

## Avaliação toxicológica de extratos de *Helianthemum glomeratum* utilizando Teste de Ames

Souza, R.A.<sup>1</sup>; Meckes, M.<sup>2</sup>; Felzenszwalb, I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Av. 28 de setembro, 87 fundos 4º andar, Vila Isabel, 20551030, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>2</sup> Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales, Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS). Av. Cuauhtemoc, 330, Col. Doctores, cep 06720, México, D.F.

**RESUMO:** Cinco diferentes extratos de *Helianthemum glomeratum*, (*Halimum 1*, *Halimum 2*, *Halimum 3*, *Halimum 4* e *Halimum 5*) uma planta medicinal comumente utilizada pela população Maia do sul do México para tratar de desordens gastrointestinais, foram avaliados toxicologicamente pelo Teste de Ames ("Salmonella/microsome assay") na presença e na ausência de ativação metabólica. Os resultados indicaram ausência de atividade mutagênica para todos os extratos testados. Observou-se atividade antimutagênica para os extratos *Halimum 2*, *Halimum 4* e *Halimum 5* em todas as linhagens testadas, para o extrato *Halimum 3* nas linhagens TA97 e TA102 e para o extrato *Halimum 1* nas linhagens TA98, TA97 e TA102. Na atividade antimutagênica, os extratos vegetais testados ou bloquearam a ação dos respectivos controles mutagênicos (TA98 e TA100, 2-aminoantraceno; TA97, 2-aminofluoreno e TA102, benzo-(a)-pireno), ou formaram com estes um composto quimicamente menos tóxico às células. Para as linhagens TA98 e TA100 o extrato *Halimum 3* apresentou um efeito sinérgico, onde o extrato juntamente com o mutagênico positivo (2-aminoantraceno) intensificou a mutagênese. Na avaliação da antimutagênese para o extrato *Halimum 1* com a linhagem TA100, detectou-se efeito sinérgico tóxico, indicando que este extrato, juntamente com o mutagênico 2-aminoantraceno, provocaram morte celular, efeito não detectado no tratamento dos dois separadamente.

**Palavras chave:** *Helianthemum glomeratum*, mutagênese, antimutagênese, Teste de Ames

**ABSTRACT:** Toxicological evaluation of *Helianthemum glomeratum* extracts using Ames Test. The Ames Test ("Salmonella/microsome assay") was used to evaluate five different extracts of *Helianthemum glomeratum*, (*Halimum 1*, *Halimum 2*, *Halimum 3*, *Halimum 4* e *Halimum 5*), a plant widely used by the Maya communities in Southern Mexico to treat gastrointestinal disorders, with or without addition of metabolic activation system. It was observed the absence of mutagenic potential in all tested extracts and it was detected an antimutagenic activity for *Halimum 2*, *Halimum 4* and *Halimum 5* extracts in all strains, for *Halimum 3* in the TA97 strain and for *Halimum 1* in TA97, TA98 and TA102 strains. In the antimutagenic action the extracts either blocked the positive mutagenic action (TA98 and TA100, 2-aminoanthracene; TA97, 2-aminofluorene and TA102, benzo-(a)-pyrene) or got together to form a compound less chemically toxic for the cells. It was detected in TA98 and TA100 strains, for *Halimum 3* extract a synergistic effect, in which the extract along with the positive mutagenic, 2-aminoanthracene, increased the mutagenesis. In the analysis for antimutagenic effect for *Halimum 1* in the TA100 strain, it was detected a toxic synergistic effect, indicating that the extract, along with the mutagenic 2-aminoanthracene caused cellular death, which was not observed in the treatment of both separately.

**Key words:** *Helianthemum glomeratum*, mutagenesis, antimutagenesis, Ames test

### INTRODUÇÃO

Plantas com valor terapêutico têm sido utilizadas no tratamento de determinadas moléstias. A presença de antioxidantes em plantas tem também

sido verificada e utilizada para evitar a degradação oxidativa de lipídeos presentes em alimentos, aumentando a vida útil destes (Aruoma *et al.*, 1996).

As doenças do trato gastrointestinal são um grande problema para a comunidade Maia do sul do México. Numerosas plantas têm sido utilizadas com a finalidade de melhorar os sintomas associados a estas desordens digestivas. Estudos etnobotânicos

Recebido para publicação em 22/05/01  
Aceito para publicação em 10/07/02.

da flora desta região (Berlin & Berlin, 1995; Berlin *et al.*, 1996) e análises farmacológicas já selecionaram um grupo de espécies como sendo o mais importante no tratamento de doenças gastrointestinais (Meckes *et al.*, 1995; Tortiriello *et al.*, 1995).

*Helianthemum glomeratum* (Cistaceae) tem se tornado o centro de vários estudos que tentam esclarecer o seu potencial terapêutico como planta medicinal. Estudos anteriores já demonstraram um efeito antiprotozoário (Calzada *et al.*, 1998) e um efeito bactericida (Meckes *et al.*, 1997). Testes biológicos de compostos isolados de *H. glomeratum* apontaram para os flavonóides presentes nesta planta (camferol e tilirosideo) como sendo os responsáveis pelos efeitos bactericidas (Calzada *et al.*, 1995).

Nenhum produto deve ser utilizado pela população sem antes ter passado por uma avaliação toxicológica criteriosa, onde é indispensável análise dos riscos de efeitos adversos para a saúde, assegurando condições de uso do novo produto. Neste estudo, a avaliação toxicológica dos extratos de *H. glomeratum* foi realizada por um teste que mede atividade mutagênica. A mutação gênica é um fenômeno raro que consiste na modificação da seqüência de nucleotídeos de um determinado gene, resultando na perda ou na modificação do produto final por ele codificado (Friedberg *et al.*, 1995). A mutação gênica também pode ocorrer de forma induzida, quando a administração de algum produto na célula pode afetar um determinado gene. A correlação entre mutagenicidade e carcinogenicidade é de aproximadamente 88% (Maron & Ames, 1983). Já foi verificado que produtos comprovadamente mutagênicos são em sua maioria, cancerígenos (Maron & Ames, 1983). Atualmente um dos ensaios mutagênicos de maior valor preditivo para carcinogênese é o Teste de Ames ("*Salmonella*/"

*microsome assay*"). Devido ao seu baixo custo, a rapidez de seus resultados e a sua sensibilidade, este ensaio tornou-se o teste mais difundido e tem sido amplamente adotado para o *screening* de mutagenicidade de substâncias químicas e produtos naturais (Gatehouse *et al.*, 1994).

De forma espontânea ou induzida, a mutagênese pode ocorrer em uma determinada célula. Existem mecanismos que, quando facilitados por determinadas substâncias, podem neutralizar a mutagênese. Desta forma estes inibidores de mutagênese podem ser classificados em três grupos: desmutagênicos, antimutagênicos e bio-antimutagênicos. Os desmutagênicos interagem com os mutagênicos fora da célula, desativando-os por reações químicas ou enzimáticas. Os antimutagênicos podem agir através de inibição da ativação metabólica de um pró-mutágeno, indução da detoxificação de enzimas, reação química com o mutágeno, captura de espécies reativas de oxigênio produzidas pelo mutágeno e proteção de sítios nucleofílicos no DNA. Bio-antimutagênicos são compostos que atuam nas células que já apresentam alteração no DNA, ou seja, células que já foram expostas ao mutágeno (Shamon & Pezzuto, 1994).

O objetivo deste trabalho é analisar a atividade toxicológica (mutagênese e antimutagênese) de extratos de *H. glomeratum* utilizando o Teste de Ames ("*Salmonella*/" *microsome assay*").

## MATERIAL E MÉTODO

**Preparação dos Extratos:** *H. glomeratum* foi coletada no Estado de Chiapas, México e para realização dos ensaios foram preparados cinco diferentes extratos: acetona-água da raiz (*Halimium*

**TABELA 1:** Genótipo das linhagens utilizadas no Teste de Ames.

LINHAGENS BACTERIANAS	ALVO DA MUTAÇÃO	GENÓTIPO
TA98	CG	HisD3052, <i>rfa</i> , <i>bio</i> <sup>-</sup> , <i>suvrB</i> , pKM101
TA100	CG	HisG46, <i>rfa</i> , <i>bio</i> <sup>-</sup> , <i>suvrB</i> , pKM101
TA97	CG	HisD6610, <i>rfa</i> , <i>bio</i> <sup>-</sup> , <i>suvrB</i> , pKM101
TA102	AT	HisG428, <i>rfa</i> , <i>bio</i> <sup>-</sup> , pKM101, pAQ1

*Rfa* - ausência de camada lipopolissacarídica na membrana celular; *bio*<sup>-</sup> - deleção do gen para produção do aminoácido histidina; *suvrB* - deleção do gene que realiza reparo por excisão; pKM101 - plasmídeo que carrega o gene que codifica resistência ao antibiótico ampicilina, pAQ1 - plasmídeo que carrega o gene que codifica resistência ao antibiótico tetraciclina.

**TABELA 2:** Teste de mutagenicidade e antimutagenicidade de extratos vegetais (*Helianthemum glomeratum*-*Halimium 1*, *Halimium 2*, *Halimium 3*, *Halimium 4* e *Halimium 5*), utilizando Teste de Ames. Valores descritos na tabela representam as médias  $\pm$  desvio padrão em triplicata para cada concentração utilizada.

		Número de revertentes (média $\pm$ desvio padrão)							
		TA98		TA100		TA97		TA102	
DROGA TESTE	DOSE ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
<i>Halimium 1</i>	5000	29 $\pm$ 5,2	35 $\pm$ 1,4	146 $\pm$ 5,6	160 $\pm$ 6,1	135 $\pm$ 4,0	146 $\pm$ 2,0	101 $\pm$ 13,0	167 $\pm$ 35,9
	2500	37 $\pm$ 3,6	33 $\pm$ 4,3	154 $\pm$ 8,9	167 $\pm$ 12,7	180 $\pm$ 9,9	151 $\pm$ 2,5	190 $\pm$ 12,0	152 $\pm$ 10,6
	1000	38 $\pm$ 4,0	33 $\pm$ 0,7	146 $\pm$ 29,0	167 $\pm$ 8,6	139 $\pm$ 8,5	177 $\pm$ 3,5	162 $\pm$ 18,8	178 $\pm$ 33,2
	500	30 $\pm$ 4,9	55 $\pm$ 7,1	155 $\pm$ 13,5	187 $\pm$ 7,0	127 $\pm$ 3,5	180 $\pm$ 8,5	190 $\pm$ 11,8	203 $\pm$ 12,3
	250	42 $\pm$ 3,8	44 $\pm$ 8,5	159 $\pm$ 37,5	179 $\pm$ 15,1	175 $\pm$ 7,8	140 $\pm$ 11,6	134 $\pm$ 11,5	209 $\pm$ 17,7
	RE	41 $\pm$ 5,2	57 $\pm$ 3,4	197 $\pm$ 24,8	163 $\pm$ 12,5	190 $\pm$ 10,0	211 $\pm$ 3,6	174 $\pm$ 43,2	211 $\pm$ 25,5
	CN	30 $\pm$ 3,5	52 $\pm$ 4,9	176 $\pm$ 30,2	174 $\pm$ 16,5	213 $\pm$ 11,8	211 $\pm$ 6,0	184 $\pm$ 28,5	203 $\pm$ 17,0
	CP	423 $\pm$ 21,2	424 $\pm$ 22,6	550 $\pm$ 28,2	566 $\pm$ 52,0	674 $\pm$ 15,0	423 $\pm$ 8,0	629 $\pm$ 12,0	479 $\pm$ 27,5
	AM	-	40 $\pm$ 30,5	-	90 $\pm$ 4,0	-	171 $\pm$ 1,5	-	127 $\pm$ 10,8
	1000	35 $\pm$ 4,5	35 $\pm$ 7,4	118 $\pm$ 13,6	136 $\pm$ 13,0	114 $\pm$ 14,1	Tóxico	69 $\pm$ 6,3	163 $\pm$ 8,0
<i>Halimium 2</i>	500	31 $\pm$ 4,5	59 $\pm$ 14,7	129 $\pm$ 23,0	140 $\pm$ 3,5	159 $\pm$ 4,1	174 $\pm$ 8,0	143 $\pm$ 14,8	255 $\pm$ 19,5
	250	35 $\pm$ 4,9	47 $\pm$ 0,7	136 $\pm$ 23,0	158 $\pm$ 8,5	152 $\pm$ 5,3	178 $\pm$ 5,5	170 $\pm$ 14,0	227 $\pm$ 34,6
	100	28 $\pm$ 6,2	41 $\pm$ 3,5	180 $\pm$ 11,5	168 $\pm$ 16,5	163 $\pm$ 7,0	181 $\pm$ 12,0	201 $\pm$ 18,8	193 $\pm$ 17,5
	50	34 $\pm$ 6,1	42 $\pm$ 3,8	139 $\pm$ 34,2	141 $\pm$ 9,1	162 $\pm$ 2,0	193 $\pm$ 6,0	174 $\pm$ 8,6	248 $\pm$ 36,0
	RE	37 $\pm$ 1,5	57 $\pm$ 3,4	103 $\pm$ 36,5	181 $\pm$ 9,1	184 $\pm$ 5,6	211 $\pm$ 3,6	174 $\pm$ 43,2	221 $\pm$ 15,7
	CN	32 $\pm$ 5,1	52 $\pm$ 4,9	130 $\pm$ 12,2	179 $\pm$ 17,0	176 $\pm$ 2,1	211 $\pm$ 6,0	184 $\pm$ 28,5	207 $\pm$ 17,6
	CP	582 $\pm$ 30,6	424 $\pm$ 22,6	514 $\pm$ 39,4	497 $\pm$ 50,2	662 $\pm$ 43,8	423 $\pm$ 8,0	629 $\pm$ 12,0	493 $\pm$ 24,4
	AM	-	116 $\pm$ 8,5	-	295 $\pm$ 3,9	-	192 $\pm$ 15,0	-	175 $\pm$ 26,8
	1000	31 $\pm$ 1,0	73 $\pm$ 10,5	152 $\pm$ 26,0	126 $\pm$ 17,5	40 $\pm$ 3,8	Tóxico	73 $\pm$ 20,5	294 $\pm$ 19,1
	<i>Halimium 3</i>	500	34 $\pm$ 5,3	52 $\pm$ 4,3	140 $\pm$ 18,8	184 $\pm$ 6,6	154 $\pm$ 5,6	138 $\pm$ 12,0	232 $\pm$ 5,5
250		43 $\pm$ 6,9	52 $\pm$ 8,1	158 $\pm$ 27,2	166 $\pm$ 6,5	159 $\pm$ 5,0	183 $\pm$ 12,0	224 $\pm$ 30,7	276 $\pm$ 7,0
100		39 $\pm$ 1,5	44 $\pm$ 1,5	146 $\pm$ 29,7	176 $\pm$ 5,3	158 $\pm$ 3,8	176 $\pm$ 19,7	185 $\pm$ 15,7	287 $\pm$ 38,8
50		44 $\pm$ 9,6	46 $\pm$ 8,5	163 $\pm$ 22,1	207 $\pm$ 8,7	159 $\pm$ 8,7	208 $\pm$ 2,1	237 $\pm$ 15,4	302 $\pm$ 8,0
RE		47 $\pm$ 9,0	47 $\pm$ 3,4	103 $\pm$ 36,5	163 $\pm$ 11,8	184 $\pm$ 5,6	165 $\pm$ 5,0	216 $\pm$ 14,0	318 $\pm$ 19,0
CN		42 $\pm$ 7,1	42 $\pm$ 7,2	130 $\pm$ 12,2	168 $\pm$ 5,0	176 $\pm$ 2,1	160 $\pm$ 10,5	265 $\pm$ 2,2	315 $\pm$ 11,9
CP		480 $\pm$ 41,8	331 $\pm$ 4,2	514 $\pm$ 39,4	498 $\pm$ 50,0	662 $\pm$ 43,8	431 $\pm$ 6,5	785 $\pm$ 10,0	682 $\pm$ 24,1
AM		-	725 $\pm$ 36,7	-	662 $\pm$ 32,0	-	284 $\pm$ 7,9	-	446 $\pm$ 12,7
1000		31 $\pm$ 2,3	32 $\pm$ 1,4	135 $\pm$ 14,1	163 $\pm$ 16,0	35,5 $\pm$ 0,7	Tóxico	138 $\pm$ 20,9	296 $\pm$ 23,0
<i>Halimium 4</i>		500	39 $\pm$ 11,6	31 $\pm$ 3,2	147 $\pm$ 12,5	188 $\pm$ 6,6	115 $\pm$ 5,0	163 $\pm$ 1,5	160 $\pm$ 7,2
	250	37 $\pm$ 2,5	34 $\pm$ 1,4	142 $\pm$ 17,5	181 $\pm$ 9,8	133 $\pm$ 7,8	168 $\pm$ 4,9	144 $\pm$ 3,8	322 $\pm$ 17,7
	100	36 $\pm$ 3,0	29 $\pm$ 6,4	130 $\pm$ 14,4	188 $\pm$ 13,1	147 $\pm$ 3,5	159 $\pm$ 4,5	174 $\pm$ 23,5	325 $\pm$ 20,0
	50	45 $\pm$ 7,6	39 $\pm$ 7,1	136 $\pm$ 23,2	190 $\pm$ 5,5	139 $\pm$ 5,0	171 $\pm$ 1,5	188 $\pm$ 18,4	306 $\pm$ 2,5
	RE	47 $\pm$ 9,0	39 $\pm$ 2,6	220 $\pm$ 10,0	177 $\pm$ 6,4	176 $\pm$ 3,6	165 $\pm$ 5,0	207 $\pm$ 28,9	318 $\pm$ 19,0
	CN	42 $\pm$ 7,1	33 $\pm$ 2,8	163 $\pm$ 26,2	169 $\pm$ 4,0	166 $\pm$ 5,5	160 $\pm$ 10,5	218 $\pm$ 17,9	315 $\pm$ 11,9
	CP	480 $\pm$ 41,8	327 $\pm$ 17,7	587 $\pm$ 23,2	543 $\pm$ 50,8	570 $\pm$ 47,8	431 $\pm$ 6,5	754 $\pm$ 21,3	682 $\pm$ 24,1
	AM	-	113 $\pm$ 9,0	-	183 $\pm$ 1,0	-	176 $\pm$ 6,5	-	268 $\pm$ 5,6
	1000	32 $\pm$ 1,1	31 $\pm$ 5,2	107 $\pm$ 14,7	159 $\pm$ 3,8	50 $\pm$ 1,0	139 $\pm$ 17,1	283 $\pm$ 17,3	319 $\pm$ 11,9
	<i>Halimium 5</i>	500	33 $\pm$ 4,6	25 $\pm$ 0,7	163 $\pm$ 30,4	194 $\pm$ 10,1	134 $\pm$ 3,6	167 $\pm$ 7,6	218 $\pm$ 26,4
250		40 $\pm$ 8,4	25 $\pm$ 7,1	180 $\pm$ 21,1	185 $\pm$ 13,0	131 $\pm$ 7,6	163 $\pm$ 3,2	188 $\pm$ 1,1	294 $\pm$ 12,3
100		38 $\pm$ 1,1	35 $\pm$ 0,7	150 $\pm$ 10,0	186 $\pm$ 7,0	128 $\pm$ 10,4	152 $\pm$ 3,2	227 $\pm$ 10,2	270 $\pm$ 3,8
50		31 $\pm$ 3,6	32 $\pm$ 2,8	162 $\pm$ 20,5	187 $\pm$ 13,5	132 $\pm$ 3,5	180 $\pm$ 8,8	227 $\pm$ 32,7	274 $\pm$ 3,9
RE		43 $\pm$ 6,1	39 $\pm$ 2,6	220 $\pm$ 10,0	177 $\pm$ 6,4	176 $\pm$ 3,6	200 $\pm$ 14,1	218 $\pm$ 6,5	318 $\pm$ 19,0
CN		34 $\pm$ 4,2	33 $\pm$ 2,8	163 $\pm$ 26,2	169 $\pm$ 4,0	166 $\pm$ 5,5	169 $\pm$ 4,0	184 $\pm$ 25,2	315 $\pm$ 1A1,9
CP		505 $\pm$ 57,5	327 $\pm$ 17,7	587 $\pm$ 23,2	543 $\pm$ 50,8	570 $\pm$ 47,8	402 $\pm$ 11,0	711 $\pm$ 82,7	682 $\pm$ 24,1
AM		-	149 $\pm$ 13,8	-	182 $\pm$ 11,2	-	165 $\pm$ 7,0	-	278 $\pm$ 24,7

RE - Reversão Espontânea; CN - Controle Negativo; todos os extratos e mutagênicos positivos (CP) foram dissolvidos em DMSO, apenas AzNa foi dissolvida em H<sub>2</sub>O; CP: TA98/-S9 - 4NQNO; TA98/+S9 - 2AA; TA100/-S9 - AzNa; TA100/+S9 - 2AA; TA97/-S9 - 4NQNO; TA97/+S9 - 2AF; TA102/-S9 - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; TA102/+S9 - B[a]P; AM - Antimutagênese: Concentração maior não tóxica do extrato em análise acrescida de mutagênico positivo específico para a linhagem bacteriana na concentração utilizada.

1), metanólico das partes aéreas (*Halimium 2*), clorofórmio das partes aéreas (*Halimium 3*), acetato de etila das partes aéreas (*Halimium 4*) e aquoso das partes aéreas (*Halimium 5*). Para realização dos

testes os extratos foram pesados e de acordo com a concentração escolhida foram diluídos em diferentes volumes de dimetil sulfóxido. As soluções sempre preparadas no momento do experimento foram

mantidas a temperatura ambiente e protegidas da luz.

**Linhagens Bacterianas:** Todas as linhagens utilizadas neste estudo foram fornecidas pelo Dr. Bruce Ames do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade de Berkeley. Para cada linhagem foi realizado um teste de confirmação do fenótipo (TABELA 1).

**Reagentes utilizados:** Meio nutriente nº 2: Oxoid; Fração S9: MOLTOX; Dimetil Sulfoxido (DMSO): Merck; 2-aminoantraceno (2AA): Merck; 2-aminofluoreno (2AF): Merck; 4 nitroquinolina-*n*-óxido(4NQNO): Sigma; Azida Sódica (AzNa): Aldrich; Benzo(a)Pireno (B(a)P): Sigma e Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): Merck.

**Determinação das atividades mutagênica e antimutagênica:** Linhagens mutantes (deficientes na produção do aminoácido histidina) de *S.typhimurium* (TA98, TA100, TA97 e TA102) cultivadas em meio nutriente nº 2 e em fase estacionária de crescimento (12 horas a 37°C), foram pré incubadas na mesma temperatura durante 20 minutos com ou sem ativação metabólica (fração S9) e na presença de diferentes concentrações dos extratos em estudo para avaliação da atividade mutagênica. Para análise da atividade antimutagênica, as mesmas linhagens de *S.typhimurium* (TA98, TA100, TA97 e TA102) cultivadas em meio nutriente nº 2 e em fase estacionária de crescimento foram pré-incubadas na presença de ativação metabólica com a mais alta e não tóxica concentração do extrato por nós utilizada e os respectivos mutagênicos positivos. Para cada ensaio realizado, mutagênicos positivos e controles negativos foram utilizados para confirmar a funcionalidade do teste. Os controles negativos utilizados, Dimetil Sulfoxido e água, eram os solventes dos extratos e do mutagênico positivo. Os controles positivos utilizados, 4 nitroquinolina-*n*-óxido, Azida Sódica, 2-aminoantraceno, 2-aminofluoreno, Benzo(a)Pireno e Peróxido de Hidrogênio, eram drogas sabidamente mutagênicas específicas para cada linhagem em questão. As atividades mutagênica e antimutagênica foram medidas pela reversão das linhagens bacterianas para o estado prototrófico do aminoácido histidina. Os experimentos foram realizados pelo menos uma vez utilizando-se cinco diferentes concentrações dos extratos, na ausência e na presença de fração S9 com triplicatas para cada concentração (Gatehouse *et al.*, 1994).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados encontrados foi verificada ausência de atividade mutagênica para todos os extratos testados, uma vez que a reversão

induzida pelos extratos, nas células de *S.typhimurium* foi aproximadamente a mesma que a reversão espontânea nas mesmas células (TABELA 2). Detectou-se atividade antimutagênica para os extratos *Halimium 2*, *Halimium 4* e *Halimium 5*, em todas as linhagens utilizadas, para o extrato *Halimium 3*, nas linhagens TA97 e TA102 e para o extrato *Halimium 1* nas linhagens TA98, TA97, e TA102 (TABELA 2). Neste caso, provavelmente, os extratos vegetais testados, ou bloquearam a ação dos controles mutagênicos utilizados (TA98 e TA100, 2-aminoantraceno; TA97, 2-aminofluoreno e TA102, Benzo(a)Pireno), ou formaram com estes um composto quimicamente menos tóxico às células. Na avaliação da antimutagênese para o extrato *Halimium 3* com as linhagens TA98 e TA100, detectou-se efeito sinérgico. Este extrato provavelmente formou com o controle mutagênico um composto mais tóxico às células, aumentando a reversão destas células ao estado prototrófico para histidina. Já para o extrato *Halimium 1*, os resultados encontrados com a linhagem TA100 na avaliação da antimutagênese, mostraram efeito sinérgico tóxico, indicando que o extrato juntamente com o controle mutagênico, 2-aminoantraceno, provocou morte celular, não observada no tratamento dos dois separadamente. Nossos resultados sugerem serem as folhas e o caule de *H.glomeratum* (*Halimium 2*, *Halimium 4* e *Halimium 5*) as melhores fontes de extratos com atividade antimutagênica.

Estudos anteriores já evidenciaram propriedades antiprotozoárias de extratos provenientes do caule e das folhas de *H.glomeratum* contra trofozoítos de *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*, (Calzada *et al.*, 1998). Estes estudos apontam os compostos flavonóides (quercetina, camferol e tilirosideo) encontrados nas partes aéreas da planta, como sendo os principais responsáveis pelas propriedades antiprotozoárias dos extratos. Neste caso, a aplicação dos extratos para tratamento de disenterias e de diarreias também foi sugerida. Também já foi demonstrada atividade bactericida de extratos de *H.glomeratum*. Estes estudos sugerem que esta atividade tende ser mais relevante quando os enteropatógenos envolvidos estão associados a diarreias sangüinolentas (*Shigella spp*) ou diarreias aquosas (*Vibrio cholerae*), sendo possível que a ação antidiarréica de *H.glomeratum* seja mediada, ao menos em parte, pela sua propriedade bactericida (Meckes *et al.*, 1997).

Entretanto avaliações bioquímicas devem ser consideradas na utilização destes extratos brutos uma vez que produtos naturais com capacidade antioxidante podem acarretar implicações subclínicas (Costa Lopes *et al.*, 2000; Kovary *et al.*, 2001).

## AGRADECIMENTO

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro concedido pela UERJ, FAPERJ e CNPq.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ARUOMA, O.I., SPENCER, J.P.E., ROSSI, R. *et al.* An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of Rosemary and Provençal Herbs. **Food and Chemical Toxicology**, v.34, p.449-456, 1996.
- BERLIN, E. A. and BERLIN, B. Medical ethnobiology of the Highland Maya of Chiapas, Mexico. In: \_\_\_\_\_ . **The gastrointestinal diseases**. Princeton: Princeton Academic Press, 1995.
- BERLIN, E. A., BERLIN, B., LOZOYA, X. *et al.* The scientific basis of gastrointestinal herbal medicine among the Highland Maya of Chiapas, Mexico. In: NADER, L. **Anthropological inquiry into boundaries, power and knowledge**. 2. ed. Routledge: Naked Science, 1996. p.43-68.
- CALZADA, F., LOPÉZ, R., MECKES, M. *et al.* Flavonoids of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. **International Journal Pharmacogy**, v.33, p.351-2, 1995.
- CALZADA, F., ALANIS, A.D., MECKES, M. *et al.* *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to some medicinal plants used by the Maya people of Southern Mexico. **Phytoterapy Research**, v.12, p. 70-2, 1998.
- COSTA LOPES, I., ALBANO, F., LARANJA, G.A.T. *et al.* Toxicological evaluation by *in vitro* and *in vivo* assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. **Toxicology Letters**, v.116, p.189-98, 2000.
- FRIEDBERG, E.C., WALKER, C., SIEDE, W. Introduction to mutagenesis In: **DNA Repair and mutagenesis**. 2. ed. Washinton DC: American Society for Microbiological, 1995. p.59-70.
- GATEHOUSE, D., HAWORTH, S., CEBULA, T. *et al.* Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. **Mutation Research**, v.312, p.217-33, 1994.
- KOVARY, K. LOUVAIN, T.S., COSTA E SILVA, M. C. *et al.* Biochemical behaviours of norbixin during *in vitro* DNA damage induced by reactive oxygen species. **British Journal of Nutrition**, v.85, p.431-40, 2001.
- MARON, M.D., AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research** v.113, p.173-215, 1983.
- MECKES, M.; VILLARREAL, M. L.; TORTIRIELLO, J.; BERLIN, B. and BERLIN, E. A. A microbiological evaluation of medicinal plants used by the Maya people of Southern Mexico. **Phytoterapy Research** 4: 244-250, 1995.
- MECKES, M., TORRES, J., CALZADA, F. *et al.* Antibacterial properties of *Helianthemum glomeratum*, a plant used in Maya traditional medicine to treat diarrhoea. **Phytoterapy Research**, v.11, p.128-31, 1997.
- SHAMON, L.A., PEZZUTO, J.M. Plant antimutagens: A review and strategy for the identification of therapeutically useful agents. In: WAGNER, H., Norman, R. **Economic and medicinal plant research**, 6. ed. USA: Academic Press, 1994. p.235-297.
- TORTIRIELLO, J.; MECKES-FISCHER, M.; VILLARREAL, M.L. *et al.* Spasmolytic activity of medicinal plants used to treat gastrointestinal and respiratory diseases in the highland of Chiapas. **Phytomedicine**, v.2, p.1-10, 1995.