tratamentos	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas mwh ^c (n)
		MSP	MSG	MG	TM	
		(1-2 céls) ^b m = 2	(>2 céls) ^b m = 5	m = 5	m = 2	
Contr. Neg.	19	0,84 (16)	0,16 (03)	0,0 0 (00)	1,00 (19)	19
DXR 0,125 mg/mL	20	2,20 (44) +	6,80 (136) +	6,4 5 (129) +	15,45 (309) +	289
Erva S. Maria 25%	20	0,65 (13) -	0,45 (09)	0,2 5 (05) +	1,35 (27) i	26
Erva S. Maria 50%	20	0,55 (11) -	0,30 (06)	0,4 0 (08) +	1,25 (25) i	23
Erva S. Maria Ext. Puro	11	1,18 (13) i	0,09 (01)	0,1 8 (02) i	1,45 (16) i	16

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

^dApenas manchas simples mwh podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o

Tabela 2: Freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes “MH” de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento de altabiativação (HB), tratados com diferentes concentrações de erva-de-santa-maria associados com doxorubicina (DXR 0,125mg/ml)

Tratamentos	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas mwh ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b m = 2	MSG (>2 céls) ^b m = 5	MG m = 5	TM m = 2	
Controle negativo	18	0,89 (16)	0,17 (03)	0,00 (00)	1,06 (19)	
DXR 0,125 mg/mL	20	2,20 (44) +	6,80 (136) +	6,45 (129) +	15,45 (309) +	289
Erva S. Maria 25% + DXR	20	1,00 (20) +	0,80 (16) +	0,30 (06) +	2,10 (42) +	40
Erva S. Maria 50% + DXR	20	0,95 (19) +	0,65 (13) +	0,50 (10) +	2,10 (42) +	41
Erva S. Maria Ext. Puro + DXR	9	1,33 (12) i	0,33 (03) +	0,56 (05) +	2,22 (20) +	20

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

^dApenas manchas simples mwh podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador TM3 não contém o gene mutante *flr3*.

A figura 6 apresenta as freqüências totais de manchas mutantes por mosca, observadas nas asas dos descendentes “MH” de *Drosophila melanogaster*, provenientes do cruzamento de alta bioativação “HB”, tratadas com diferentes concentrações de erva-de-santa-maria.

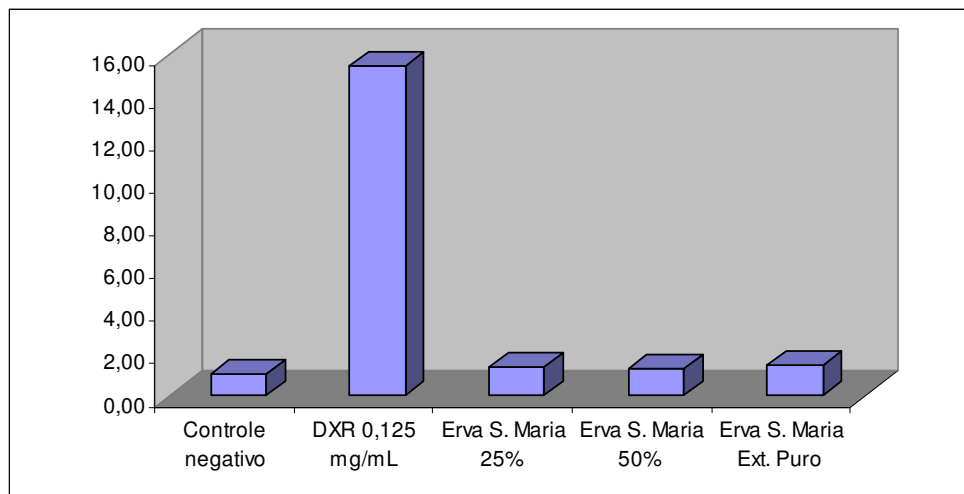


Figura 6: Freqüências totais de manchas mutantes por mosca, nos descendentes trans-heterozigotos “MH”, provenientes do cruzamento “HB”, tratados com diferentes concentrações erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*), associadas com DXR (0,125 mg/mL).

A figura 7 apresenta as freqüências totais de manchas mutantes por mosca, observadas nas asas dos descendentes “MH” de *Drosophila melanogaster*, provenientes do cruzamento de alta bioativação “HB”, tratadas com diferentes concentrações de erva-de-santa-maria associadas com DXR (0,125 mg/mL).

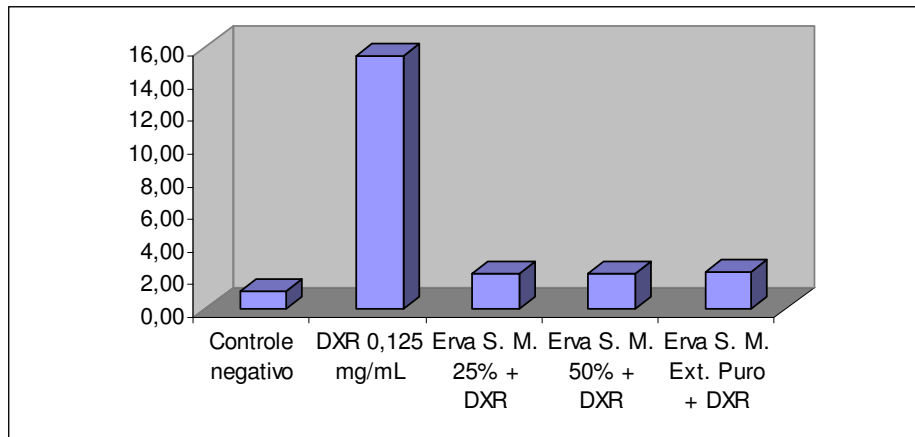


Figura 7: Frequências totais de manchas mutantes por mosca, nos descendentes trans-heterozigotos “MH”, provenientes do cruzamento “HB”, tratados com diferentes concentrações erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*), associadas com DXR (0,125 mg/mL).

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os extratos aquosos da erva-de-santa-maria testados não apresentaram aumento significativo no número total de manchas, em nenhuma das concentrações, quando comparados com controle negativo. Contudo, foram observados aumentos, estatisticamente significativos, no número de manchas gêmeas, indicando uma provável ação recombinogênica. No entanto, quando essas concentrações foram associadas a doxorubicina (DXR 0,125 mg/ mL), houve redução significativa no número total de manchas mutantes. A redução nas frequências de manchas pode sugerir, à primeira vista, um efeito protetor. Contudo, não pode ser descartada uma possível ação citotóxica, da erva-de-santa-maria, levando à destruição de manchas mutantes induzidas pela DXR. Essa ação tóxica da erva-de-santa-maria pôde ser percebida pela redução no número de moscas, principalmente, no extrato puro.

O efeito citotóxico é uma característica marcante de todo quimioterápico, utilizado no tratamento do controle de tumor. Esta ação anti-tumoral pôde ser verificada pelo uso do ascaridol, principal componente da erva-de-santa-maria, descrita por Efferth et al. (2002). Os autores isolaram um composto oleoso da semente com 60% de ascaridol purificado, verificando seus efeitos antineoplásicos contra linhagens de células tumorais resistentes a multidrogas.

Na tentativa de aumentar a sobrevivência de pacientes com tumores, muitos esforços foram usados para identificar novas drogas no tratamento do câncer. O ascaridol tem sido, portanto, um novo candidato a esse tratamento, visto que estudos demonstram a atividade que este composto exerce em células tumorais (EFFERTH et al., 2002)

Para Efferth et al (2002), quando os tumores são resistentes a uma droga, geralmente, são resistentes a outras drogas, demonstrando em seus estudos a resistência de células tumorais a drogas vindas de compostos naturais como a vincristina e a vinblastina derivados da *Vinca major*, compostos da *Podophyllum peltatum*, *Taxus brevifolia* e outros compostos. No entanto, essa mesma resistência não foi observada para o ascaridol, mostrando que esse composto pode ser indicado em casos de resistência tumoral a outros compostos naturais, ou seja, o ascaridol é um novo candidato ao tratamento de tumores, pois é capaz de atuar em células tumorais que resistem aos efeitos de outros compostos naturais.

A morte celular é um processo fisiológico, denominado de apoptose, que desempenha um papel relevante na homeostase de diferentes tecidos. Esse processo é caracterizado por diversas alterações morfológicas e bioquímicas das células, sendo de crucial importância para o desenvolvimento embrionário, para a maturação do sistema imune, para defesa contra infecções virais e para a eliminação de tumores (BERGANTINI, 2005).

A apoptose pode ser deflagrada por meio de estímulos externos (via extrínseca), por meio da ativação de receptores específicos, presentes na superfície celular, chamados receptores da morte, ou pelo estresse intracelular (via intrínseca ou mitocondrial). Dessa forma, a apoptose pode ser potencializada através da via mitocondrial ou aumento de receptores de morte pela ação de substâncias tóxicas, como exemplo as drogas quimioterápicas e imunoterápicas (BERGANTINI, 2005).

A redução do número de manchas, ocasionada provavelmente com a indução de células em apoptose ocorre devido a uma baixa regulação do gene bcl-2 (proteína repressora da via apoptótica) e pela alta regulação do gene bax (proteína antagonista a bcl-2), na ausência da proteína repressora, a via apoptótica é ativada e a célula é destruída. Assim, a diminuição do aparecimento de manchas mutantes, nas concentrações testadas do extrato aquoso da erva-de-santa-maria, pode estar relacionado com a alta concentração e com o mecanismo de apoptose, levando a crer que os erros induzidos são tão grosseiros que é desencadeada a via de apoptose (JELLINEK E MALONEY, 2005). Essa mesma hipótese foi, também, discutida por Faria (2005), quando do tratamento com extratos de folhas de graviola, na indução de tumores em *Drosophila melanogaster*

As moscas descendentes do tratamento de alta bioativação HB possuem uma enzima denominada citocromo P450, responsável pelo biometabolismo de substâncias

tóxicas, já as moscas do tratamento padrão ST não possuem essa enzima. Portanto, acredita-se que as larvas desse tratamento morreram devido à alta toxicidade das concentrações da substância testada.

Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que a erva-de-santa-maria não apresenta efeito protetor devido, provavelmente, a sua ação citotóxica.

A população em geral apregoa muito que “o que é natural não faz mal”. Nada mais errôneo, já que chás e extratos vegetais podem produzir efeitos colaterais como qualquer droga, e além de benefícios podem ser prejudiciais (SILVA, 2003).

REFERÊNCIAS

ADRIBLASTINA RD. Pó liofilizado. Responsável farmacêutica bioquímica Dr^a F. Cutrupi. Milão: Pharmacia & Upjohn S.p.A, 2002. Bula de remédio.

ALBERTS, Bruce et al. Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução a Biologia Molecular da célula. São Paulo: Artmed. p. 758, 1999.

BERGANTINI, Ana Paula F. et al. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia. v. 27. n. 2. São José do Rio Preto, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842005000200012>. Acesso: 18/10/2006.

BIESKI, Isanete Geraldini Costa. Plantas Medicinais e Aromáticas no Sistema Único de Saúde da Região Sul de Cuiabá-MT. Lavras: Secretaria Municipal de Saúde de Cuiabá-MT Universidade Federal de Lavras, 2005

BORGES, Iovanca Fayeza Uala. Plantas tóxicas, venenosas e alucinógenas. Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos. São João Da Boa Vista - SP, 2005. Disponível em: <<http://www.feob.br/novo/cursos/cbiologicas/monografias/2005/IOVANCA%20FAYEZA%20UALA%20BORGES.pdf>>. Acesso: 10/10/2006.

BROWN, T. A. Genética: um enfoque molecular. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 336.

BURNS, George W.; BOTTINO, Paulo J. Genética. 6 ed. Rio Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 381.

CARDOSO, et al. []. Disponível em:

<http://www.editora.ufla.br/Boletim/pdfextensao/bol_62.pdf>.

Acesso: 20/06/2005.

CHENOPODIUM AMBROSIOIDES. Outubro de 2001. Disponível em:

<<http://www.abc.cornell.edu/plants/medicinal/epazote.html>>. Acesso: 14/06/2005.

EFFERTH, T. et al. Activity of ascaridol from the anthelmintic herb *Chenopodium anthelminticum* L. against sensitive and multidrug-resistant tumor cells. Anticancer Research, 2002, 22: 4221-4224.

FARIA, M. I. Efeito anticarcinogênico da folha da graviola (*Annona muricata*) por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. Relatório Final - CNPq. Universidade do Estado de Minas Gerais. 2005 p.14.

FREI, H., WÜRGLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test da from *Drosophila* assay indicate a positive, negative or inconclusive result. Mutation Research., Amsterdam, 1988, 203: 297-308.

GILMAN, Alfred G.; LIMBIRD, Lee E.; HARDMAN, Joel G. As bases farmacológicas da terapêutica. 9. ed. Rio de Janeiro: Graw Hill, 1996. p. 909-943.

GRAF, U. et al. Somatic Mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environmental mutagenesis, 1984. p. 153-188.

GRAF, U.; FREI, A.; KAGI, A.; KATZ, A. J.; WÜRGLER, F. E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. Mutation Res., 1989. p. 222:359-373.

GRAF, U.; VAN SCHAİK, N. Improved high bio activations cross for the wing somatic mutations and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Mutation Res, 1992. 271: 59-67.

GUZMÁN-RINCON, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Biomonitoring and Biomarkers a Indicators of

Environmental Change. New York: Edit by F. M. Butterworth et al., Phenunm Press, 1995. p.169-181.

JELLINEK, Nathaniel; MALONEY, Mary E.. Escharotic and other botanical agents for the treatment of skin cancer: A review. J Am Acad Dermatol. September 2005.

LOURO, lúri Drumond et at. Genética Molecular do Câncer. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002. p. 275.

MARTINS, Ernane et al. Plantas Medicinais. Viçosa: Imprensa Universitária. p.119-120, 1995.

MORRIS, Rich, Chenopodium Ambrosioides Anthelminticum. Plants For a Future, 1997. Disponível em: <http://www.ibiblio.org/pfaf/cgi-bin/arr_html?Chenopodium+ambrosioides&CAN=COMIND>. Acesso: 14/06/2005.

NASCIMENTO, Flávia R.F. et al. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. Life Sciences, 22 ed. v.78. Universidade Federal do Maranhão.São Luís do Maranhão, 2006. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T99-4HMFJMH-2&_coverDate=04%2F25%2F2006&_alid=469105677&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_qd=1&_cdi=5109&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=4b3042be3e48924759df54f52be67007 >. Acesso: 10/10/2006.

OKA, C. ROPERTO A. Herbário Cris Oka. Cotia-SP, 2000. Disponível em <<http://www.cotianet.com.br>>. Acesso: 30/10/2006.

RIBEIRO, Lucia Regina et al. Mutagênese Ambiental. Rio Grande do Sul: Ulbra , 2003. p.356.

SILVA, Juliana da; et al. Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SUZUKI, David T. Introdução a Genética. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.794.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed. Florianópolis: UFSC, 2001. p. 821.

TAVARES, Márcio Aurélio Garcia Corrêa. Bioatividade da Erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiáceae), em Relação a *Sitophilus zeamais* MOTS, 1855 (COL.: Curculionidae). São Paulo: USP, 2002. p. 59. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-11022003-143346/>> Acesso em: 14/06/2005.

ZHANG, Yongchuan; CHEN, Wendi; CHEN, Yuyao. Chinese drug composition for treatment of peptic ulcer and preparation thereof. United States Patent, 2002.

Disponível em: < <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PALL&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsrchnum.htm&r=1&f=G&l=50&s1=6,344,219.PN.&OS=PN/6,344,219&RS=PN/6,344,219>> .

Acesso:17/10/200