

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
MILENE BUENO MARQUES

Triagem fitoquímica e avaliação da sensibilidade antimicrobiana e da genotoxicidade de
Sedum praealtum DC. (Bálsamo)

Alfenas-MG

2015

MILENE BUENO MARQUES

Triagem fitoquímica e avaliação da sensibilidade antimicrobiana e da genotoxicidade de
Sedum praealtum DC. (Bálsamo)

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS -, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, BSB, MSc, PhD.

Co-orientador: Jorge Kleber Chavasco, PHARM, MSc, PhD

Alfenas-MG

2015

Marques, Milene Bueno

Triagem fitoquímica e avaliação da sensibilidade antimicrobiana e da genotoxicidade de *Sedum praealtum* DC. (Bálsamo) – Milene Bueno Marques.-- Alfenas, 2015.

57 f.

Orientador: Prof. Dr Marcelo Fabiano Gomes Boriollo

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade José do Rosário Vellano.

1. *Sedum praealtum* 2. Sensibilidade antimicrobiana
3. Ensaio do micronúcleo 4. Citotoxicidade *in vitro* 5. Triagem
fitoquímica 6. Extrato vegetal I. Título

CDU: 579(043)



UNIFENAS

Pesquisa
e Pós-graduação

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "Triagem fitoquímica e avaliação da sensibilidade antimicrobiana e da genotoxicidade de *Sedum praealtum* DC. (Bálsamo)

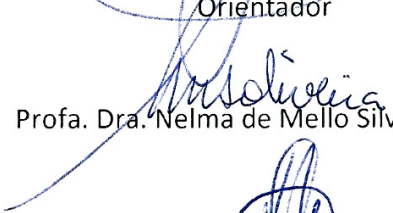
Autora: Milene Bueno Marques

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, BSB, MSc, PhD.

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM CIÊNCIA ANIMAL** pela Comissão Examinadora.



Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo
Orientador



Profa. Dra. Nelma de Mello Silva Oliveira



Prof. Dr. Luiz Carlos do Nascimento

Alfenas, 25 de Fevereiro de 2015.



Prof. Dr. Adauton Vilela de Rezende
Coordenador do Programa
Mestrado em Ciência Animal

*Dedico este trabalho a todos que de alguma
maneira participaram desta etapa e
auxiliaram para concluí-la.*

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, que me deu saúde, inteligência e perseverança para concluir mais esta etapa de minha vida.

Aos meus pais, que sempre estiveram do meu lado incentivando e apoiando, principalmente minha mãe por estar presente toda hora sempre torcendo por mim.

Aos familiares, por estarem sempre presente em todos os momentos.

Ao meu noivo pela companhia e pelo apoio.

Aos Professores Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo e Dr. Jorge Kleber Chavasco, pelo carinho, pela confiança e pelos ensinamentos primordiais nesta conquista. Obrigada pelos ensinamentos, pela atenção e pela dedicação ao longo deste período. Serei eternamente grata.

Às pessoas que sempre estiveram ao meu lado, me acompanhando, incentivando e apoiando e principalmente acreditando na realização deste trabalho.

À banca examinadora, pela disponibilidade e pela presença.

À Rede Mineira de Ensaio Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos (REDE MINEIRA TOXIFAR - 2014), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Universidade José do Rosário Vellano (Unifenas) e à Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL).

*“O significado das coisas não está nas coisas
em si, mas sim em nossa atitude com relação a
elas.”*

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

MARQUES, Milene Bueno. **Triagem fitoquímica e avaliação da sensibilidade antimicrobiana e da genotoxicidade de *Sedum praealtum* DC. (Bálsamo)**. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - UNIFENAS, Alfenas, 2015.

Sedum praealtum DC. (*Crassulaceae*) é uma das 350 espécies farmacologicamente ativas do gênero *Sedum*, cujas ações no tratamento dos olhos (dores e inchaços) e úlcera, de problemas inflamatórios, como contraceptivo e antifertilização, antinociceptiva e anti-inflamatória foram relatadas. O objetivo foi avaliar o extrato hidroetanólico de *S. praealtum* quanto aos seus prováveis potenciais antimicrobiano *in vitro* de algumas cepas de bactérias, de leveduras e de micobactérias, citotóxico *in vitro* e genotóxico *in vivo*. Uma rápida triagem fitoquímica desse extrato também foi realizada. As atividades antimicrobianas foram realizadas empregando-se os métodos de microdiluição em caldo e em difusão em agar (CLSI). Os efeitos genotóxicos e tóxicos sistêmicos e a citotoxicidade foram avaliados pelo ensaio do micronúcleo na medula óssea de camundongos e pelas culturas celulares de *Aedes albopictus*, respectivamente. O índice de seletividade também foi estabelecido ($IS = CI_{50}/CIM$). Dosagens de flavonoides e compostos fenólicos foram feitas usando técnicas colorimétricas e de precipitação. Uma elevada quantia de compostos fenólicos foi identificada na raiz de *S. praealtum*. As folhas de *S. praealtum* mostraram ação de amplo espectro e CIM variáveis: bactérias gram-negativas (*E. aerogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. marcescens* e *S. typhimurium*), gram-positivas (*B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *M. luteus* e *S. aureus*) e levedura (*S. cerevisiae*). O caule e a raiz foram restritos às bactérias gram-positivas e *S. cerevisiae*, exceto *E. coli* (caule) e *P. mirabilis* (raiz) – ação microbicida micro-organismo-dependente e parte anatômica-dependente (folha, caule ou raiz). *S. praealtum* não apresentou ação contra *C. albicans*, *M. tuberculosis* e *M. bovis*. A raiz mostrou IS aceitável ($IS > 1$) para *P. mirabilis*; *B. subtilis*; *B. cereus*; *M. luteus*; *E. faecalis*; *S. aureus* e *S. cerevisiae*, enquanto que a folha apenas para *S. cerevisiae*. O extrato hidroalcoólico das folhas de *S. praealtum* revelou efeitos não genotóxicos (ausência de clastogenia e/ou aneugênia) e efeitos tóxicos na medula óssea de camundongos, dose- ($0,5-2 \text{ g.Kg}^{-1}$) e tempo-independente (24-48h), porém sexo-dependente (macho e fêmea). Este foi o primeiro estudo científico dessa natureza envolvendo *S. praealtum* e, parcialmente, os resultados fornecem uma base para a utilização e para o desenvolvimento compreensivo de recursos vegetais. Todavia, a caracterização fitoquímica

avançada aliada aos diversos estudos farmacológicos e farmacogenômicos deveriam ser conduzidos a fim de caracterizar os seus efeitos e, mais importante, estabelecer limites para o consumo popular, delinear os riscos potenciais à saúde humana, e implementar estratégias racionais e medidas quimio-preventivas.

Palavras-chave: *Sedum praealtum*. Sensibilidade antimicrobiana. Ensaio do micronúcleo. Citotoxicidade *in vitro*. Triagem fitoquímica. Extrato vegetal.

ABSTRACT

MARQUES, Milene Bueno. **Phytochemical screening and evaluation of antimicrobial susceptibility and genotoxicity of *Sedum praealtum* DC (Balsam)**. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - UNIFENAS, Alfenas, 2015.

Sedum praealtum DC. (*Crassulaceae*) is one of 350 species pharmacologically active from the genus *Sedum*, whose actions in treatment of eyes (pain and swelling) and ulcer, inflammatory problems, as contraception and anti-fertilization, antinociceptive and anti-inflammatory have been reported. The objective was to evaluate the hydroethanolic extract of *S. praealtum* regarding their potential antimicrobial *in vitro* (some bacteria, yeasts and micobactéria strains), cytotoxic *in vitro* and genotoxic *in vivo*. A fast phytochemical screening of this extract was also performed. The antimicrobial activities were carried out by microdilution in broth and agar diffusion methods (CLSI). The genotoxic effects and systemic toxic and cytotoxicity were evaluated by micronucleus assay in mice bone marrow and cell cultures of *Aedes albopictus*, respectively. The selectivity index was also established ($SI = CI_{50}/MIC$). Dosages of flavonoids and phenolic compounds were done by colorimetric and precipitation techniques. A high amount of phenolic compounds were identified in *S. praealtum* root. The *S. praealtum* leaves showed broad spectrum of action and variables MICs: Gram-negative bacteria (*E. aerogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. marcescens* and *S. typhimurium*), gram-positive (*B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *M. luteus* and *S. aureus*) and yeast (*S. cerevisiae*). The stem and root were restricted to gram-positive bacteria and *S. cerevisiae*, other than *E. coli* (stem) and *P. mirabilis* (root) – microbicidal action microorganism- and anatomical part-dependent (leaf, stem or root). *S. praealtum* showed no inhibition against *C. albicans*, *M. tuberculosis* and *M. bovis*. The root showed acceptable SI ($SI > 1$) for *P. mirabilis*; *B. subtilis*; *B. cereus*; *M. luteus*; *E. faecalis*; *S. aureus* and *S. cerevisiae*, whereas the sheet only for *S. cerevisiae*. The hydroalcoholic extract of *S. praealtum* leaves revealed no genotoxic effects (no clastogeny and/or aneugeny) and toxicity in bone marrow of mice, dose ($0.5-2 \text{ g.Kg}^{-1}$) and time-independent (24-48 hours), but sex-dependent (male and female). This was the first scientific study of this nature involving *S. praealtum* and partially the results provide a theoretical basis for comprehensive development and utilization of plant resources. However, advanced phytochemical characterization together with the various pharmacological and pharmacogenomic studies should be conducted

in order to characterize their effects and, importantly, for the establishment of limits for human consumption, the delineation of potential risks to human health, and for rational strategies for implementing chemo-preventive measures.

Keywords: *Sedum praealtum*. Antimicrobial susceptibility. Micronucleus assay. Cytotoxicity *in vitro*. Phytochemical screening. Plant extract.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM), concentração microbicida mínima (CMM), média dos valores dos halos de inibição ($\varnothing$ mm) e índice de seletividade (IS) obtidos a partir dos ensaios de sensibilidade antimicrobiana e citotoxicidade <i>in vitro</i> dos extratos hidroalcoólicos liofilizados.....	35
Tabela 2. Incidência de EPCMNs e proporção de EPC / ENC na medula óssea de camundongos <i>Swiss albinus</i> macho e fêmea após os testes de 24h e 48h. Resultados obtidos a partir dos grupos-controle (NaCl e NEU) e do extrato hidroalcoólico liofilizado da folha de <i>S. praealtum</i> DC.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
Ø	Diâmetro
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
AG	Ácido gálico
Ágar BHI	Ágar Brain Heart Infusion
Ágar MH	Ágar Mueller Hinton
Ágar SDA	Sabouraud Dextrose Agar
ANOVA	Análise da variância <i>one-way</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BFB	<i>breakage-fusion-bridge</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CI	Citotoxicidade in vitro
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMM	Concentração Microbiana Mínima
CO ₂	Dióxido de carbono
DMT	Dose máxima tolerada
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i>
DSBs	<i>Double-strand breaks</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
ENC	Eritrócito normocromático
EPC	Eritrócito policromático
EPCMNs	Eritrócitos policromáticos micronucleados
EPCs	Eritrócitos policromáticos

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	Grama
H	Horas
IS	Índice de seletividade
Kg	Quilograma
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Mbar	Milésimo de bar
mg	Miligrama
mL	Militro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
MN	Micronúcleos
MNPCEs	<i>Micronucleated polychromatic erythrocytes</i>
MTT	<i>Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NBUD	<i>Nuclear budding</i>
NCE	<i>Normochromatic erythrocyte</i>
NEU	<i>N-Nitroso-N-ethylurea</i>
NPB	<i>Nucleoplasmic bridge</i>
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCE	<i>Polychromatic erythrocyte</i>
Ph	Potencial Hidrogeônico
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisae</i>	<i>Sacharomyces cerevisae</i>
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>S. praealtum.</i>	<i>Sedum. praealtum</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SSBs	<i>Single-strand breaks</i>
Unib:SW	Camundongos heterogênicos <i>Swiss albinus</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS.....	16
3.	REVISÃO DE LITERATURA	17
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1.	Extrato vegetal	22
4.2.	Triagem fitoquímica: flavonoides e compostos fenólicos	23
4.3.	Ensaio de sensibilidade antimicrobiana e citotoxicidade <i>in vitro</i>	23
4.3.1.	Cepas microbianas	23
4.3.2.	Difusão em agar: bactérias e leveduras.....	24
4.3.3.	Concentração Inibitória Mínima (CIM): bactérias e leveduras.....	25
4.3.4.	Concentração microbicida mínima (CMM): bactérias e leveduras..	26
4.3.5.	Disco Difusão: micobactéria	27
4.3.6.	Triagem citotóxica <i>in vitro</i>	27
4.4.	Ensaio do Micronúcleo	29
4.4.1.	Sistema – teste <i>in vivo</i>	29
4.4.2.	Grupos experimentais	29
4.4.3.	Processamento da medula óssea e análise celular	30
4.5.	Análises estatísticas	31
5.	RESULTADOS	32
5.1.	Triagem fitoquímica	32
5.2.	Sensibilidade antimicrobiana e citotoxicidade <i>in vitro</i>	32
5.3.	Ensaio do micronúcleo	34
6.	DISCUSSÃO	40
7.	CONCLUSÃO	45
8.	REFERÊNCIAS	47
9.	ANEXO	56

1 INTRODUÇÃO

Este foi o primeiro estudo científico sobre a composição fitoquímica, a atividade citotóxica *in vitro*, a ação antimicrobiana e o potencial genotóxico *in vivo* de *S. praealtum* DC. (Bálsamo). Esta pesquisa identificou uma elevada quantia de compostos fenólicos no extrato hidroetanólico da raiz de *S. praealtum* DC. (Bálsamo). Contudo, o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. praealtum* mostrou atividade antimicrobiana de amplo espectro e valores variáveis de CIM, abrangendo bactérias gram-negativas (*E. aerogenes*; *E. coli*; *P. aeruginosa*; *P. mirabilis*; *S. marcescens* e *S. typhimurium*), gram-positivas (*B. cereus*; *B. subtilis*; *E. faecalis*; *M. luteus* e *S. aureus*) e levedura (*S. cerevisiae*), enquanto que a ação antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos do caule e da raiz foi restrita ao grupo de bactérias gram-positivas e a levedura *S. cerevisiae* analisadas, exceto para *E. coli* (caule) e *P. mirabilis* (raiz). Nenhum dos extratos hidroalcoólicos de *S. praealtum* apresentou ação antifúngica contra *C. albicans* e antimicobacteriana contra *M. tuberculosis* e *M. bovis*. A sensibilidade antimicrobiana de *S. praealtum* pode ter ação estática e/ou microbicida dependente ou não da espécie microbiana e da parte anatômica da planta (folha, caule ou raiz). O índice de seletividade estabelecido para *S. praealtum* foi considerado aceitável (IS > 1) para o extrato hidroalcoólico da raiz diante das CIMs de *P. mirabilis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *M. luteus*, *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. cerevisiae* e os dados de citotoxicidade *in vitro* (CI) de células de *Aedes albopictus*, e aceitável para o extrato hidroalcoólico da folha diante da CIM de *S. cerevisiae* e a CI de *A. albopictus*. A partir dos dados de ação antimicrobiana de amplo espectro de *S. praealtum*, o extrato hidroalcoólico das folhas foi avaliado quanto ao potencial genotóxico usando o ensaio do micronúcleo *in vivo*. Efeitos não genotóxicos (i.e., ausência de mecanismos clastogênicos e/ou aneugênicos) e efeitos tóxicos na medula óssea de camundongos (i.e., toxicidade sistêmica), independentemente das doses de administração fitoterapêutica (0,5-2 g.Kg⁻¹) e dos tempos de tratamento (24h: efeito agudo; 48h: efeito crônico), porém sexo-dependente (macho e fêmea), foram características observadas no extrato hidroalcoólico das folhas de *S. praealtum*.

Parcialmente, a somatória desses resultados fornece uma base para a utilização e para o desenvolvimento compreensivo de recursos vegetais, especialmente para *S. praealtum*. Todavia, a caracterização fitoquímica avançada aliada aos diversos estudos farmacológicos e farmacogenômicos, incluindo outros estudos envolvendo a genotoxicidade e antigenotoxicidade de extratos e óleos de *S. praealtum*, deveriam ser conduzidos [incluindo ensaios de genotoxicidade com o teste de *Salmonella typhimurium* (*Ames test*) como um

indicador de carcinogenicidade potencial para mamíferos, teste de mutação gênica em células de mamíferos (*mouse lymphoma assay*), testes de aneuploidia e citogenético *in vitro*, teste do micronúcleo em culturas celulares *in vitro*, teste de hibridização *in situ* fluorescente para metagênese (*fluorescent in situ hybridization – FISH*), teste do cometa (*comet test*) para detectar danos e reparo no DNA em células individualizadas, e testes de genômica e proteômica funcional para mutagênese (*cDNA microarrays and other array analyses*)], a fim de caracterizar os efeitos potencial e mecanismos genotóxicos e antígenotóxicos e, mais importante, para o estabelecimento de limites para o consumo humano, para o delineamento dos riscos potenciais à saúde humana, e para a implementação de estratégias racionais e de medidas quimio-preventivas.

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Apesar de poucas informações acerca dos conhecimentos populares e das pesquisas científicas suportarem a efetividade terapêutica potencial da decocção aquosa, do extrato aquoso ou do suco liofilizado de bálsamo (*S. praealtum* DC.), como por exemplo, sintomas oculares (DE LA CRUZ, 1964; MARTINEZ, 1967), úlcera gástrica (CARLINI et al., 1970; DE MELO et al., 2009), ação anti-inflamatória (CAMARGO et al., 2002), contraceptivo (SILVA-TORRES et al., 2003), inibição da motilidade de espermatozoides humanos e atividade antifertilização em ratos (GARCIA-PINEDA et al, 1986), um número limitado e/ou inexistente de investigações visando o conhecimento dos efeitos antimicrobianos [apenas para as espécies de *Sedum aizoon* e *Sedum tatarinowii* (HU & XU, 2012)] e genotóxicos tem sido observado até o presente momento. Objetivando contribuir com as informações sobre o potencial antimicrobiano e genotóxico de fitoterápicos, de modo especial do extrato hidroetanólico do caule, da folha e da raiz de *S. praealtum* DC. (Bálsamo), a presente pesquisa avaliou (i) a ação antibacteriana, antimicobacteriana e antifúngica, empregando a técnica de microdiluição em caldo e o teste de difusão em agar e (ii) os efeitos genotóxicos por meio do ensaio do micronúcleo *in vivo* na medula óssea de camundongos. Uma triagem da atividade citotóxica *in vitro* e da composição fitoquímica (dosagem de flavonóides e compostos fenólicos) desses extratos também foi realizada.

3 REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil é considerado o país de maior diversidade biológica, destacando-se no *ranking* mundial com cerca de 20% da diversidade de plantas do mundo (CALIXTO, 2003). Estima-se em 45,3 mil a 49,5 mil, o número de espécies de plantas descritas no território brasileiro (SHEPHERD, 2002). Valiosos conhecimentos acerca das plantas provêm da tradição popular, porém o uso indevido de determinadas espécies medicinais tem sido considerado perigoso, podendo acarretar desde leves efeitos colaterais até a morte do indivíduo. No passado, a fitoterapia foi adotada pela população carente da área rural ou urbana, devido à fácil disponibilidade e aos menores custos. Historicamente, o uso de plantas como uma fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento como uma solução alternativa aos problemas de saúde e está bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na Ásia, na América Latina e na África (SHALE et al., 1999).

O uso tradicional de diversas plantas medicinais com base nos conhecimentos populares, aliado à crença de que produtos naturais não causam reações adversas, fez com que poucas plantas medicinais fossem avaliadas pelos estudos pré-clínicos e clínicos, os quais objetivam comprovar a eficácia e a segurança farmacológica. Além disso, sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja pela sua natural composição fitoquímica ou pela adição de contaminantes e adulterantes durante as preparações fitoterápicas. Por conseguinte, esse fato também agrega uma justificativa para a implantação de rigoroso controle de qualidade desde o cultivo da planta, a coleta e o processamento de suas partes, a extração de seus componentes, até a elaboração do medicamento final (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006).

Os fitoterápicos ganharam terreno no arsenal terapêutico mundial, principalmente por sua baixa toxicidade, pelo baixo custo e pelo uso de tecnologias que utilizam baixos níveis de investimento e de insumos (VALDES et al., 2000). Por causa do aumento do interesse por produtos naturais, o uso de plantas medicinais tornou-se comum. Entretanto, muitas dessas plantas não foram estudadas e devem ser avaliadas quanto à sua bioatividade, em contraste com plantas nativas da Europa as quais foram exaustivamente estudadas (DUARTE, 2006).

O gênero *Sedum* (Família *Crassulaceae*) apresenta mais de 350 espécies que engloba um grande número de espécies farmacologicamente ativas. Estudos químicos de espécies *Sedum* têm conduzido ao isolamento de várias classes de substâncias, tais como alcaloides, taninos, flavonoides e compostos cianogênicos (NAHRSTEDT et al., 1982; MULINACCI et al., 1995; STEVENS et al., 1995; DE MELO et al., 2005). A espécie *Sedum praealtum* DC.

[synonym. *Sedum dendroideum* e *Sedum dendroideum* ssp. *praealtum* (A. DC.) (CLAUSEN, 1959; KERGUÉLEN, 1999; RZEDOWSKI & RZEDOWSKI, 1979)] é um pequeno arbusto com flores amarelas, encontrada do México até a Guatemala, conhecido popularmente como Bálsamo (RZEDOWSKI & RZEDOWSKI, 1979). De acordo com a classificação de Lino e colaboradores (2008), o bálsamo ocupa a seguinte posição taxonômica: Divisão *Magnoliophyta*; Classe *Magnoliopsida*; Subclasse *Rosidae*; Ordem *Rosales*; Família *Crassulaceae*; Gênero *Sedum*; Espécie *Sedum dendroideum* subsp. *praealtum* (DC.). Lorenzi (2001) mencionou que o bálsamo é uma planta originária de áreas semidesérticas, com 30 a 60 cm de altura, folhas carnosas, planas, lisas, espatuladas, recurvadas e reunidas em verticilos; suas inflorescências são terminais, ramificadas, com numerosas flores amarelas, formadas no outono e no inverno. Seu cultivo ocorre isoladamente ou em grupos, a pleno sol, em terra fértil e permeável, bem como em jardins de pedras e é uma planta tolerante à seca e a geadas. O sumo de suas folhas é tido como cicatrizante. A propagação do bálsamo (*Sedum praealtum*) se dá, especialmente, por estaca de galhos e estas devem ser plantadas em covas no espaçamento 0,5 × 0,5m, quando as plantas tiverem de cinco a oito folhas definitivas (LINO et al, 2008).

Seus efeitos benéficos têm sido conhecidos desde a antiguidade em que o povo latino usa essa planta para tratar a dor nos olhos (DE LA CRUZ, 1964) e os olhos inchados (MARTINEZ, 1967). Uma decoção aquosa de partes de *S. praealtum* tem sido usada para tratar úlcera (CARLINI et al., 1970, DE MELO et al., 2009), problemas inflamatórios gerais (CAMARGO et al., 2002) e como contraceptivo (SILVA-TORRES et al., 2003). Um estudo prévio do extrato aquoso de *S. praealtum*, porém sob o nome de *S. dendroideum* (*Crassulaceae*), evidenciou um efeito inibidor relevante sobre a motilidade de espermatozoides humanos, bem como uma atividade antifertilização em ratos Sprague-Dawley (GARCIA-PINEDA et al, 1986). Em outro estudo, empregando modelos de contorção induzido por ácido acético em camundongos (atividade antinociceptiva) e de edema de orelha de camundongo induzida por óleo de cróton e peritonite induzida por carragenina (atividade antiinflamatória), foi demonstrado que os principais glicosídeos kaempferol podem ser responsáveis pelo uso medicinal de *S. dendroideum* contra a dor e contra problemas inflamatórios (DE MELO et al., 2009). Ainda, efeitos antimicrobianos foram relatados apenas em outras duas espécies do gênero *Sedum*, *S. aizoon* e *S. Tatarinowii* (HU & XU, 2012). A atividade antimicrobiana de plantas medicinais tem sido atribuída a pequenos terpenoides e compostos fenólicos como timol, carvona, carvacrol, mentol e muroleno, que também na forma pura exibem atividade antibacteriana ou antifúngica. Apesar dos mecanismos de ação

estar pobremente caracterizados, esta parece estar associada ao caráter lipofílico dos compostos, havendo um acúmulo em membranas e de perda de energia pelas células (SIKKEMA et al., 1995).

Compostos biologicamente ativos têm sido reconhecidos quanto as suas propriedades farmacológicas, contudo vários desses compostos não puderam ser introduzidos em terapêutica devido às suas propriedades toxicológicas, carcinogênicas e mutagênicas (AMES, 1983; KONSTANTOPOULOU et al., 1992; TAVARES, 1996). No desenvolvimento de novos fármacos, as análises dos ensaios de genotoxicidade representam considerável peso, visto que a maioria das indústrias farmacêuticas delibera o processamento de um novo agente terapêutico com base também nos dados de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (PURVES et al., 1995). Nesse contexto, os ensaios para avaliação da atividade mutagênica das plantas usadas pela população, bem como suas substâncias isoladas, são necessários e importantes para estabelecer medidas de controle no uso indiscriminado. Além disso, é preciso esclarecer os mecanismos e as condições que mediarão o efeito biológico, antes que as plantas sejam consideradas agentes terapêuticos (VARANDA, 2006).

Os efeitos genotóxicos de um agente mutagênico potencial dependem do seu alvo celular. Alguns compostos químicos necessitam ser metabolizados antes de adquirir sua capacidade mutagênica (MATEUCA et al., 2006). Agentes mutagênicos podem induzir alterações genômicas atingindo direta e/ou indiretamente a molécula de DNA, ou ligando-se às proteínas envolvidas na manutenção da integridade genômica (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003). As consequências das interações entre os agentes mutagênicos e os seus alvos podem conduzir a diferentes tipos de danos no DNA (aductos de DNA; sítios alcalinos lábeis; rupturas dos filamentos) e mutações que vão desde alterações nucleotídicas simples (mutações gênicas) até alterações cromossômicas estruturais (mutações cromossômicas) ou numéricas (mutações genômicas). Finalmente, o destino celular é então determinado pelas várias lesões provocadas sobre o genoma e a capacidade celular intrínseca de reparo ou de processos de eliminação por apoptose (DECORDIER et al., 2002).

Tanto quanto os estudos de genotoxicidade estão preocupados, o ensaio do micronúcleo *in vivo* (*micronucleus* – MN) em medula óssea de roedores desempenha um papel crucial à bateria de testes que objetivam a identificação de riscos por agentes mutagênicos (MATEUCA et al., 2006), especialmente à avaliação de riscos mutagênicos em que se permite a consideração de fatores metabólicos *in vivo*, da farmacocinética e dos processos de reparo do DNA, embora estes possam variar entre as espécies, entre tecidos e entre os mecanismos genéticos (OECD, 1997a,b; RIBEIRO et al., 2003). Uma vez que o

eritroblasto da medula óssea se desenvolve em um eritrócito policromático (*polychromatic erythrocyte* – PCE) (i.e., célula originada após a extrusão do núcleo principal), qualquer micronúcleo que tenha sido formado pode permanecer atrás, de outro modo, no citoplasma anucleado. Desse modo, a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (*micronucleated polychromatic erythrocytes* – MNPCEs) tem sido o principal *endpoint*. Por outro lado, a mensuração de MNPCEs em sangue periférico tem sido igualmente aceitável em qualquer espécie na qual a inabilidade do baço de remover eritrócitos micronucleados tem sido demonstrada, ou a qual tem mostrado uma adequada sensibilidade para detectar agentes que causam aberrações cromossômicas numéricas ou estruturais. Os resultados positivos (i.e., um aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em animais tratados) indicam que uma substância induz a formação de micronúcleos, os quais surgem como um resultado de danos cromossômicos ou de danos ao aparato mitótico nos eritroblastos das espécies teste, enquanto que os resultados negativos indicam que, sob as condições experimentais, a substância teste não induz a produção de micronúcleos nos eritrócitos imaturos das espécies teste. Todavia, o número de eritrócitos normocromáticos (*normochromatic erythrocyte* – NCE) no sangue periférico, que contém micronúcleos entre um dado número de eritrócitos maduros, pode também ser usado como *endpoint* deste ensaio (OECD, 1997c; RIBEIRO et al., 2003). Além disso, o conhecimento dos efeitos genotóxicos induzidos por fitoterápicos e por alimentos, empregando o ensaio do MN *in vivo* em mamíferos, tem sido o anseio de vários grupos de pesquisadores (ALVES et al., 2013; BORIOLLO et al., 2014ab; CHANDRASEKARAN et al., 2011; INDART et al., 2007; SILVA et al., 2012; VENKATESH et al., 2007).

Micronúcleos (MNs) são corpos extranucleares pequenos que surgem durante a divisão celular a partir de fragmentos cromossômicos / cromossômicos acêntricos ou cromossomos / cromátides totais que se atrasam na anáfase e não são incluídos nos núcleos filhos durante a telófase (FENECH & MORLEY, 1985). Micronúcleos abrigando fragmentos cromossômicos podem resultar de quebras do DNA de fita dupla, de conversão de quebras de fita simples (*single-strand breaks* – SSBs) em quebras de fitas duplas (*double-strand breaks* – DSBs) após a replicação celular, ou inibição de síntese de DNA. O reparo equivocado de duas quebras cromossômicas pode conduzir a um rearranjo cromossômico assimétrico, produzindo um cromossomo dicêntrico e um fragmento acêntrico. Frequentemente, os centrômeros de cromossomos dicêntricos são puxados para polos opostos das células durante a anáfase, resultando na formação de uma ponte nucleoplásmica (*nucleoplasmic bridge* – NPB) entre os núcleos filhos e um fragmento acêntrico que fica atrasado para formar um MN (FENECH et

al., 2005; THOMAS et al., 2003). Micronúcleos abrigando cromossomos totais são essencialmente formados a partir de defeitos na maquinaria de segregação cromossômica, tais como deficiências nos genes que controlam o ciclo celular, falha do fuso mitótico, cinetócoro, ou outras partes do aparato mitótico ou por danos até subestruturas cromossômicas, rompimento mecânico (ALBERTINI et al., 2000) e hipometilação do DNA centromérico (FENECH et al., 2005). Micronúcleos podem também surgir por amplificação gênica via ciclos de quebra-fusão-ponte (*breakage-fusion-bridge* – BFB), quando o DNA amplificado está seletivamente localizado em locais específicos da periferia do núcleo e eliminado via brotamento nuclear (*nuclear budding* – NBUD) durante a fase S do ciclo celular (FENECH, 2002). O destino do MN, após a sua formação na célula micronucleada, é pobremente entendido. Seu destino pós-mitótico inclui: (i) eliminação da célula micronucleada como uma consequência do apoptose (DECORDIER et al., 2002); (ii) expulsão da célula (quando o DNA dentro do MN não é esperado para ser funcional ou capaz de replicação devido à ausência dos componentes citoplasmáticos necessários); (iii) reincorporação dentro do núcleo principal (quando o cromossomo reincorporado pode ser indistinguível daqueles do núcleo principal e pode retomar a atividade biológica normal); (iv) retenção dentro do citoplasma da célula como uma entidade extra-nuclear (quando o MN pode completar um ou mais rodadas de replicação cromossômica/DNA) (LEACH & JACKSON-COOK, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extrato vegetal

Amostras de caule, folha e raiz de *S. praealtum* DC. foram provenientes do município de Alfenas, estado de Minas Gerais, Brasil (21° 24' 44.98" S e 45° 57' 39.87" O, elevação de 818m). Essa planta foi gentilmente identificada e arquivada na Rede Nacional de Herbários da Sociedade Botânica do Brasil (UNIFAL – MG UALF), pelo Prof. Dr. Marcelo Polo (Exsicata n° 1024). Partes anatômicas da planta (caule, folha e raiz) foram limpas e cortadas manualmente e os extratos hidroalcoólicos foram macerados (200 mg.mL⁻¹) durante sete dias em etanol 70 °GL, ao abrigo da luz e sob agitação diária. Em seguida, esses extratos foram submetidos ao processo de filtração, empregando filtro de nylon e papel de filtro. Previamente aos ensaios de sensibilidade antimicrobiana e de genotoxicidade, alíquotas de 500 mL desses extratos foram submetidos ao processo de remoção de solventes em evaporador rotativo (40 r.p.m.) (Rotary Evaporator RV 10 Control V, IKA® Works, Inc., USA), acoplado em sistema de banho de aquecimento (40 °C) (Heating Baths HB10, IKA® Works, Inc., USA); bomba de vácuo (175 mbar) (Bomba de vácuo MD 1C, com válvula reguladora, marca Vacuubrand, VACUUBRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Germany); recirculador de água destilada a temperatura de 10 °C (Banho Ultratermostatizado Microprocessado Digital, SPLABOR, cód. # SP-152/10, Presidente Prudente, SP, Brazil) e frasco de evaporação (RV 10.85 Evaporation Flask, NS 29/32 2L, IKA® Works, Inc., USA). O produto final da evaporação rotativa foi transferido para um frasco reagente de 1L (SCHOTT® DURAN®) e mantido a temperatura de -20 °C por 24 horas, a fim de avaliar o processo de congelamento desse produto e a eficácia da evaporação do solvente (FARMACOPÉIA, 2010; SILVA et al., 2012; BORIOLLO et al., 2014ab). Em seguida, alíquotas de 5 mL dos extratos foram transferidas em frascos injetáveis de vidro tipo penicilina (15 mL) e submetidas ao processo de liofilização (Liofilizador modelo Alpha 1-2 LDPlus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH®, Alemanha) e determinação de suas massas secas (Balança Analítica Eletrônica AUW-220D, ShimadzuCorp., Kyoto, Japão). Soluções-padrão dos extratos liofilizados (caule, folha e raiz de *S. praealtum* DC.) foram preparadas em solvente aquoso [água ultrapura tipo 1 (Sistema Milli-Q Direct 8, Millipore Indústria e Comércio Ltda., Barueri, SP, Brasil)], em concentrações de 20× (ensaios de sensibilidade antimicrobiana) e 2× (ensaios de citotoxicidade *in vitro* e de genotoxicidade *in vivo*) da concentração final desejada,

esterilizadas por filtração (Millipore Corporation, Membrana Filtrante Durapore® PVDF hidrofílico, 0,22 µm, Ø 47 mm, cat. # GVWP 047 00) e armazenadas em tubos de polipropileno de 50 mL estéreis à temperatura de -70 °C até o momento de uso.

4.2 Triagem fitoquímica: flavonoides e compostos fenólicos

Os extratos hidroetanólicos de folha, caule e raiz de *S. praealtum* foram submetidos às análises fitoquímicas, usando técnicas colorimétricas e de precipitação para detectar flavonoides. Reações de AlCl₃ e Shinoda foram feitas para caracterizar preliminarmente esses compostos (COSTA, 1994). Volumes de 5 mL foram usados para a reação e para determinação do teor de flavonoides [0,5 mL de extrato de *S. praealtum* (50 mg.mL⁻¹); 1,5 mL de C₂H₆O; 0,1 mL de AlCl₃ . H₂O a 10% (m/v); 0,1 mL de 1M C₂H₃KO₂; 2,8 mL de H₂O destilada]. Solução de quercetina foi empregada para o estabelecimento da curva padrão de flavonoides e, conseqüentemente, seus teores foram expressos em equivalentes de quercetina (mg Q/g do extrato). A leitura dos resultados foi realizada após 30 min de reação, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, em espectrofotômetro (Thermo Scientific Multiskan GO UV/Vis, Microplate and Cuvette Spectrophotometer, ref. # 51119200, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) com comprimento de onda de 425 nm (A_{425 nm}). Para os compostos fenólicos totais, volumes de 5 mL foram usados para a reação e para determinação do teor [0,5 mL de extrato de *S. praealtum* (0,1 mg.mL⁻¹); 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (diluído em água destilada 1:10); 2,0 mL de Na₂CO₃ a 4% (m/v) em água destilada]. A leitura dos resultados foi realizada, após 2 h de reação, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, em espectrofotômetro com comprimento de onda de 750 nm (A_{750 nm}). Esses teores foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg AG/g) a partir da curva padrão (5 a 100 µg.mL⁻¹) (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999).

4.3 Ensaios de sensibilidade antimicrobiana e citotoxicidade *in vitro*

4.3.1 Cepas microbianas

Um total de 11 cepas bacterianas (*Bacillus subtilis* ATCC® 6633; *Bacillus cereus* ATCC® 11778; *Micrococcus luteus* ATCC® 9341; *Enterococcus faecalis* ATCC® 51299; *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538; *Escherichia coli* ATCC® 25922; *Serratia marcescens*

LMI-UNIFAL; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853; *Proteus mirabilis* ATCC® 25922; *Salmonella typhimurium* ATCC® 14028 e *Enterobacter cloacae* LMI-UNIFAL); 2 cepas de leveduras (*Candida albicans* ATCC® 10231 e *Sacharomyces cerevisiae* ATCC® 2601) e 2 cepas micobacterianas [*Mycobacterium tuberculosis* ATCC® 25177 (H37Ra) e *Mycobacterium bovis* (BCG)] foram estudadas.

4.3.2 Difusão em agar: bactérias e leveduras

O perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* das cepas bacterianas e de leveduras frente aos extratos de *S. praealtum* foi determinado pelo método de difusão em Agar, seguindo-se as diretrizes estabelecidas pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI M02-A11, 2012; CLSI M100S22, 2012; CLSI M44-A2, 2009), com algumas adaptações (SILVA et al., 2014). Previamente aos ensaios, as bactérias e leveduras foram cultivadas em agar BHI a 35 °C por 24 horas e em agar SDA a 35 °C, por 24 horas, respectivamente. Em seguida, um inóculo (alça de 10 µL) de cada amostra microbiana foi ressuspenso em 5 mL de solução salina estéril (145 mM NaCl) e ajustado a uma turbidez da escala de McFarland 0.5 (bactérias: $1-4 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹; leveduras: $1-5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹) ou equivalente a uma transmitância de 79,5-83,2%, usando espectrofotômetro (Thermo Scientific Multiskan GO UV/Vis, Microplate and Cuvette Spectrophotometer, ref. # 51119200, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) com comprimento de onda de 625 nm (bactérias) e 530 nm (leveduras) ($T = 79,5-83,2\% \rightarrow A_{625\text{ nm}/530\text{ nm}} = 2 - \log_{10} \%T \rightarrow A_{625\text{ nm}/530\text{ nm}} = 0,100-0,080$). Essa suspensão celular foi agitada em vórtex durante 15 segundos e semeada (método de *Spread-Plate*) sobre meio de cultura agar MH estéril, pH 7,2 a 7,4 (Mueller Hinton n°2 Cations Controle, cód. # M1657, Himedia), e sobre meio de cultura agar MH estéril, suplementado com 2% de glicose, para bactérias e leveduras, respectivamente, previamente preparados em placa de Petri (150 × 15 mm; 50 mL de meio de cultura/placa; altura do meio em cada placa igual a $4 \pm 0,5$ mm). Essas placas foram mantidas a temperatura ambiente por 15 minutos para a completa absorção do inóculo no meio de cultura. Então, 40 µL de cada extrato (100 mg.mL⁻¹) foram dispensados em poços (4 mm de Ø), uniformemente confeccionados sobre a superfície do meio de cultura inoculado, e as placas foram incubadas de modo invertido a 35 °C por 24 horas. Esses testes foram realizados em sistemas de ensaios triplicatas e a interpretação dos resultados foi realizada a partir da zona de inibição de crescimento microbiano (Ø do halo em milímetros). Clorexidina a 0,12 % (m/v) e água tipo 1

foram utilizados como controle positivo (presença de zona de inibição) e negativo (ausência de zona de inibição), respectivamente.

4.3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM): bactérias e leveduras

A concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de *S. praealtum* DC., frente às cepas bacterianas e de leveduras, foi investigada pelo método de microdiluição em caldo, seguindo-se as diretrizes estabelecidas pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI M07-A9, 2012; CLSI M27-A3, 2008; CLSI M27-S4, 2012), com algumas adaptações. As concentrações testadas abrangeram uma escala de 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781, 0.390, 0.195, 0.097, 0.048 e 0.024 mg.mL⁻¹. Esses testes foram realizados em sistemas de ensaios triplicatas, empregando placas de microdiluição com múltiplos poços (96-well cell culture microplates, flat-bottom, Corning Inc., NY, USA), contendo 50 µL de meio de cultura líquido MH estéril, pH 7,2 a 7,4 (Mueller Hinton nº2 Cátions Controle, cód. # M1657, Himedia) para bactérias, e meio de cultura líquido MH estéril, suplementado com 2% de glicose para leveduras, em água ultrapura tipo 1.

Previamente aos ensaios:

(i) soluções-padrão dos extratos liofilizados (item 2.1.) foram diluídas 10× em meio de cultura líquido MH. Então, alíquotas de 50 µL dessas diluições foram aplicadas nos primeiros poços da cada fileira das placas de microdiluição, contendo meio de cultura líquido MH (50 µL), seguindo os procedimentos de diluições seriadas (2×), a fim de produzir diferentes concentrações dos extratos a serem testados.

(ii) as bactérias e as leveduras foram cultivadas em agar BHI e SDA, respectivamente, a 35 °C por 24 horas. Em seguida, um inóculo (alça de 10 µL) de cada amostra microbiana foi ressuspensão em 5 mL de solução salina estéril (145 mM NaCl) e ajustado a uma turbidez da escala de McFarland 0.5 (bactérias: 1×10^8 UFC.mL⁻¹; leveduras: $1-5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹) ou equivalente a uma transmitância de 79,5-83,2%, usando espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm (bactérias) e 530nm (leveduras) ($T = 79,5-83,2\% \rightarrow A_{625\text{ nm}/530\text{ nm}} = 2 - \log_{10} \%T \rightarrow A_{625\text{ nm}/530\text{ nm}} = 0,100-0,080$). A suspensão celular bacteriana foi agitada em vórtex durante 15 segundos e diluída 1:10 em solução salina estéril (1×10^7 UFC.mL⁻¹). A suspensão celular leveduriforme foi agitada em vórtex durante 15 segundos e diluída 1:10 em solução salina estéril ($1-5 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹), seguida de uma nova diluição 1:10 ($1-5 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹). Durante os ensaios, alíquotas de 5 µL de cada inóculo de trabalho (5% do volume

do poço) foram inseridas nos poços das placas de microdiluição, contendo 100 µL/poço de meio de cultura líquido MH e diferentes concentrações dos produtos a serem testados (*S. praealtum* DC.): concentração final do inóculo bacteriano igual a 5×10^5 UFC.mL⁻¹ e do inóculo leveduriforme igual a $0,5-2,5 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹.

Então, essas placas de microdiluição foram incubadas a 35 °C por 24 (bactérias) e 48 (leveduras) horas. Logo após o período de incubação, alíquotas de 30µL de solução de resazurina (Resazurin sodium salt, Cat. # R7017, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo., USA), previamente preparada a 0.02% (m/v) em água tipo 1, esterilizada por filtração e estocada a 4 °C por até 1 semana, foram adicionados em cada poço, e as placas foram reincubadas *overnight*. A interpretação dos resultados foi feita por meio da leitura visual das placas de ensaio. Uma mudança na cor de azul para rosa indicou o crescimento microbiano, e o MIC foi definido como a menor concentração da droga que impediu essa mudança na cor (MARTIN et al., 2003).

4.3.4 Concentração microbicide mínima (CMM): bactérias e leveduras

A concentração microbicide mínima (CMM) foi determinada conforme as modificações propostas por Cantón e colaboradores (2003). Para cada cepa microbiana, alíquotas de 50 µL do volume total do poço correspondente a CIM foram homogeneizadas com o auxílio de uma pipeta e cultivadas em placas de Petri (90 × 15 mm), contendo meio BHI e SDA para bactérias e leveduras, respectivamente. Cada alíquota foi depositada gentilmente em um determinado ponto sobre o meio de cultura e mantida a temperatura ambiente para a sua completa absorção. Então, a placa foi estriada (*streaked*), a fim de separar os micro-organismos e removê-los das fontes de droga (extrato de *S. praealtum* DC.) (MOORE et al., 2001), e incubada a 35 °C por 46-48 horas. A CMM foi a menor concentração da droga (extrato) capaz de eliminar ≥99,9% do inóculo final (0,05-0,25 colônia), ao passo que a atividade microstática foi definida a partir da redução de ≤99,9% do inóculo final. A concentração mínima da droga (extrato) considerada microbicide a 90% do inóculo final (5-25 colônias) foi definida como CMM₉₀ (CANTÓN et al., 2003; MARCOS-ARIAS et al., 2011).

4.3.5 Disco Difusão: micobactéria

O perfil de sensibilidade antimicobacteriana frente aos extratos de *S. praealtum* foi determinado pelo método de disco difusão, seguindo-se as diretrizes estabelecidas pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI M24-A2, 2011). As cepas de *M. tuberculosis* ATCC® 25177 (H37Ra) e *M. bovis* (BCG) foram testadas sobre o meio de cultura Middlebrook 7H10 (Middlebrook 7H10 Agar™BD, Cat. # 295964, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA), adicionado de Middlebrook OADC Enrichment (BBL™ Middlebrook OADC Enrichment, Cat. # 212240, Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA). Previamente aos ensaios, discos de papel de filtro (10 mm de Ø) foram umedecidos com soluções de extratos (50 mg.mL⁻¹) e secados em estufa a 37 °C. Discos, contendo Rifamicina e água tipo 1 foram utilizados como controle positivo (presença de zona de inibição) e negativo (ausência de zona de inibição), respectivamente. Células micobacterianas recém-cultivadas foram ressuspensas em 5 mL de solução salina estéril (145 mM NaCl), ajustadas a uma turbidez da escala de McFarland 0.5, com auxílio de pérolas de vidro para desagregação das colônias, e semeadas (método de *Spread-Plate*) sobre meio de cultura. Esses meios foram mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos para a completa absorção do inóculo no meio de cultura. Então, os discos contendo extratos de *S. praealtum* foram dispensados sobre a superfície do meio de cultura inoculado, e as placas foram incubadas de modo invertido a 35 °C por 8 semanas (i.e., as culturas foram analisadas dentro de 5-7 dias após a inoculação e uma vez por semana, subsequentemente, até atingir 8 semanas). Esses testes foram realizados em sistemas de ensaio triplicatas e a interpretação dos resultados foi realizada a partir da zona de inibição de crescimento microbiano (Ø do halo em milímetros). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) aos extratos de *S. praealtum* deveria ser realizada a partir do surgimento dessa zona de inibição de crescimento microbiano, seguindo-se as diretrizes estabelecidas pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI M24-A2, 2011).

4.3.6 Triagem citotóxica *in vitro*

A citotoxicidade *in vitro* (CI) dos extratos de *S. praealtum* DC. foi determinada pelo método MTT (*Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*) conforme descrito previamente (ARAÚJO et al., 2008; SILVA et al., 2014). Células de *Aedes albopictus* foram semeadas (1

$\times 10^4$ células por poço) em placas de microdiluição com múltiplos poços (96-well cell culture microplates, flat-bottom, Corning Inc., NY, USA), contendo 100 μL de meio de cultura L-15 [L-15 Medium (Leibovitz), without L-glutamine, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture. Cat. # L5520, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo., USA], adicionado de soro fetal bovino 1 % (Fetal Bovine Serum, USA origin, sterile-filtered, suitable for cell culture. Cat. # F6178, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo., USA). Então, as placas de microdiluição foram incubadas a 37 °C por 72 horas sob uma atmosfera de 5% de CO_2 . Logo após o período de incubação, alíquotas de 100 μL de meio L-15, adicionadas de diluições decrescentes dos extratos de *S. praealtum* DC. (5 até 0,039 mg.mL^{-1}), foram dispensadas nos poços das placas de microdiluição, as quais foram novamente incubadas a temperatura ambiente por 48 horas. Como controle de crescimento celular de *Aedes albopictus*, apenas o meio de cultura L-15, adicionado de soro fetal bovino, foi usado. Após o período de reincubação, alíquotas de 10 μL de solução de MTT [Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, powder, BioReagent, suitable for cell culture, suitable for insect cell culture, $\geq 97.5\%$ (HPLC). Cat. # M5655, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo., USA] foram adicionadas aos poços das placas de microdiluição e incubadas por 4 horas a temperatura ambiente, a fim da incorporação celular do MTT e a formação de cristais de formazan. A leitura dos resultados foi feita por análise espectrofotométrica (Thermo Scientific Multiskan GO UV/Vis, Microplate and Cuvette Spectrophotometer, ref. # 51119200, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) com comprimento de onda de 600 nm ($A_{600\text{nm}}$). O percentual de citotoxicidade *in vitro* ($\text{CI}_{\%}$) foi calculado usando a seguinte fórmula: $A \times B / A \times 100$, onde *A* e *B* correspondem aos valores de $A_{600\text{nm}}$ obtidos a partir do controle de crescimento celular (meio L-15 + soro fetal bovino + *Aedes albopictus*) e o crescimento celular na presença de *S. praealtum* DC. (meio L-15 + soro fetal bovino + *Aedes albopictus* + diluições dos extratos), respectivamente. As citotoxicidades *in vitro* de 50% (CI_{50}) e 90% (CI_{90}) foram estimadas usando a regressão linear e definidas como concentrações do extrato capazes de reduzir 50% e 90%, respectivamente, os valores de $A_{600\text{nm}}$, obtidos a partir do crescimento celular na presença de *S. praealtum* DC. em comparação com aqueles do controle de crescimento celular. Todos esses testes foram realizados em sistema de ensaio duplicata e com o controle de viabilidade celular.

4.4 Ensaio do Micronúcleo

4.4.1 Sistema – teste *in vivo*

Camundongos heterogenéticos *Swiss albinus* (Unib:SW) adultos jovens (entre 7 e 12 semanas – período púbere), machos e fêmeas, com massa corporal entre 30 g e 40 g (i.e., a variação de peso entre os animais, para cada sexo, não deverá exceder a $\pm 20\%$ da massa média) e saudáveis, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, Área da Ciência Animal de Laboratório, UNICAMP (CEMIB, <http://www.cemib.unicamp.br>), foram utilizados no teste do micronúcleo em eritrócitos da medula óssea (BORIOLLO et al., 2014ab; KRISHNA & HAYASHI, 2000; OECD, 1997; CSGMT, 1986). Os animais foram mantidos em grupos do mesmo sexo, em caixas de polipropileno, em ambiente climatizado a $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar igual a $50\% \pm 20\%$, e em ciclos de luminosidade de 12 horas (i.e., 12 horas claro/12 horas escuro). Estes foram tratados com ração comercial Labina Purina® (Nestlé Purina Petcare Company) e água *ad libitum*, e aclimatados às condições do laboratório por 7 dias (período experimental) antes da realização do experimento. Ao final do período experimental, cada animal foi pesado e, de acordo com o peso, recebeu tratamento de $2\text{ mL}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de massa corpórea da solução indicada (controle negativo, controle positivo e fitoterapêutico). Após o tratamento experimental, os animais foram eutanasiados por asfixia com CO_2 em câmaras acrílicas adaptadas (BORIOLLO et al., 2014ab; KRISHNA & HAYASHI, 2000). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Animais da UNIFENAS (CEPEAU Protocol No. 08A/2014).

4.4.2 Grupos experimentais

Grupos experimentais (constituídos de 5 machos e 5 fêmeas cada) foram tratados, usando um único regime de dosagem administrado por gavagem (controle negativo e fitoterapêutico) ou de modo intraperitoneal (controle positivo) e dois tempos de eutanásia (24 e 48 h), com base nas recomendações regulatórias estabelecidas no ensaio do micronúcleo *in vivo* (KRISHNA & HAYASHI, 2000; OECD, 1997):

- Grupos controles: 150 mM NaCl (controle negativo), $50\text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de *N-Nitroso-N-ethylurea* (controle positivo: NEU, Sigma N8509, CAS no. 759-73-9) (BORIOLLO et al., 2014ab).

- Teste de genotoxicidade (fitoterapêutico): 500, 1.000 e 2.000 mg.Kg⁻¹ do extrato liofilizado de folhas de *S. praealtum* DC. e diluído em água tipo 1. A dose máxima tolerada (DMT) foi definida como (i) a maior dose que pode ser administrada sem induzir letalidade ou toxicidade excessiva durante o estudo causando eutanásia moribunda, ou (ii) uma dose que produz alguma indicação de toxicidade na medula óssea (e.g. uma redução na proporção de eritrócitos imaturos entre o total de eritrócitos na medula óssea), ou (iii) 2.000 mg.Kg⁻¹ (BORIOLLO et al., 2014ab; KRISHNA & HAYASHI, 2000; OECD, 1997).

4.4.3 Processamento da medula óssea e análise celular

Rapidamente após a eutanásia, os fêmures foram cirurgicamente e assepticamente removidos, e os animais foram adequadamente descartados. Cada fêmur foi seccionado na extremidade proximal e o conteúdo do canal medular foi lavado com 1,5 mL de solução de 150 mM NaCl e transferido para um tubo de centrifuga de 15 mL (BORIOLLO et al., 2014ab; KRISHNA & HAYASHI, 2000; OECD, 1997; ZAMBRANO et al., 1982). Esse material foi ressuspensionado com o auxílio de uma pipeta Pasteur a fim de assegurar uma distribuição ao acaso das células da medula óssea. Então, a suspensão foi centrifugada a 1.000 r.p.m. (Centrifuga de Bancada Microprocessada Mod. NT 810, Nova Técnica Ind. Com. Equipamentos p/ Laboratório Ltda., Piracicaba, SP, Brasil) por 5 minutos. O sedimento resultante foi ressuspensionado em 500 µL de solução de 150 mM NaCl, adicionado de formol 4% e o sobrenadante descartado. As lâminas foram preparadas por meio de esfregaço (2 lâminas por animal), secas a temperatura ambiente por 24 horas, e coradas em cuba de coloração, contendo corante de Leishman eosina-azul de metileno [corante puro por 3 min, seguido pelo corante diluído em água destilada (1:6) por 15 min], a fim de diferenciar eritrócito policromático (EPC) de eritrócito normocromático (ENC).

Eritrócitos policromáticos (EPCs) foram observados em aumento de 1.000 ×, empregando-se microscopia óptica (Nikon Eclipse E-200), contados (no mínimo 2.000 eritrócitos policromáticos anucleados por animal), com o auxílio de um contador de células digital (Contador Diferencial CCS02, Kacil Indústria e Comércio Ltda., PE, Brasil), e fotografados (Câmera Digital 8.1 Megapixels DC FWL 150). O número de EPCs e ENCs, o número e a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) foram reportados. A fim de avaliar a toxicidade da medula óssea, a proporção de EPC para ENC foi também observada (BORIOLLO et al., 2014ab; KRISHNA & HAYASHI, 2000; OECD,

1997). Essa proporção EPC/ENC é uma indicação da aceleração ou da inibição da eritropoiese, o que tem sido reportado para variar de acordo com o tempo de pontuação. Um declínio contínuo na proporção EPC/ENC pode ocorrer devido à inibição da divisão celular, a morte de eritroblastos, a remoção de células danificadas, ou a diluição do total de células existentes com células recém-formados (BORIOLLO et al., 2014ab; VENKATESH et al., 2007).

4.5 Análises estatísticas

Os dados obtidos nos testes de difusão em agar foram submetidos à análise da variância *one-way* (ANOVA) e comparação de médias por meio do teste de Scott-Knott ($\alpha = 0,05$) (SCOTT & KNOTT, 1974). Os dados de IC₅₀ e MIC foram utilizados para calcular o índice de seletividade (IS) de cada extrato [IS (CC₅₀/CIM)], conforme previamente reportado (PROTOPOVA et al., 2005). Os dados obtidos no ensaio do micronúcleo foram submetidos à análise da variância *one-way* (ANOVA), em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial $5 \times 2 \times 2$ (tratamento $\times$ sexo $\times$ tempo), e comparação de médias por meio do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), empregando o sistema computacional SAS[®] versão 9.3 (BORIOLLO et al., 2014ab).

5 RESULTADOS

5.1. Triagem fitoquímica

Para a triagem fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos da folha, do caule e da raiz de *S. praealtum*, flavonoides e compostos fenólicos foram quantificados por meio de técnicas colorimétricas e de precipitação. Nas condições testes desse ensaio, teores de flavonoides totais não foram detectados nos extratos hidroalcoólicos da folha, do caule e da raiz de *S. praealtum*. Por sua vez, teores de compostos fenólicos foram expressos em equivalentes de ácido gálico (mg AG/g), os quais exibiram valores na ordem de $200,43 \pm 11,6$ mg AG/g, $354,42 \pm 32,3$ mg AG/g e $690,56 \pm 29,5$ mg AG/g de extrato hidroalcoólico da folha, do caule e da raiz de *S. praealtum*, respectivamente.

5.2. Sensibilidade antimicrobiana e citotoxicidade *in vitro*

O perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* das cepas bacterianas gram-negativas (*E. coli*, *E. aerogenes*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* e *S. typhimurium*) frente aos extratos hidroalcoólicos do caule, da folha e da raiz de *S. praealtum*, conforme determinado pelo método de difusão em agar, revelou ausência de zona de inibição de crescimento microbiano ($\varnothing_{\text{mm}}$ do halo equivalente a 0). Considerando as cepas bacterianas gram-positivas, a presença de zona de inibição de crescimento microbiano ($\varnothing_{\text{mm}}$ do halo) foi observada para um maior número de cepas analisadas frente ao extrato hidroalcoólico da raiz de *S. praealtum* (4 de 5 cepas: *B. subtilis*, *B. cereus*, *M. luteus* e *S. aureus*), seguido do caule (3 de 5: *B. cereus*, *M. luteus* e *S. aureus*) e da folha (2 de 5: *B. cereus* e *M. luteus*). Entretanto, diferenças significativamente estatísticas ($p < 0.05$) foram observadas apenas entre as zonas de inibição de crescimento microbiano ($\varnothing_{\text{mm}}$ do halo), formadas a partir da espécie de *M. luteus* e o extrato hidroalcoólico do caule de *S. praealtum*. Entre as cepas de leveduras analisadas (*C. albicans* e *S. cerevisiae*), apenas para a espécie de *S. cerevisiae* houve zonas de inibição de crescimento frente aos extratos hidroalcoólico do caule e da raiz de *S. praealtum*. Os extratos hidroalcoólicos do caule, da folha e da raiz de *S. praealtum* não revelaram quaisquer zonas de inibição de crescimento frente às cepas de *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Todos os controles positivos (clorexidina para bactérias e leveduras; rifamicina para micobactérias) produziram

zonas de inibição de crescimento significativamente distintas ($p < 0.05$) daquelas observadas nos extratos hidroalcoólicos do caule, da folha e da raiz de *S. praealtum* (Tabela 1).

Embora sem qualquer zona de inibição de crescimento bacteriano gram-negativo, o ensaio da concentração inibitória mínima (CIM) revelou valores de CIM iguais a 25 mg.mL⁻¹ para cinco espécies (*E. coli*; *S. marcescens*; *P. aeruginosa*; *P. mirabilis* e *S. typhimurium*) e 50 mg.mL⁻¹ para uma espécie (*E. aerogenes*) usando o extrato hidroalcoólico da folha de *S. praealtum*, valor de CIM igual a 25 mg.mL⁻¹ para uma espécie (*E. coli*), usando o extrato do caule de *S. praealtum*, e valor de CIM igual a 50 mg.mL⁻¹ para uma espécie (*P. mirabilis*), usando o extrato da raiz de *S. praealtum*. Para as bactérias gram-positivas, os valores da CIM foram iguais a 12,5 mg.mL⁻¹ (*M. luteus*), 25 mg.mL⁻¹ (*B. cereus*; *E. faecalis* e *S. aureus*) e 50 mg.mL⁻¹ (*B. subtilis*), usando o extrato hidroalcoólico da folha de *S. praealtum*, iguais a 25 mg.mL⁻¹ (*B. cereus*; *M. luteus*; *E. faecalis* e *S. aureus*) e 50 mg.mL⁻¹ (*B. subtilis*), usando o extrato do caule de *S. praealtum*, e iguais a 12,5 mg.mL⁻¹ (*B. cereus*; *M. luteus*; *E. faecalis* e *S. aureus*) e 25 mg.mL⁻¹ (*B. subtilis*), usando o extrato da raiz de *S. praealtum*. Entre as cepas de leveduras, apenas *S. cerevisiae* revelou valores de CIM iguais a 6,25 mg.mL⁻¹, 12,5 mg.mL⁻¹ e 6,25 mg.mL⁻¹, usando os extratos hidroalcoólicos da folha, do caule e da raiz de *S. praealtum*, respectivamente (Tabela 1).

Atividades microbidas (25-50 mg.mL⁻¹) dos extratos hidroalcoólicos de *S. praealtum* foram observadas em apenas duas espécies de bactérias gram-negativas (*S. marcescens*: folha; e *P. mirabilis*: raiz), três espécies de bactérias gram-positivas (*B. subtilis*: raiz; *M. luteus*: folha, caule e raiz; e *S. aureus*: folha e raiz) e a levedura *S. cerevisiae* (folha, caule e raiz) (Tabela 1).

Para todas as espécies bacterianas gram-negativas e gram-positivas que apresentaram CIM (12,5-50 mg.mL⁻¹) frente aos extratos hidroalcoólicos da folha e caule de *S. praealtum*, o IS foi < 1.0 (0,17-0,69). O IS > 1 (1,4) foi encontrado para o extrato hidroalcoólico da folha de *S. praealtum* diante da CIM (6,25 mg.mL⁻¹) da levedura *S. cerevisiae* e IS < 1 (0,9) para o extrato do caule de *S. praealtum* diante da CIM (12,5 mg.mL⁻¹) dessa levedura. Uma vez que o extrato hidroalcoólico da raiz de *S. praealtum* não demonstrou citotoxicidade *in vitro* (CI) nas condições testadas (5 até 0,039 mg.mL⁻¹), o IS para o extrato da raiz foi considerado > 1 diante das CIMs dos respectivos micro-organismos *P. mirabilis*; *B. subtilis*; *B. cereus*; *M. luteus*; *E. faecalis*; *S. aureus* e *S. cerevisiae* (Tabela 1). Esses IS também foram obtidos a partir dos resultados do percentual da citotoxicidade *in vitro* (CI₅₀ e CI₉₀), cujos valores foram de 4,22 mg/mL (CI₅₀) e 8,61 mg/mL (CI₉₀) para o extrato da folha; 5,96 mg/mL (CI₅₀) e 11,14

mg/mL (CI₉₀) para o extrato do caule, e citotoxicidade *in vitro* inexistente para o extrato da raiz de *S. praealtum* (dados não mostrados).

5.3. Ensaio do micronúcleo

Em virtude do amplo espectro de ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. praealtum*, conforme observado no presente estudo, apenas o extrato proveniente das folhas foi estudado no ensaio do micronúcleo. Os números e as frequências de EPCMNs e as proporções de EPC/ENC na medula óssea de camundongos foram analisados estatisticamente para cada um dos grupos de animais tratado com o extrato hidroalcoólico liofilizado de folhas de *S. praealtum* e para cada um dos grupos tratados com 150 mM NaCl e *N-Nitroso-N-ethylurea* (grupos controle) – ensaio de genotoxicidade.

Para os grupos de animais tratados com o extrato das folhas de *S. praealtum*, as análises de EPCMNs não mostraram diferenças significantes ($p < 0,05$) entre todas as doses de tratamentos (500–2,000 mg.Kg⁻¹) e os grupos controles negativos (NaCl). Esses resultados sugerem ausência de genotoxicidade (clastogenia e/ou aneugenia) do extrato das folhas de *S. praealtum*, independentemente da dose de administração fitoterapêutica (500–2.000 mg.Kg⁻¹) e do tempo de tratamento (24 e 48 h), porém foi sexo-dependente (macho e fêmea). As análises obtidas a partir da proporção de EPC/ENC mostraram diferenças significantes ($p < 0,05$) entre os grupos controles (150 mM NaCl e 50 mg.Kg⁻¹ de *N-Nitroso-N-ethylurea*) e todas as doses do extrato das folhas de *S. praealtum* (500–2.000 mg.Kg⁻¹). Por conseguinte, esses resultados sugerem que existe toxicidade sistêmica do extrato das folhas de *S. praealtum* sob as condições do ensaio do micronúcleo, independentemente das doses fitoterapêuticas e do tempo de tratamento (24 e 48 h), porém foi sexo-dependente (macho e fêmea) (Tabela 2).

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM), concentração microbicida mínima (CMM), média dos valores dos halos de inibição ($\varnothing$ mm) e índice de seletividade (IS) obtidos a partir dos ensaios de sensibilidade antimicrobiana e citotoxicidade *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos liofilizados de *S. praealtum* DC.

Micro-organismo	Extrato liofilizado de <i>S. praealtum</i> DC								Controles						
	Folha				Caule				Raiz				Clorexidina		Rifamicina
	CIM	CMM	M $\varnothing_h$	IS	CIM	CMM	M $\varnothing_h$	IS	CIM	CMM	M $\varnothing_h$	IS	M $\varnothing_h$	M $\varnothing_h$	
Bactérias Gram negativas															
<i>E. coli</i>	25	-	0 ^a	0.35	25	-	0 ^a	0.45	-	-	0 ^a	-	12.3 ^d		na
<i>E. aerogenes</i>	50	-	0 ^a	0.17	-	-	0 ^a	-	-	-	0 ^a	-	9.7 ^c		na
<i>S. marcescens</i>	25	50	0 ^a	0.35	-	-	0 ^a	-	-	-	0 ^a	-	11.3 ^d		na
<i>P. aeruginosa</i>	25	-	0 ^a	0.35	-	-	0 ^a	-	-	-	0 ^a	-	11.3 ^d		na
<i>P. mirabilis</i>	25	-	0 ^a	0.35	-	-	0 ^a	-	50	50	0 ^a	>1 [*]	9.3 ^c		na
<i>S. typhimurium</i>	25	-	0 ^a	0.35	-	-	0 ^a	-	-	-	0 ^a	-	10.3 ^c		na
Bactérias Gram positivas															
<i>B. subtilis</i>	50	-	0 ^a	0.17	50	-	0 ^a	0.22	25	25	7.7 ^c	>1 [*]	13.7 ^d		na
<i>B. cereus</i>	25	-	7 ^c	0.35	25	-	6.3 ^c	0.45	12.5	-	8.7 ^c	>1 [*]	13 ^d		na
<i>M. luteus</i>	12.5	50	7.3 ^c	0.69	25	50	4 ^b	0.45	12.5	50	10.3 ^c	>1 [*]	16 ^e		na
<i>E. faecalis</i>	25	-	0 ^a	0.35	25	-	0 ^a	0.45	12.5	-	0 ^a	>1 [*]	14.3 ^d		na
<i>S. aureus</i>	25	50	0 ^a	0.35	25	-	6.3 ^c	0.45	12.5	50	8.7 ^c	>1 [*]	13.3 ^d		na
Leveduras															
<i>C. albicans</i>	-	-	0 ^a	-	-	-	0 ^a	-	25	-	0 ^a	-	13.3 ^d		na
<i>S. cerevisiae</i>	6.25	50	0 ^a	1.4	12.5	50	6.7 ^c	0.9	6.25	50	8.7 ^c	>1 [*]	12.7 ^d		na
Micobactérias															
<i>M. tuberculosis</i>	na	na	0 ^a	na	na	Na	0 ^a	na	na	na	0 ^a	na	na		11 ^d
<i>M. bovis</i>	na	na	0 ^a	na	na	Na	0 ^a	na	na	na	0 ^a	na	na		11 ^d

CIM: Concentração Inibitória Mínima (mg/mL); CMM: Concentração Microbicida Mínima (mg/mL); M $\varnothing_h$: Média do $\varnothing$ dos halos de inibição (mm); IS: Índice de seletividade (IS = CC₉₀/MIC₁₀₀); na: Não aplicável. * Ausência de citotoxicidade *in vitro* (CI) nas condições testadas. Médias com as mesmas letras não são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 2. Incidência de EPCMNs e proporção de EPC / ENC na medula óssea de camundongos *Swiss albinus* macho e fêmea após os testes de 24h e 48h. Resultados obtidos a partir dos grupos controles (NaCl e NEU) e do extrato hidroalcoólico liofilizado da folha de *S. praealtum* DC.

Tratamento	No. de EPCs analisado		EPCMNs *				EPC / (EPC + ENC) **		ENC (n)	
	24h	48h	24h ^A (n)	48h ^A (n)	24h ^A (%)	48h ^A (%)	24h ^A	48h ^A	24h	48h
<i>150 mM NaCl</i>										
♀ ₁	2095	2097	7	10	0,33	0,48	1,00	1,00	5	3
♀ ₂	2094	2095	9	10	0,43	0,48	1,00	1,00	6	5
♀ ₃	2087	2089	11	8	0,53	0,38	0,99	0,99	13	11
♀ ₄	2025	2004	7	3	0,35	0,15	1,00	1,00	3	8
♀ ₅	2042	2133	6	4	0,29	0,19	1,00	1,00	5	4
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 10343	Σ 10418	Σ 40	Σ 35	0,39 ±0,09	0,33 ±0,16	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00	Σ 32	Σ 31
♂ ₁	2095	2088	9	13	0,43	0,62	1,00	1,00	5	9
♂ ₂	2055	2088	12	11	0,58	0,53	0,99	1,00	15	7
♂ ₃	2058	2084	7	11	0,34	0,53	0,99	0,99	14	12
♂ ₄	2092	2103	7	10	0,33	0,48	1,00	1,00	10	7
♂ ₅	2085	2029	3	10	0,14	0,49	1,00	1,00	7	7
Σ ♂ ^{B* B**}	Σ 10385	Σ 10392	Σ 38	Σ 55	0,37 ±0,16	0,53 ±0,06	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00	Σ 51	Σ 42
Σ ♂ e ♀	Σ 20728	Σ 20810	Σ 78 ^A	Σ 90 ^A	0,38 ±0,12 ^A	0,43 ±0,15 ^A	1,00 ±0,00 ^A	1,00 ±0,00 ^A	Σ 83	Σ 73
<i>N-Nitroso-N-ethylurea – NEU (50 mg.Kg⁻¹)</i>										
♀ ₁	2148	2075	38	36	1,77	1,73	0,49	0,65	2252	1125
♀ ₂	1884	2032	32	34	1,70	1,67	0,54	0,81	1616	468
♀ ₃	2002	1948	15	31	0,75	1,59	0,61	0,93	1298	152
♀ ₄	1915	1984	26	29	1,36	1,46	0,53	0,67	1712	984
♀ ₅	2147	2008	23	34	1,07	1,69	0,52	0,71	1989	823
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 6034	Σ 6055	Σ 85	Σ 101	1,33 ±0,43	1,63 ±0,11	0,54 ±0,04	0,75 ±0,12	Σ 5166	Σ 1745
♂ ₁	2025	1999	64	31	3,16	1,55	0,41	0,36	2875	3501
♂ ₂	2028	1916	105	40	5,18	2,09	0,51	0,55	1972	1584
♂ ₃	2004	2069	25	38	1,25	1,84	0,67	0,65	996	1131
♂ ₄	2012	1987	53	28	2,63	1,41	0,61	0,61	1306	1248
♂ ₅	2143	2036	95	37	4,43	1,82	0,53	0,52	1892	1846
Σ ♂ ^{B* B**}	Σ 6057	Σ 5984	Σ 194	Σ 109	3,33 ±1,54	1,74 ±0,27	0,55 ±0,10	0,54 ±0,11	Σ 5843	Σ 6216
Σ ♂ e ♀	Σ 12091	Σ 12039	Σ 279 ^B	Σ 210 ^B	2,33 ±1,50 ^B	1,69 ±0,20 ^B	0,54 ±0,07 ^C	0,65 ±0,16 ^C	Σ 11009	Σ 7961
<i>Extrato de Sedum praealtum (500 mg.Kg⁻¹)</i>										
♀ ₁	2132	2189	4	20	0,19	0,91	0,93	0,93	164	170
♀ ₂	2062	2068	16	5	0,78	0,24	0,92	0,91	184	207
♀ ₃	2084	2164	3	12	0,14	0,55	0,88	0,91	278	209
♀ ₄	2038	2044	17	21	0,83	1,03	0,85	0,93	373	145
♀ ₅	2073	2061	5	5	0,24	0,24	0,93	0,89	167	246
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 10389	Σ 10526	Σ 45	Σ 63	0,44 ±0,34	0,60 ±0,37	0,90 ±0,04	0,92 ±0,02	Σ 1166	Σ 977
♂ ₁	2082	2009	7	5	0,34	0,25	0,88	0,84	284	392
♂ ₂	2051	2027	5	5	0,24	0,25	0,92	0,88	169	268
♂ ₃	2058	2106	5	5	0,24	0,24	0,94	0,89	126	267
♂ ₄	2023	2086	1	6	0,05	0,29	0,88	0,84	263	409
♂ ₅	2018	2076	4	4	0,20	0,19	0,91	0,91	194	203
Σ ♂ ^{B* B**}	Σ 10232	Σ 10304	Σ 22	Σ 25	0,21 ±0,10	0,24 ±0,03	0,91 ±0,03	0,87 ±0,03	Σ 1036	Σ 1539
Σ ♂ e ♀	Σ 20621	Σ 20830	Σ 67 ^A	Σ 88 ^A	0,33 ±0,26 ^A	0,42 ±0,31 ^A	0,90 ±0,03 ^B	0,89 ±0,03 ^B	Σ 2202	Σ 2516
<i>Extrato de Sedum praealtum (1.000 mg.Kg⁻¹)</i>										
♀ ₁	2159	2069	5	14	0,23	0,68	0,90	0,91	243	215
♀ ₂	2056	2074	5	12	0,24	0,58	0,94	0,90	139	218
♀ ₃	2062	2026	7	16	0,34	0,79	0,90	0,89	231	256
♀ ₄	2067	2075	8	17	0,39	0,82	0,94	0,91	128	201
♀ ₅	2045	2007	7	31	0,34	1,54	0,89	0,93	251	162
Σ ♀ ^{A* A**}	Σ 10389	Σ 10251	Σ 32	Σ 90	0,31 ±0,07	0,88 ±0,38	0,91 ±0,02	0,91 ±0,01	Σ 992	Σ 1052
♂ ₁	2065	2032	7	13	0,34	0,64	0,90	0,89	226	255
♂ ₂	2030	2058	7	13	0,34	0,63	0,88	0,90	269	228
♂ ₃	2066	2004	7	13	0,34	0,65	0,91	0,91	197	198
♂ ₄	2052	2054	4	14	0,19	0,68	0,89	0,90	244	232
♂ ₅	2055	2035	5	11	0,24	0,54	0,94	0,93	140	154
Σ ♂ ^{B* B**}	Σ 10268	Σ 10183	Σ 30	Σ 64	0,29 ±0,07	0,63 ±0,05	0,91 ±0,02	0,91 ±0,02	Σ 1076	Σ 1067
Σ ♂ e ♀	Σ 20657	Σ 20434	Σ 62 ^A	Σ 154 ^A	0,30 ±0,07 ^A	0,76 ±0,29 ^A	0,91 ±0,02 ^B	0,91 ±0,01 ^B	Σ 2068	Σ 2119

Médias com as mesmas letras não são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Os dados são mostrados a partir dos controles (NaCl e NEU) e uma avaliação da genotoxicidade do *Sedum praealtum*.

Tabela 2. Continuação.

Tratamento	No. de EPCs analisado		EPCMN ^s *				EPC / (EPC + ENC) **		ENC (n)	
	24h	48h	24h ^Λ (n)	48h ^Λ (n)	24h ^{Λ'} (%)	48h ^{Λ'} (%)	24h ^{Λ''}	48h ^{B''}	24h	48h
<i>Extrato de Sedum praealtum</i> (2.000 mg.Kg ⁻¹)										
♀ ₁	2058	2064	3	7	0,15	0,34	0,94	0,89	137	254
♀ ₂	2000	2005	10	8	0,50	0,40	0,91	0,91	205	189
♀ ₃	2049	2014	10	9	0,49	0,45	0,92	0,92	180	171
♀ ₄	2072	2028	13	9	0,63	0,44	0,91	0,90	205	233
♀ ₅	2084	2019	11	12	0,53	0,59	0,91	0,94	202	129
Σ ♀ ^{Λ* Λ**}	Σ 10263	Σ 10130	Σ 47	Σ 45	0,46 ±0,18	0,44 ±0,09	0,92 ±0,01	0,91 ±0,02	Σ 929	Σ 976
♂ ₁	2085	2036	4	16	0,19	0,79	0,88	0,90	275	238
♂ ₂	2068	2018	11	13	0,53	0,64	0,94	0,91	131	190
♂ ₃	2057	2023	4	19	0,19	0,94	0,94	0,95	138	113
♂ ₄	2032	2077	3	46	0,15	2,21	0,88	0,92	265	178
♂ ₅	2015	2067	1	33	0,05	1,60	0,86	0,85	341	357
Σ ♂ ^{B* B**}	Σ 10257	Σ 10221	Σ 23	Σ 127	0,22 ±0,18	1,24 ±0,66	0,90 ±0,04	0,91 ±0,04	Σ 1150	Σ 1076
Σ ♂ e ♀	Σ 20520	Σ 20351	Σ 70 ^Λ	Σ 172 ^Λ	0,34 ±0,21 ^{Λ'}	0,84 ±0,61 ^{Λ'}	0,91 ±0,03 ^{B''}	0,91 ±0,03 ^{B''}	Σ 2079	Σ 2052

Médias com as mesmas letras não são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Os dados são mostrados a partir dos controles (NaCl e NEU) e uma avaliação da genotoxicidade do *Sedum praealtum*.

6 DISCUSSÃO

Produtos naturais e plantas medicinais constituem-se uma importante fonte de compostos químicos com aplicabilidade terapêutica potencial (ELISABETSKY et al., 1995; RZEDOWSKI & RZEDOWSKI, 1979) e, por consequência, estas plantas podem ser importantes alternativas terapêuticas. Estudos químicos das espécies de *Sedum* mostraram várias classes de substâncias biologicamente ativas, tais como alcaloides, taninos, flavonoides e compostos cianogênicos (NAHRSTEDT et al., 1982; MULINACCI et al., 1995; STEVENS et al., 1995; DE MELO et al., 2005). De modo especial, *Sedum praealtum* (Crassulaceae) tem sido usada por um longo período na medicina tradicional como um agente anti-inflamatório e analgésico, devido ao seu efeito benéfico sobre o tratamento da dor nos olhos (De la Cruz, 1964); inchaço nos olhos (MARTINEZ, 1967); tratamento de úlcera (CARLINI et al., 1970; DE MELO et al., 2009); problemas inflamatórios gerais (CAMARGO et al., 2002; DE MELO et al., 2009); contraceptivo (SILVA-TORRES et al., 2003); atividade anti-fertilização (GARCIA-PINEDA et al., 1986) e atividade antinociceptiva (DE MELO et al., 2009). Entretanto, estudos científicos sobre a espécie de *S. praealtum*, objetivando o entendimento dos seus efeitos antimicrobianos e genotóxicos, não têm sido observados até o presente momento. Portanto, essas observações também conduziram à avaliação do potencial antimicrobiano (bactérias gram-negativas e gram-positivas, leveduras e micobactérias) e genotóxico (efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos) do extrato hidroalcoólico de *S. praealtum* DC. usando os testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* e o ensaio do micronúcleo *in vivo*. Adicionalmente, uma rápida triagem de flavonoides e compostos fenólicos e um ensaio de citotoxicidade *in vitro* foram realizados.

No presente estudo, a triagem fitoquímica (flavonóides e compostos fenólicos) dos extratos hidroalcoólicos revelou apenas teores de compostos fenólicos nas condições testes desse ensaio (técnicas colorimétricas e de precipitação), os quais exibiram valores superiores à raiz ($690,56 \pm 29,5$ mg AG/g), seguido do caule ($354,42 \pm 32,3$ mg AG/g) e da folha ($200,43 \pm 11,6$ mg AG/g) de *S. praealtum*.

Evidências científicas mostraram que os extratos orgânicos (solventes de polaridade crescente, e.g., extrato etanoico e de acetato etílico) de plantas medicinais têm sido considerados como melhores solventes para a extração de substâncias antimicrobianas quando comparados com extratos aquosos (SILVA et al., 2014; MATTANA et al., 2010; ROJAS et al., 2006). Os resultados antimicrobianos da presente pesquisa, conforme determinado pelo método de difusão em agar, revelaram ausência de sensibilidade antimicrobiana (zona de

inibição de crescimento nula) das cepas bacterianas gram-negativas (*E. coli*; *E. aerogenes*; *S. marcescens*; *P. aeruginosa*; *P. mirabilis* e *S. typhimurium*) frente aos extratos hidroalcoólicos do caule, da folha e da raiz de *S. praealtum*. Entretanto cepas bacterianas gram-positivas demonstraram sensibilidade (presença de zona de inibição de crescimento) frente ao extrato hidroalcoólico da raiz (*B. subtilis*; *B. cereus*; *M. luteus* e *S. aureus*), seguido da folha (*B. cereus*; *M. luteus* e *S. aureus*) e do caule (*B. cereus* e *M. luteus*) de *S. praealtum*, com considerável abrangência de espécies bacterianas gram-positivas, empregando o extrato da raiz, seguido da folha e do caule. Em adição, uma única zona menor de inibição de crescimento ($p < 0.05$) foi observada na espécie de *M. luteus* frente ao extrato do caule. As cepas de *E. faecalis*, *C. albicans*, *M. tuberculosis* e *M. bovis* não apresentaram sensibilidades para quaisquer partes do extrato de *S. praealtum*.

Ao contrário do método de difusão em agar, o ensaio da concentração inibitória mínima (microdiluição em caldo) revelou ação antimicrobiana do extrato de *S. praealtum* e valores de CIM para todas as espécies bacterianas gram-negativas, dependendo da parte anatômica da planta (i.e., considerável abrangência de espécies bacterianas gram-negativas, empregando o extrato da folha). Esses resultados sugeriram que (i) o método de microdiluição em caldo apresenta maior sensibilidade aos testes antibacterianos gram-negativos frente aos extratos vegetais de *S. praealtum*, muito embora nem todas as partes da planta possam apresentar o mesmo perfil de sensibilidade antibacteriana gram-negativa: folha de *S. praealtum* (*E. coli*; *S. marcescens*; *P. aeruginosa*; *P. mirabilis* e *S. typhimurium*: CIM = 25 mg.mL⁻¹; *E. aerogenes*: 50 mg.mL⁻¹), caule de *S. praealtum* (*E. coli*: CIM = 25 mg.mL⁻¹) e raiz de *S. praealtum* (*P. mirabilis*: CIM = 50 mg.mL⁻¹), (ii) existem compostos fitoquímicos de ação antibacteriana gram-negativa no extrato de *S. praealtum*, potencialmente interativos e anulados (de natureza menos polar e/ou apolar) sob as condições do método de difusão em agar, e (iii) o extrato hidroalcoólico de *S. praealtum* apresenta ação antibacteriana gram-negativa dependente da parte anatômica da planta – sendo a folha responsável pelo maior espectro de espécies – cujos valores da CIM são dependentes das espécies bacterianas gram-negativas (i.e., *E. coli*; *S. marcescens*; *P. aeruginosa*; *P. mirabilis*; *S. typhimurium* e *E. aerogenes*).

Para todas as bactérias gram-positivas, o ensaio da microdiluição em caldo revelou ação antimicrobiana de todos os extratos *S. praealtum*, cujos valores da CIM foram dependentes ou independentes da parte anatômica da planta, dependendo da espécie bacteriana gram-positiva: folha de *S. praealtum* (*M. luteus*: 12,5 mg.mL⁻¹; *B. cereus*, *E. faecalis* e *S. aureus*: 25 mg.mL⁻¹; *B. subtilis*: 50 mg.mL⁻¹); caule de *S. praealtum* (*B. cereus*,

M. luteus, *E. faecalis* e *S. aureus*: 25 mg.mL⁻¹; *B. subtilis*: 50 mg.mL⁻¹) e raiz de *S. praealtum* (*B. cereus*, *M. luteus*, *E. faecalis* e *S. aureus*: 12,5 mg.mL⁻¹; *B. subtilis*: 25 mg.mL⁻¹). Esses resultados também sugeriram que (i) o método de microdiluição em caldo apresenta maior sensibilidade aos testes antibacterianos gram-positivos frente aos extratos vegetais de *S. praealtum*, independentemente das partes da planta: folha, caule e raiz de *S. praealtum* (*B. cereus*; *B. subtilis*; *E. faecalis*; *M. luteus* e *S. aureus*), (ii) existem compostos fitoquímicos de ação antibacteriana gram-positiva, principalmente no extrato de caule, seguido de folha e de raiz de *S. praealtum*, potencialmente interativos e anulados (de natureza menos polar e/ou apolar) sob as condições do método de difusão em agar, particularmente, para algumas espécies bacterianas gram-positivas (e.g., *E. faecalis*), e (iii) o extrato hidroalcoólico de *S. praealtum* apresenta ação antibacteriana gram-positiva independente da parte anatômica da planta cujos valores da CIM podem ser dependentes tanto da parte anatômica de *S. praealtum* quanto das espécies bacterianas gram-positivas (*B. cereus*; *B. subtilis*; *E. faecalis*; *M. luteus* e *S. aureus*).

Empregando as cepas de leveduras, os extratos hidroalcoólicos da folha, do caule e da raiz de *S. praealtum* não mostraram ação antifúngica e CIM para *C. albicans*, confirmando os resultados do teste de diluição em agar. Contudo, todos esses extratos mostram ação antifúngica para *S. cerevisiae* e os melhores resultados para CIM (i.e., 6,25 mg.mL⁻¹ para a folha e a raiz e 12,5 mg.mL⁻¹ para o caule). Esses resultados sugeriram que (i) o método de microdiluição em caldo pode apresentar maior sensibilidade aos testes antifúngicos, de modo especial para *S. cerevisiae*, frente aos extratos vegetais de *S. praealtum*. Independentemente das partes da planta, (ii) existem compostos fitoquímicos de ação antifúngica no extrato de folha de *S. praealtum*, potencialmente interativos e anulados (de natureza menos polar e/ou apolar); sob as condições do método de difusão em agar, (iii) o extrato hidroalcoólico de *S. praealtum* apresenta ação antifúngica para *S. cerevisiae*. Independentemente da parte anatômica da planta cujos valores da CIM podem ser dependentes da parte anatômica de *S. praealtum*, e (iv) os extratos hidroalcoólicos de folha, de caule e de raiz de *S. praealtum* não apresentam ação antifúngica contra *C. albicans*.

Embora não tenha sido realizado o ensaio de microdiluição em caldo dos extratos de *S. praealtum* frente ao comportamento *in vitro* das cepas de *M. tuberculosis* e *M. bovis*, os resultados preliminares do método de difusão em agar sugeriram ausência de ação antimicobacteriana dos extratos da folha, do caule e da raiz de *S. praealtum*.

Quanto à atividade antimicrobiana microbicida dos extratos de *S. praealtum*, os resultados revelaram esta ação para algumas espécies microbianas, como *S. marcescens*

(folha); *P. mirabilis* (raiz); *B. subtilis* (raiz); *M. luteus* (folha, caule e raiz); *S. aureus* (folha e raiz) e *S. cerevisiae* (folha, caule e raiz). Esses resultados sugeriram que o extrato hidroalcoólico de *S. praealtum* apresenta ação estática e/ou microbida espécie bacteriana-dependente (gram-negativa ou gram-positiva), bem como ação fungicida (*S. cerevisiae*), dependente ou não da parte anatômica da planta (folha, caule ou raiz), dependendo da espécie microbiana.

A falta de correlação (ou reprodutibilidade entre resultados) entre os métodos de difusão em agar e em microdiluição em caldo tem sido observado em estudos dessa natureza (SILVA et al., 2014, 2015 *in press*; CHAVASCO et al., 2014). O método de diluição em agar foi visto para ser mais utilizado em estudos dessa natureza, devido à simplicidade de execução e ao baixo custo. Entretanto, a determinação da CIM pelo método da microdiluição, desenvolvido previamente (ELOFF, 1998), vem sendo bastante utilizado, principalmente devido à sua sensibilidade e quantidade mínima de reagentes, o que possibilita um maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados. Aliada às características desses métodos, ressalta-se a importância de avaliar os fatores interferentes, estabelecendo parâmetros de acordo com a necessidade do método empregado para determinada finalidade (OSTROSKY et al., 2008). Embora seja reconhecida a reprodutibilidade dos métodos de análises padrão de sensibilidade antimicrobiana (CLSI M02-A11, 2012; CLSI M100S22, 2012; CLSI M44-A2, 2009; CLSI M07-A9, 2012; CLSI M27-A3, 2008; CLSI M27-S4, 2012; CLSI M24-A2, 2011), a avaliação da sensibilidade antimicrobiana de extratos de vegetais, os quais contêm compostos químicos complexos, por diferentes métodos, pode ser influenciada por diversos fatores (e.g., meios de cultura; pH; disponibilidade de oxigênio; inóculo e condições de incubação) (OSTROSKY et al., 2008) e, consequentemente, gerar resultados irreproduzíveis entre métodos (e.g., zona de inibição de crescimento microbiano *versus* CIM). Ainda, os métodos de extração de compostos fitoquímicos (e.g., baseados no uso de solventes orgânicos os quais extraem compostos com polaridade crescente e de melhor difusão em agar) e a interação, alteração, depleção ou destruição dos compostos fitoquímicos, sob as condições do ensaio, podem refletir no resultado da ação antimicrobiana dos extratos vegetais sobre os micro-organismos (SILVA et al., 2014; MATTANA et al., 2010; ROJAS et al., 2006). É importante ressaltar também que condições do cultivo da planta também são preponderantes com a influência dos fatores bióticos e abióticos, gerando efeitos limitantes na produção dos metabólitos bioativos e influenciando a ação antimicrobiana (zona de inibição, CIM e CMM) (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

A presente pesquisa mostra pela primeira vez na literatura dados sobre a ação antimicrobiana de *S. praealtum* DC. para algumas cepas de bactérias, de leveduras e de micobactérias. Um único estudo comparativo da quantia de alguns ingredientes ativos de *Sedum aizoon* e *Sedum tatarinowii* foi realizado, objetivando desenvolver e utilizar novas fontes de plantas de Shanxi Huoshan na China (HU & XU, 2012). Neste estudo, o ensaio antibacteriano, usando o método de difusão em ágar, revelou que os extratos de polissacarídeos (*polysaccharide*) de ambas as espécies de *Sedum* não mostraram efeitos inibitórios contra as cepas de *E. coli*; *S. aureus*; *S. typhimurium* e *L. monocytogenes*. Entretanto, os extratos de fenol livre (*free phenol*) tiveram consideráveis efeitos inibitórios sobre algumas bactérias: *S. aizoon* (*S. aureus*, *S. typhimurium* e *L. monocytogenes*) e *S. tatarinowii* (*E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*). Extratos de fenol de ligação (*bound phenol*) ou de falconoide total (*total falconoid*) de *S. tatarinowii* mostraram as mais fortes atividades contra *L. monocytogenes* (i.e., Ø da zona de inibição de crescimento). Esses resultados forneceram uma base teórica para o desenvolvimento compreensivo e para utilização de recursos vegetais de Huoshan na China (HU & XU, 2012).

Os extratos hidroalcoólicos da folha, do caule e da raiz de *S. praealtum*, exibindo CIMs (6,25-50 mg.mL⁻¹) frente as cepas microbianas, foram testados sobre células de *Aedes albopictus*, a fim de determinar o percentual de citotoxicidade *in vitro* (CI₅₀ e CI₉₀) e estabelecer um índice de seletividade (IS = CI₅₀/MIC). Na presente pesquisa, o IS > 1 foi encontrado no extrato hidroalcoólico da folha de *S. praealtum* diante da CIM de *S. cerevisiae*, e foi considerado > 1 no extrato hidroalcoólico da raiz de *S. praealtum* (ausência de citotoxicidade *in vitro* – CI) diante das CIMs de *P. mirabilis*; *B. subtilis*; *B. cereus*; *M. luteus*; *E. faecalis*; *S. aureus* e *S. cerevisiae*. Esses resultados sugerem (i) a existência de um conjunto maior de compostos fitoquímicos citotóxicos nas folhas e nos caules de *S. praealtum* que potencializam os valores < 1 do IS desses extratos hidroalcoólicos, ou então, (ii) a inexistência de certos compostos fitoquímicos citotóxicos na raiz de *S. praealtum* que contribuem para os valores ≥ 1 do IS desses extratos hidroalcoólicos. Os dados de IC₅₀ e CIM têm sido utilizados para calcular o índice de seletividade (IS) de compostos (fito)químicos como uma estimativa de uma janela terapêutica e um mecanismo para identificar candidatos para os estudos de eficácia em camundongos (PROTOPOVA et al., 2005). Um IS equivalente a ≥ 1% pode ser considerado aceitável (SILVA et al., 2014, 2015 *in press*; PROTOPOVA et al., 2005).

Estudos sobre genotoxicidade de produtos naturais e fitoterápicos também têm sido o anseio de nosso grupo de pesquisa (BORIOLLO et al., 2014ab). No ensaio do micronúcleo, sendo o primeiro estudo científico sobre os aspectos genotóxicos de *S. praealtum* realizado, apenas o extrato hidroalcoólico das folhas foi analisado, sob a justificativa do seu amplo espectro de ação antimicrobiana (bactérias gram-negativas e positivas e levedura). Esses resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre todos os tratamentos experimentais e o controle negativo do ensaio, sugerindo ausência de genotoxicidade (mecanismos clastogênicos e/ou aneugênicos) do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. praealtum*, independentemente das doses de administração fitoterapêutica (0,5-2 g.Kg⁻¹) e dos tempos de tratamento (24h: efeito agudo; 48h: efeito crônico), porém dependentemente do sexo do camundongo (macho e fêmea). Objetivando avaliar a toxicidade da medula óssea, a proporção de EPC para ENC também foi observada. Essa proporção de EPC/ENC é considerada um indicador da aceleração ou de inibição da eritropoiese e tem sido reportada para variar com o tempo de pontuação. Um declínio contínuo na proporção de EPC/ENC pode ser devido à inibição da divisão celular, à morte de eritroblastos, à remoção de células danificadas, ou à diluição do total de células existentes com as células recém-formadas (BORIOLLO et al., 2014ab; KRISHNA & HAYASHI, 2000; OECD, 1997). A presente análise revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controles experimentais (indutor e não indutor de genotoxicidade) e todos os tratamentos experimentais, cujas proporções de EPC/ENC foram intermediárias àquelas dos controles negativos e positivos do ensaio. Sob as condições do ensaio do micronúcleo, tais dados sugeriram toxicidade na medula óssea (i.e., toxicidade sistêmica) promovida pelo extrato hidroalcoólico das folhas de *S. praealtum*, independentemente das doses de administração fitoterapêutica (0,5-2 g.Kg⁻¹) e dos tempos de tratamento (24 e 48h), porém sexo-dependente (camundongo macho e fêmea). Esses resultados de toxicidade *in vivo* colaboram com as observações descritas nesta pesquisa sobre a citotoxicidade *in vitro* de células de *Aedes albopictus*, bem como agregam valores sobre modulações fisiológicas [ação contraceptiva (GARCIA-PINEDA et al, 1986; SILVA-TORRES et al., 2003)] e celulares [inibição da motilidade de espermatozoides (GARCIA-PINEDA et al, 1986)] nocivas, previamente reportadas para a espécie de *S. praealtum*. Entretanto, a toxicidade aguda do extrato aquoso liofilizado das partes aéreas de *S. praealtum* foi avaliada em experimentos conduzidos com ratos adultos Wistar fêmeas. Empregando cinco grupos de quatro ratos, o índice de toxicidade foi avaliado a partir de observações da letalidade (i.e., morte dentro de 7 dias) após a administração per os (do latim “via oral”) do extrato liofilizado (de 500 a 3000 mg/kg de peso corporal), sendo este

índice considerado nulo nas condições do ensaio (Camargo et al., 2002). Esse resultado toxicológico de *S. praealtum* não mostrou efeitos tóxicos nas doses avaliadas em comparação com o ensaio de micronúcleo (i.e., toxicidade aguda e crônica sistêmica), o que poderia ser explicado, pelo menos em parte, pelas diferenças entre os métodos de extração de compostos fitoquímicos (i.e., de extração hidroalcoólica *versus* aquosa).

7 CONCLUSÃO

Os dados obtidos na presente pesquisa científica permitiram inferir as seguintes conclusões:

- Esta pesquisa vem contribuir com as informações sobre o potencial antimicrobiano e genotóxico de fitoterápicos, de modo especial do extrato hidroetanólico do caule, da folha e da raiz de *S. praealtum* DC. (Bálsamo). Este foi o primeiro estudo científico sobre a composição fitoquímica, sobre a atividade citotóxica *in vitro*, sobre a ação antimicrobiana e sobre o potencial genotóxico *in vivo* de *S. praealtum* DC. (Bálsamo).
- Elevada quantia de compostos fenólicos está presente no extrato hidroetanólico da raiz de *S. praealtum* DC. (Bálsamo).
- O extrato hidroalcoólico das folhas de *S. praealtum* mostrou atividade antimicrobiana de amplo espectro e valores variáveis de CIM, abrangendo bactérias gram-negativas (*E. aerogenes*; *E. coli*; *P. aeruginosa*; *P. mirabilis*; *S. marcescens* e *S. typhimurium*), gram-positivas (*B. cereus*; *B. subtilis*; *E. faecalis*; *M. luteus* e *S. aureus*) e levedura (*S. cerevisiae*), enquanto que a ação antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos do caule e da raiz foi restrita ao grupo de bactérias gram-positivas e a levedura *S. cerevisiae* analisadas, exceto para *E. coli* (caule) e *P. mirabilis* (raiz).
- Ao contrário do método de difusão em agar, o ensaio da concentração inibitória mínima (microdiluição em caldo) revelou ação antimicrobiana do extrato de *S. praealtum* e valores de CIM para todas as espécies bacterianas gram-negativas, dependendo da parte anatômica da planta.
- O índice de seletividade estabelecido para *S. praealtum* foi considerado aceitável ($IS > 1$) para o extrato hidroalcoólico da raiz diante das CIMs de *P. mirabilis*; *B. subtilis*; *B. cereus*; *M. luteus*; *E. faecalis*; *S. aureus* e *S. cerevisiae* e os dados de citotoxicidade *in vitro* (CI) de células de *Aedes albopictus*, e aceitável para o extrato hidroalcoólico da folha diante da CIM de *S. cerevisiae* e a CI de *A. albopictus*.

- No ensaio do micronúcleo, com os grupos de animais tratados com o extrato das folhas de *S. praealtum*, os resultados sugerem ausência de genotoxicidade (clastogenia e/ou aneugenia) do extrato hidroetanólicos das folhas de *S. praealtum*, independentemente da dose de administração fitoterapêutica (500–2.000 mg.Kg⁻¹) e do tempo de tratamento (24 e 48 h), porém foi sexo-dependente (macho e fêmea) e, a partir da proporção EPC/ENC, os dados também sugerem que existe toxicidade sistêmica desse extrato sob as condições do ensaio do micronúcleo, independentemente das doses fitoterapêuticas e do tempo de tratamento (24 e 48 h), porém foi sexo-dependente (macho e fêmea).

8 REFERÊNCIAS

ALBERTINI, R. J. et al. IPCS Guidelines for the Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 463, n. 2, p. 111–172, aug. 2000.

ALVES, J. M. et al. In Vivo Protective Effect of *Copaifera langsdorffii* Hydroalcoholic Extract on Micronuclei Induction by Doxorubicin. **Journal of Applied Toxicology: JAT.**, Philadelphia, v. 33, n. 8, p. 854–860, aug. 2013.

AMES, B. N. Dietary Carcinogens and Anticarcinogens: Oxygen Radicals and Degenerative Diseases. **Science**, New York, v. 221, n. 4617, p. 1256–64, sept. 1983.

ARAÚJO, S. A. C. de. et al. Avaliação in vitro da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, Ceará, v. 18, n. 1, p. 25-31, jun. 2008.

BORIOLLO, M. F. G. et al. Evaluation of the Mutagenicity and Antimutagenicity of *Ziziphus joazeiro* Mart. Bark in the Micronucleus Assay. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 2, p. 428-438, apr./jun. 2014a.

BORIOLLO, M. F. G. et al. Nongenotoxic Effects and a Reduction of the DXR-induced Genotoxic Effects of *Helianthus annuus* Linné (sunflower) Seeds Revealed by Micronucleus Assays in Mouse Bone Marrow. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 14, n. 121, p. 1-15, apr. 2014b.

CALIXTO, JOÃO B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura** [online], São Paulo, v.55, n.3, p. 37-39, jul./set. 2003. Disponível em: <<http://cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v55n3/a22v55n3.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

CAMARGO, M. E. M. et al. Study of the Anti-Inflammatory Effect of *Sedum praealtum* (Siempreviva) in the Rat: Dose-Dependent Response. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, Seattle, v. 45, p. 129-130, 2002.

CANTÓN, E. et al. Minimum Fungicidal Concentrations of Amphotericin B for Bloodstream Candida Species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 45, n. 3, p. 203-206, mar. 2003.

CARLINI, E.A. et al. Úlcera por contenção em ratos: ação protetora de extrato aquoso de "bálsamo". Estudo Preliminar. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.42, p. 267-270, 1970. Suplemento.

CHANDRASEKARAN, C. V. et al. Evaluation of the Genotoxic Potential of Standardized Extract of *Glycyrrhiza glabra* (GutGard™). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 61, n. 3, p. 373–380, dec. 2011.

CHAVASCO, J.M., et al. Evaluation of Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Plant Extracts from Southern Minas Gerais Cerrado. **Revista Instituto Medecina Tropical**, São Paulo, v. 56, n. 1, p. 13-20, jan./fev. 2014.

CLAUSEN, R. T. **Sedum of the Trans-Mexican Volcanic Belt**: an Exposition of Taxonomic Methods. Ithaca: Cornell University Press, 1959.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testings**; approved Guideline . 2.ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2009

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically** : approved 9.ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**: approved Standard.11.ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testings**. 22.ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts** : approved Standard . 3.ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Informational Supplement. 4.ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes** : approved Standard . e.ed. Wayne, PA, USA: CLSI, 2011.

COLLABORATIVE STUDY GROUP FOR THE MICRONUCLEUS TEST–CSGMT. Sex Differences in the Micronucleus Test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 172, n. 2, p. 151–163, nov. 1986.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.1031 p.

DE MELO, G. O. et al. Antinociceptive and Anti-inflammatory kaempferol Glycosides from *Sedum dendroideum*. **Journal Of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 124, n. 2, p. 228–232, jul. 2009.

DE LA CRUZ, M. **Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis, Aztec Manuscript (1552)**. Editorial del Instituto Mexicano del Seguro Social, Translated by Juan Badiano. México : [s.n.], 1964. p.58.

DE MELO, G. O. et al. Phytochemical and Pharmacological Study of *Sedum dendroideum* Leaf Juice. **Journal of Ethopharmacology**, Lausanne, v. 102, n. 2, p. 217-220, 14 nov. 2005.

DECORDIER, I. et al. Elimination of Micronucleated Cells by Apoptosis after Treatment with Inhibitors of Microtubules. **Mutagenesis**, Swansea, v. 17, n. 4, p. 337–344, jul. 2002.

DUARTE M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência:** revista interdisciplinar dos Centros e Núcleo da Unicamp, Campinas v. 7, n. 1, p. 1–16, out. 2006.

ELISABETSKY, E. et al. Analgesic Activity of *Psychotria colorata* (Willd. Ex R. & S.) Muell.Arg. Alkaloids. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.48, n. 2, p.77-83, oct. 1995.

ELOFF, J. M. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. **Planta Medica**, New York, v. 64, n. 8, p. 711-713, out/dez.1998.

FARMACOPEIA Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA / Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Brasília, 2010.

FENECH, M. et al. Low Intake of Calcium, Folate, Nicotinic Acid, Vitamin E, Retinol, Beta-Carotene and High Intake of Pantothenic Acid, Biotin and Riboflavin are Significantly Associated with Increased Genome Instability—results from a Dietary Intake and Micronucleus Index Survey in South Australia. **Carcinogenesis: integrative Cancer Research**, New York, v. 26, n. 5, p. 991–999, may 2005.

FENECH, M; CROTT, J. W. Micronuclei, Nucleopasmic Bridges and Nuclear Buds Induced in Folic Acid Deficient Human Lymphocytes – evidence for Breakage-fusion-bridge Cycles in the Cytokinesis–block Micronucleus Assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 504, n. 1–2, p. 131–136, jul. 2002.

FENECH, M; MORLEY, A. A. Measurement of Micronuclei in Lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 147, n. 1–2, p. 29–36, feb. 1985.

GARCÍA-PINEDA, J. et al. Acción de *Sedum dendroideum* sobre la actividad funcional de los espermatozoides. **Archivos de Investigación Médica**, Mexico, v. 17, n. 4, p. 391–397, out/dez. 2003.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, jan/mar. 2007.

HU, Q. P. & XU, J. G. Active Components and Antimicrobial Activity in two *Sedum* Species Grown in Shanxi Huoshan, China. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 10, n. 2, p. 172-174, 9 may 2012.

INDART, A. et al. Clastogenic and Cytotoxic Effects of Lipid Peroxidation Products Generated in Culinary Oils Submitted to Thermal Stress. **Food and Chemical Toxicology**, New York, v. 45, n. 10, p. 1963–1967, oct. 2007.

KERGUÉLEN, M. Index Synonymique de la Flore de France. **Institut National de la Recherche Agronomique**, Paris, jun. 1999. Disponível em: <<http://www2.dijon.inra.fr/flore-france/index.htm>>. Acessado em: 15 dez 2014.

KIRSCH-VOLDERS, M. et al. Indirect Mechanisms of Genotoxicity. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 140–141, n. 141, p. 63–74, apr. 2003.

KONSTANTOUPOULOU, I. et al. Insecticidal Effects of Essential Oils. A Study of the Effects of Essential Oils Extracted from Eleven Greek Aromatic Plants on *Drosophila auraria*. **Experientia**, Basel, v. 48, n. 6, p. 616–619, jun. 1992.

KRISHNA, G. ; HAYASHI, M. In Vivo Rodent Micronucleus Assay: Protocol, Conduct and Data Interpretation. **Mutation Research**, Amsterdam v. 455, n. 1-2, p.155-166, nov. 2000.

LEACH, N. T; JACHSON-COOK, C. Micronuclei with Multiple Copies of the X Chromosome: do Chromosomes Replicate in Micronuclei. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 554, n. 1-2, p. 89–94, oct. 2004.

LINO, PL et al. Produção de mudas de bálsamo (*Sedum dendroideum* subsp. *praealtum* (DC.) R.T. Clausen). **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. S4514-S4517, jul/ago. 2008.

LORENZI, H. ; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3. ed. São Paulo: Nova Odessa: Plantarum, 2001. 476 p.

MARCOS-ARIAS, C. et al. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 127-131, feb. 2009.

MARTIN, A., et al. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple and Inexpensive Method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 47, n. 11, p. 3616-3819, nov. 2003.

MARTÍNEZ, M. **Las Plantas Medicinales de México**. México: Ediciones Botas, 1967. 493p.

MATEUCA, R. et al. Chromosomal Changes: Induction, Detection Methods and Applicability in Human Biomonitoring. **Biochimie**, Paris, v. 88, n. 11, p. 1515-1531, nov. 2006.

MATTANA, C. M., et al. Antibacterial activity of extracts of *Acacia aroma* against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus*. **Braz J Microbiol**, São Paulo, v. 41, n. 3, Oct. 2010.

MOORE, C. B. et al. In Vitro Activities of Terbinafine Against *Aspergillus* Species in Comparison with those of Itraconazole and Amphotericin B. **Antimicrob. Agents Chemother.** Washington, v. 45, n. 6, p. 1882-1885, jun. 2001.

MULINACCI, N. et al. . Flavonol Glycosides from *Sedum telephium* Subspecies Maximum Leaves. **Phytochemistry**, Oxford-Inglaterra, v. 38, n. 2, p. 531-533, jan. 1995.

NAHRSTEDT, A. et al. Sarmentosin Epoxide, a new Cyanogenic Compound from *Sedum cepae*. **Phytochemistry**, Oxford-Inglaterra, v. 21, n. 1, p. 107-110, fev. 1982.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **Bacterial reverse mutation test**. 1997a.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **In vitro mammalian chromosome aberration test**. 1997b.

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**. 1997c.

OSTROSKY, E. A. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 301-307, abr/jun. 2008.

PROTOPOPOVA, M., et al. Identification of a New Antitubercular Drug Candidate, SQ 109, from a Combinatorial Library of 1, 2-ethylenediamines. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 56, n. 5, p. 968-974, sept. 2005.

PURVES, D. et al. Genotoxicity Testing: Current Practices and Strategies Used by the Pharmaceutical Industry. **Mutagenesis**, Swansea, v. 10, n. 4, p. 297–312, jul. 1995.

RIBEIRO, L. R; MARQUES, E. K; SALVADORI, D. M. F. **Teste de micronúcleo em medula óssea de roedor *in vivo***. : mutagênese Ambiental. Canoas: Ed. da ULBRA, 2003. p. 173-198.

ROJJAS, J. J. et al. Screening for Antimicrobial Activity of Ten Medicinal Plants Used in Colombian Folkloric Medicine: a Possible Alternative in the Treatment of Non-nosocomial Infections. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 6, n. 2, p 1-6, feb. 2006.

RZEDOWSKI, J.; RZEDOWSKI, G. **Flora Fanerogámica del Valle de México**. México: Continental, 1979.

RZEDOWSKI, J.; CALDERÓN DE RZEDOWSKI, G. **Flora Fanerogámica del Valle de México**. México: Compañía Editorial Continental, 1979. 249 p.

SCOTT, A. J. , KNOTT, M. Cluster Analysis Method for Grouping Means in the Analysis of Variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-12, sept. 1974.

SHALE T.L. et al. Screening of Medicinal Plants Used in Lesotho for Anti-bacterial and Anti-Inflammatory Activity. **Journal of Ethopharmacology**, Lausanne, v. 67, n. 3, p. 347-354, nov. 1999.

SHEPHERD, G. Conhecimento de diversidade de plantas terrestres do Brasil. *In*: LEWINSOHN, T.M. & P.I. Prado. **Biodiversidade brasileira** : síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo: Contexto, 2002.

SIKKEMA J.; DE BONT J.A.M. ; POOLMAN B.. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. **Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 59, n. 2, p. 201-222, jun. 1995.

SILVA, C. R. et al. Assessment of *Duguetia furfuracea* Genotoxic and Cytotoxic Activity in Bacteria and Mice. **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 1, p. 149-156, feb. 2012.

SILVA, J. J. et al. Bioactivity of *Eugenia pyriformis* Cambess, *Plinia cauliflora* Berg. and *Heliconia rostrata* against oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Revista Instituto Medicina Tropical**, São Paulo, *in press*, 2015.

SILVA, J. J. et al. In Vitro Screening Antibacterial Activity of *Bidens pilosa* Linné and *Annona crassiflora* Mart. Against Oxacillin Resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the Aerial Environment at the Dental Clinic. **Revista Instituto Medicina Tropical**, São Paulo, v. 56, n. 4, p. 333-340, jul./aug. 2014.

SILVA-TORRES, R. et al. Spermicidal Activity of the Crude Ethanol Extract of *Sedum praealtum* in Mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 85, n. 1, p. 15-17, mar. 2003

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M.. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152–178, jan/mar 1999.

STEVENS, J. F. et al. Distribution of Alkaloids and Tannins in the Crassulaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 157-165, mar. 1995.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos** : introdução ao estudo dos antimicrobianos. Rio de Janeiro: Atheneu, 1996.

THOMAS, P; UMEGAKI, K; FENECH, M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutagenesis**, Swansea, v. 18, n. 2, p. 187–194, mar. 2003.

TUROLLA, M. S. REIS.; NASCIMENTO, E. S.; Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, abr./jun. 2006.

VALDÉS, H. L. et al. Método analítico para La cuantificación de taninos en El extracto acuoso de *Romerillo*. **Revista Cubana Plantas Medicinalis**, La Habana - Cuba, v. 5, n. 1, p. 17-22, jan./abr. 2000.

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

VENKATESH, P. et al. Modulation of Doxorubicin-Induced Genotoxicity by Aegle marmelos in Mouse Bone Marrow: A Micronucleus Study. **Integrative Cancer Therapies**, Thousand Oaks, v. 6, n. 1, p. 42–53, mar. 2007.

ZAMBRANO, M. A; TARGA, H. J; RABELLO-GAY, M. N. Physiological Saline Solutions as a Useful Tool in Micronucleus and Metaphase Slide Preparations. **Stain Technology**, Baltimore, v. 57, n. 1, p. 48–49, jan. 1982.

9. ANEXO



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

PARECER N.º 08A/2014

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA –, da UNIFENAS, tendo analisado, nesta data, o protocolo do projeto de pesquisa intitulado **ENSAIO DE MUTAGENICIDADE E ANTIMUTAGENICIDADE DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *SEDUM PRAEALTUM* A.AD. (BÁLSAMO)**, de autoria do Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, resolveu enquadrá-lo na categoria de aprovado.

Alfenas, 17 de março de 2014.

Profª. Dra. Maria Cristina da Costa Resck
Coordenadora do CEUA

Data para apresentação do Relatório Final: 01/03/2015

Modelo, do Relatório Final e Parcial: <http://www.unifenas.br/pesquisa/>

CEUA – UNIFENAS – (35) 3299-3137 ceua@unifenas.br