

Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus*

SAMUEL TAKASHI SAITO¹
GIOVANNI CIGNACHI²
SUSANA GASPARRI³
JENIFER SAFFI⁴

RESUMO

A *Costus spicatus* Swartz, que popularmente é chamada de “Cana-do-Brejo”, é uma espécie nativa da América Latina habitando em locais úmidos. É utilizada popularmente para patologias do sistema urinário. Entretanto, o uso desta planta para fins terapêuticos ainda carece de estudos de toxicidade e de segurança. Em função disto, o objetivo desse trabalho foi verificar as atividades mutagênica e antimutagênica do extrato bruto hidroalcoólico, preparado das mesmas condições em que ele é consumido pela população, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental. Os experimentos sugerem que este extrato não apresenta atividade mutagênica e possa ter atividade antimutagênica dependente da dose utilizada e tratamento.

Palavras-chave: cana-do-brejo, *Costus spicatus*, mutagênese, antimutagênese, *Saccharomyces cerevisiae*.

¹ Acadêmico do Curso de Farmácia/ULBRA – Bolsista PIBIC/CNPq

² Acadêmico do Curso de Farmácia/ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

³ Aluna do PPG Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA

⁴ Professora – Orientadora do Curso de Farmácia e do PPG Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA (jenifer.saffi@ulbranet.com.br)

ABSTRACT

The *Costus spicatus* Swartz, commonly called “Cana-do-Brejo” in Brazil, is a native specie found in wet coastal forests from Latin America. It is utilized in folk medicine to relieve in urinary affections. However there are no studies that confirm the efficacy and safety of this plant for therapeutics purposes. For this reason, the aim of this study was to verified the mutagenic and antimutagenic activities of the hidroalcoholic extract, prepared in the same conditions utilized by the population, using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism. This study suggests that this extract is not mutagenic for the yeast and may be antimutagenic depending for the dose and treatment used.

Key words: cana-do-brejo, *Costus spicatu*, mutagenesis, antimutagenesis, *S. cerevisiae*.

INTRODUÇÃO

A planta *Costus spicatus* Swartz (sin.: *C. cylindricus* Jacq. Família: Zinziberaceae/ Costaceae), popularmente chamada no Brasil de “Cana-do-Brejo”, é uma espécie nativa encontrada em locais úmidos do Sul do México, Yucatan, Costa Rica, norte da Colômbia e Brasil (SILVA et al., 1999) – Figura 1. Suas folhas, hastes e rizomas são empregados na medicina tradicional de longa data, principalmente na região Amazônica (LORENZI & MATOS, 2002). É utilizada popularmente pela sua ação depurativa e diurética, para alívio de infecções

urinárias e para expelir pedras renais. Esta planta tem atraído a atenção de pesquisadores, pois se verificou nos rizomas da mesma uma nova fonte de diosgenina, um precursor de hormônios esteroidais (SILVA et al., 1999).

Informações etnofarmacológicas registram o uso das raízes e rizomas como diurético, tônico, emenagogo e diaforético, enquanto o suco da haste fresco diluído em água tem uso contra gonorréia, sífilis, nefrite, picadas de insetos, problemas da bexiga e diabetes (ALBUQUERQUE, 1989; VAN DEN BERG, 1993; CORRÊA et al., 1998; VIEIRA & ALBUQUERQUE, 1998; MORS et al., 2000).



Figura 1 - *Costus spicatus* (<http://toptropicals.com>)

Entretanto, não existem ainda estudos que comprovem a eficácia e a segurança do uso desta planta para fins terapêuticos. Em função disso, o objetivo desse trabalho foi verificar as atividades mutagênica e antimutagênica do extrato hidroalcoólico da cana-do-brejo, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra vegetal

Partes aéreas secas da planta *Costus spicatus* foram gentilmente cedidas pela empresa Santos-Flora (São Paulo – SP, Brasil). O laudo botânico foi também realizado e fornecido pela referida empresa.

Preparação do extrato

Para preparação do extrato hidroalcoólico as partes aéreas secas da planta foram colocadas em maceração com álcool 50% em proporção de 1:5, ou seja, uma parte da planta para cada cinco partes do solvente, durante 21 dias, à temperatura ambiente, acondicionada em frasco âmbar.

Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Para os estudos de mutagênese e antimutagênese, empregou-se a linhagem XV185-14c (MATa *ade2-2 arg4-17 his1-7 lys1-1 trp5-48 hom3-10*), a qual detecta mutação reversa, mutação do tipo *forward* e por deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*).

Meios de cultura e soluções

O crescimento das células foi feito em meio líquido completo (YEL) contendo 1% de extrato de levedura, 2% de bactopectona e 2% de glicose obtidos da marca Difco, Oxoid ou Vetec. Para determinação do número de células viáveis, ou seja, unidades formadoras de colônias, foram feitas semeaduras em meio YEPD solidificado com 2% de bacto-ágar, marca Vetec (AUSUBEL et al., 1989).

Para todos os tratamentos, as células foram ressuspensas e diluídas em solução salina (NaCl 0,9%).

Nos testes de mutagênese e antimutagênese foi empregado o Meio Sintético (SC) suplementado (SC-histidina, SC-lisina e SC-homoserina), nos quais os aminoácidos foram omitidos, conforme descrito por AUSUBEL et al. (1989).

Condições de crescimento

Células em fase estacionária de crescimento foram obtidas a partir de uma colônia isolada, retirada da placa e colocada para crescer em meio líquido YEL, por 48 horas, a 30°C, até atingir a concentração de $2-4 \times 10^8$ células/mL.

Detecção da atividade mutagênica e antimutagênica

Para os ensaios de mutagenicidade e antimutagenicidade, utilizou-se a linhagem XV185-14c de *S. cerevisiae*. Em frasco de Erlenmeyer contendo 30 mL de YEL foi inoculada uma colônia isolada dessa linhagem e colocada para crescer em 'shaker' (incubadora com agitação orbital – LABLINE), a 180 rpm e 30°C, durante 48 horas, para atingir a fase estacionária.

ria. As culturas assim mantidas atingiam uma concentração de $2 \text{ a } 4 \times 10^8$ céls/mL. Posteriormente, esta suspensão foi passada para um tubo Falcon de 50 mL e centrifugada por 5 minutos a 5000 rpm. Após esta primeira centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 20mL de solução salina, seguido de centrifugação para lavagem das células. Este procedimento foi repetido duas vezes. As células foram então contadas em câmara de Neubauer no microscópio óptico e foram feitas as diluições necessárias para se obter a concentração celular desejada para o tratamento. Uma suspensão celular de 2×10^8 células/mL em fase estacionária foi incubada durante 20 horas a 30°C , sob agitação a 180 rpm, com doses crescentes ($50\text{-}500\mu\text{L/mL}$ de suspensão celular) do extrato hidroalcolico da *Costus*. Determinou-se a sobrevivência através de semeadura em meio rico YEPD, após 3-5 dias de crescimento em estufa a 30°C . Para a detecção de mutação induzida (revertentes das marcas LIS, HIS ou HOM) as células foram incubadas em meio mínimo seletivo, durante 3-5 dias a

30°C . A mutação *his1-7* é um alelo de sentido incorreto ou *missense*, do tipo não supressivo, e, portanto, as reversões são a consequência de mutações no próprio locus.

Entretanto, o alelo *lys1-1* corresponde a uma mutação do tipo ocre sem sentido (*nonsense*), a qual pode ser revertida de forma locus específico ou através de mutação para frente (mutação forward) em um gene supressor. A diferença entre as reversões verdadeiras e mutações supressoras (*forward*) no locus *lys1-1* está bem descrita por SCHÜLLER & VON BORSTEL (1974), onde o conteúdo de adenina reduzido no meio SC-lys mostra reversão no locus quando as colônias são vermelhas e mutações supressoras quando as colônias ficam brancas. Acredita-se que *hom3-10* contenha mutação do tipo deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift*, devido a sua resposta a uma série de agentes sabidamente mutagênicos. A representação esquemática deste ensaio pode ser observada na Figura 2.

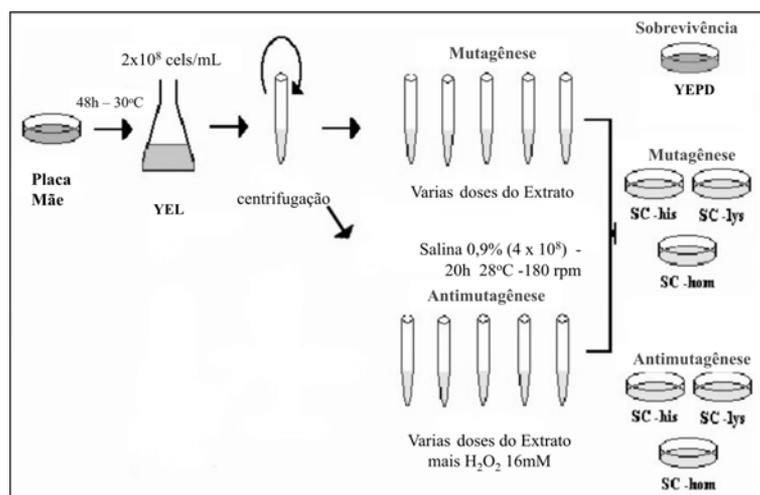


Figura 2 - Representação esquemática do teste de mutagênese e antimutagênese em *S. cerevisiae*.

Para os experimentos de antimutagênese, dois tipos de tratamento foram realizados:

1. Pré-tratamento: a linhagem foi incubada por 16 horas (a 30°C com agitação a 180 rpm), com diferentes doses do extrato hidroalcoólico da planta, sendo posteriormente adicionado o H₂O₂ 16mM por mais uma hora, sendo então semeada a sobrevivência e a mutagênese em meios específicos (SC-lys, SC-hom e SC-his);
2. Tratamento simultâneo: a mesma linhagem foi incubada por 4 horas com diferentes doses do extrato hidroalcoólico e com H₂O₂ 16mM concomitantemente (a 30°C com agitação), seguido por plaqueamento nos mesmos meios descritos acima.

Nos dois casos, as placas foram incubadas no escuro a 30°C, em estufa, durante 3-5 dias e após fez-se à contagem do número de colônias revertentes. Todos estes experimentos foram feitos em triplicata para cada dose testada.

Como controle positivo foi utilizado o composto nitroquinoleína-1-óxido, (4-NQO 5mM),

da marca Sigma, em todos os experimentos de mutagênese e antimutagênese.

Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o Teste ANOVA-Dunnett, comparando-se os tratamentos dos extratos com o controle (dose zero de extrato). Foi considerado estatisticamente significativo $P < 0,05$ e $P < 0,01$.

RESULTADOS

Na Tabela 1 pode-se observar que o extrato hidroalcoólico da *Costus spicatus* não é capaz de induzir mutagenicidade na linhagem XV185-14c de *S. cerevisiae* em nenhuma das doses testadas. É importante ressaltar que na dose de 50 mL/mL suspensão celular o número de revertentes no locus de histidina é ainda menor que no controle (dose zero de extrato), mostrando que o extrato deve conter substâncias capazes de diminuir a própria mutagênese espontânea da linhagem.

Tabela 1 - Indução de mutação pontual (*his1-7* e *lys1-1*) e mutação por deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift* (*hom3-10*) na linhagem haplóide XV 185-14c de *S. cerevisiae*, após o tratamento com o extrato hidroalcoólico da *Costus spicatus* em fase estacionária de crescimento.

Dose do Extrato (μ L/mL de suspensão celular)	Sobrevivência (%)	Revertentes His1/10 ⁸ sobreviventes ^a	Revertentes Lys1/10 ⁸ sobreviventes ^b	Revertentes Hom3/10 ⁸ sobreviventes ^a
4-NQO (CP)	13 (19)	3066,67 (874)	350,88 (100)	10,53 (3)
0	100% (459) ^c	6,20 \pm 1,55 ^d (29) ^c	2,20 \pm 0,63 ^d (12) ^c	2,20 \pm 0,28 ^d (13) ^c
50	120% (552)	4,00 \pm 1,55 (27)**	3,10 \pm 0,63 (19)	2,60 \pm 0,28 (12)
100	117% (540)	4,40 \pm 1,27 (30)	2,10 \pm 0,07 (15)	1,80 \pm 0,28 (11)
250	104% (477)	4,20 \pm 1,41 (37)	2,40 \pm 0,14 (16)	2,20 \pm 0,00 (12)
500	102% (468)	3,30 \pm 2,05 (36)	2,50 \pm 0,21 (17)	2,80 \pm 0,42 (16)

^a Revertentes de locus-específico; ^b Revertentes de locus-não específico;

^c Número entre parênteses é o total de colônias contadas em três placas para cada dose;

^d Significância e desvio-padrão de três experimentos independentes;

** Dados significativos em relação ao grupo controle negativo (salina) $P < 0,01$ no teste ANOVA ('Dunnett's Multiple Comparison Test').

4-NQO= 4-nitroquinoleína-1-óxido (controle positivo).

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da antimutagênese, com o pré-tratamento, ou seja, onde a linhagem foi pré-incubada por 16 horas com o extrato e posteriormente trata-

da com o H₂O₂. Neste caso, não foi observada diferença estatisticamente significativa de proteção do extrato frente às mutações induzidas pelo H₂O₂.

Tabela 2 - Indução de mutação pontual (*his1-7* e *lys1-1*) e mutação por deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift* (*hom3-10*) na linhagem haplóide XV 185-14c de *S. cerevisiae*, após incubação prévia com o extrato da *Costus spicatus* (pré-tratamento) e posterior tratamento por uma hora com H₂O₂ 16mM em fase estacionária de crescimento.

Dose do Extrato (µL/mL de suspensão celular) + H ₂ O ₂ (P)	Sobrevivência (%)	Revertentes His1/10 ⁸ sobreviventes ^a	Revertentes Lys1/10 ⁸ sobreviventes ^b	Revertentes Hom3/10 ⁸ sobreviventes ^a
0P	100% (555) ^c	7,00 ± 2,82 ^d (27) ^c	3,80 ± 0,00 ^d (16) ^c	3,40 ± 0,14 ^d (10) ^c
50P	83% (465)	11,0 ± 2,82 (47)	3,80 ± 0,00 (12)	3,20 ± 0,14 (14)
100P	109% (606)	11,3 ± 3,04 (49)	2,40 ± 0,98 (15)	2,70 ± 0,49 (16)
250P	59% (330)	14,4 ± 5,23 (54)	3,30 ± 0,35 (18)	2,50 ± 0,63 (13)
500P	81% (453)	15,6 ± 6,08 (56)	3,50 ± 0,21 (16)	3,10 ± 0,21 (14)

^a Revertentes de locus-específico; ^b Revertentes de locus-não específico;

^c Revertentes de Locus não-específico.

^d Números entre parênteses é o total de colônias contadas em três placas para cada dose;

^e Significância e desvio-padrão de três experimentos independentes.

A Tabela 3 contém os resultados da antimutagênese com o tratamento simultâneo de extrato e H₂O₂ durante 4 horas. Neste tipo de ensaio, pôde-se perceber uma redução signi-

ficativa da mutagenicidade induzida pelo H₂O₂ no locus da histidina para as doses de 100, 250 e 500 mL/mL suspensão celular de extrato, indicando, portanto, atividade antimutagênica.

Tabela 3 - Indução de mutação pontual (*his1-7* e *lys1-1*) e mutação por deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift* (*hom3-10*) na linhagem haplóide XV 185-14c de *S. cerevisiae*, após o tratamento simultâneo durante 4 horas com o extrato hidroalcoólico de *Costus spicatus* e H₂O₂ 16mM, em fase estacionária de crescimento.

Dose do Extrato (µL/mL de suspensão celular) + H ₂ O ₂ (P)	Sobrevivência (%)	Revertentes His1/10 ⁸ sobreviventes ^a	Revertentes Lys1/10 ⁸ sobreviventes ^b	Revertentes Hom3/10 ⁸ sobreviventes ^a
0P	100% (290)^c	18,75± 4,73^d (45)^c	2,73± 1,00^d (6)^c	5,57± 2,77^d (13)^c
50P	87% (260)	19,55± 10,97 (37)	2,88± 2,43 (5)	6,30± 0,52 (16)
100P	125% (326)	12,05± 1,54* (39)	1,62± 0,57 (5)	7,42± 3,09 (22)
250P	173% (419)	9,80± 2,71* (45)	1,45± 0,80 (6)	4,15± 3,91 (13)
500P	115% (308)	13,49± 1,51* (37)	2,59± 1,21 (7)	6,03± 3,20 (15)

^a Revertentes de Locus-específico.

^b Revertentes de Locus não-específico (mutação *forward*).

^c Números entre parênteses é total de colônias contadas em três placas para cada dose.

^d Significância e desvio-padrão de três experimentos independentes.

* Dados significativos em relação ao grupo controle negativo (solvente) $P < 0.05$ no teste ANOVA ('Dunnett's Multiple Comparison Test').

DISCUSSÃO

A família Zingiberaceae é largamente distribuída entre os trópicos, particularmente no sudeste da Ásia. Embora existam muitos relatos de que os constituintes das plantas dessa família encontradas na Malásia não apresentam atividades biológicas, seja através de extratos brutos ou compostos isolados, sabe-se que muitas espécies das Zinziberaceae apresentam atividade antioxidante e antimicrobiana (IWU & ANYANWU, 1982; SIRAT, 1994).

A planta *Costus spicatus* tem atraído a atenção de pesquisadores desde a descoberta de diosgenina, um precursor de hormônios esteroidais, em seus rizomas (SILVA et al., 1999).

Por meio de estudos fitoquímicos e da combinação de espectroscopia e métodos químicos realizados com as partes aéreas da *Costus spp.*, foi descrita a identificação e elucidação estrutural de dois novos diglicosídeos flavônicos com atividade antiinflamatória - a tamarixetina 3-O-neohesperidósídeo e o canferídeo 3-O-neohesperidósídeo - principalmente nas folhas da cana-do-brejo. Além destes, foram identificados outros compostos bastante conhecidos tais como quercetina 3-O-neohesperidósídeo e seis outros flavonóides (SILVA et al., 2000).

Embora o gênero *Costus* seja amplamente utilizado na medicina popular, ainda são poucos os estudos farmacológicos a respeito dos extratos dessas plantas. O extrato metanólico de *Costus afer Ker* mostrou-se citotóxico em ensaios com microcrustáceos, apresentou atividade anestésica local em porco da Índia, atividade estrogênica e progestogênica em ratas e atividade antihiperglicemiante em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (ANAGA et al., 2004).

Algumas das substâncias presentes nos alimentos e vegetais podem ter efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos, isto é, podem induzir mutações do DNA e/ou podem favorecer o desenvolvimento de tumores enquanto outras podem atenuar ou anular estes efeitos (ANTUNES & ARAÚJO, 2000).

Após a observação inicial de efeitos antimutagênicos de certos vegetais, vários compostos têm sido isolados de plantas e testados quanto à ação protetora sobre lesões induzidas no DNA (KADA et al., 1978). O termo "antimutagênico" foi usado originalmente por NOVICK & SZILARD em 1952 para descrever os agentes que reduzem a frequência de mutação espontânea ou induzida, independente do mecanismo envolvido (VON BORSTEL et al., 1996).

Os mecanismos de ação dos agentes antimutagênicos foram classificados em dois processos maiores, denominados desmutagênese e bio-antimutagênese. Na desmutagênese, os agentes protetores, ou antimutagênicos, atuam diretamente sobre os compostos que induzem mutações no DNA, inativando-os química ou enzimaticamente, inibindo ativação metabólica de pró-mutagênicos ou seqüestrando moléculas reativas. Na bio-antimutagênese, os antimutagênicos atuam sobre o processo que leva a indução de mutações, ou reparo das lesões causadas no DNA (KADA et al., 1978). Posteriormente, uma outra classificação mais detalhada foi sugerida, considerando o modo de ação dos antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos, bem como o ambiente de ação, extra ou intracelular (DE FLORA & RAMEL, 1988).

O potencial antimutagênico de uma substância pode ser avaliado em sistemas biológicos diversos, os mesmos empregados para o estudo e identi-

ficção dos agentes mutagênicos (ANDERSON et al., 1995; WATERS et al., 1996). Em qualquer desses sistemas-teste, o tratamento com os agentes mutagênicos, que induzem as mutações, e com o antimutagênico, que poderá inibir o aparecimento de lesões no DNA, pode ocorrer simultaneamente ou em momentos diferentes, por meio de pré-ou pós-tratamento. Os agentes antimutagênicos usados em pré-tratamento ou tratamento simultâneo podem atuar como agentes desmutagênicos. A efetividade do agente antimutagênico no pós-tratamento sugere que ele esteja atuando pelo mecanismo de bioantimutagênese e estaria relacionado ao processo de reparo das mutações, como acontece com a vanilina (SASAKI et al., 1987) e com o ácido tânico (SASAKI et al., 1988). Muitos compostos antimutagênicos encontrados nos alimentos são agentes antioxidantes e atuam seqüestrando os radicais livres de oxigênio, quando administrados como pré-tratamento ou nos tratamentos simultâneos com o agente que induz as mutações no DNA.

Para os ensaios de mutagênese, o extrato hidroalcoólico da *Costus spicatus* não induziu atividade mutagênica na linhagem XV185-14c de *S. cerevisiae* nas doses testadas. Para os testes de antimutagenicidade, o extrato não protegeu significativamente das lesões induzidas por H_2O_2 quando pré-tratadas, mas quando tratadas simultaneamente, os testes sugeriram uma pequena atividade antimutagênica nas doses de 100, 250 e 500 mL/ mL suspensão celular, apenas no locus da histidina. Conforme citado acima, este efeito poderia ser devido a uma atividade desmutagênica da planta, onde os agentes protetores atuariam diretamente sobre a ação do H_2O_2 inibindo a formação dos

compostos que induzem mutações no DNA ou seqüestrando as moléculas reativas, como o radical hidroxil.

O fato deste extrato vegetal não apresentar atividade mutagênica e sim, antimutagênica em *S. cerevisiae* torna-o bastante promissor para estudos futuros com outros modelos animais, bem como para a identificação dos compostos biologicamente ativos presentes na planta.

CONCLUSÕES

Nas doses testadas, o extrato hidroalcoólico da *Costus spicatus* não induziu atividade mutagênica em levedura *S. cerevisiae*.

O extrato hidroalcoólico não apresentou atividade antimutagênica para lesões induzidas por H_2O_2 , quando a linhagem foi pré-tratada com o extrato; entretanto, no tratamento simultâneo da linhagem com o extrato vegetal da *Costus* e com o H_2O_2 , a atividade antimutagênica mostrou-se locus-específico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. João A. P. Henriques e sua equipe, do Laboratório de Genotoxicidade (GENOTOX) da UFRGS, por nos dispor os equipamentos necessários para realização deste trabalho, bem como pelas valiosas sugestões. À Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Luterana do Brasil, pelas bolsas de Iniciação Científica concedidas e pelo financiamento deste projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, J. M. **Plantas Mediciniais de Uso Popular**. Brasília: ABEAS, 1989. 100p.

ANAGA, A. O.; NIJOKU, C. J.; EKEJIUBA, E. S.; ESIKA, M. N.; ASUZU, I. U. Investigations of the methanolic leaf extract of *Costus afer*. Ker for pharmacological activities *in vitro* and *in vivo*. **Phytomedicine**, v. 11, p. 242-248, 2004.

ANDERSON, D.; BASARAN, N.; BLOWERS, A.; EDWARDS, A. J. The effect of antioxidants on bleomycin treatment in *in vitro* and *in vivo* genotoxic assays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 329, p. 37-47, 1995.

ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicity and antimutagenicity of the main food colorings. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, p. 81-88, 2000.

AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: John Wiley and Sons, 1989.

CORRÊA, A. D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas Mediciniais – Do cultivo à terapêutica**. 2.ed. Petrópolis: Editora Vozes, 1998. 247p.

DE FLORA, S.; RAMEL, C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. **Mutation Research**, v. 202, p. 285-306, 1988.

IWU, M. M.; ANYAWU, B. N. Steroidal constituent of *Costus afer*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, p. 263, 1982.

KADA, T.; MORITA, K.; INOUE, T. Anti-

mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. **Mutation Research**, v. 53, p. 351-353, 1978.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de ABREU. **Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal Plants of Brazil**. Michigan: Incorporated Algonac, 2000. Reference Publications.

SASAKI, Y. F.; IMANISHI, H.; OHTA, T.; SHIRASU, Y. Effects of vanillin on sister chromatid exchanges and chromosome aberrations induced by mitomycin C in cultured Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**, v. 191, p. 193-200, 1987.

SASAKI, Y. F.; IMANISHI, H.; OHTA, T.; SHIRASU, Y.; WATANABE, M.; MATSUMOTO, K.; SHIRASU, Y. Suppressing effect of tannic acid on UV and chemically induced chromosome aberrations in cultured mammalian cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, p. 2423-2428, 1988.

SCHULLER R. C.; VON BORSTEL, R. C. Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration, **Mutation Research**, v. 24, p. 17-23, 1974.

SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R. ; PARENTE, J. P. Flavonol glycosides from *Costus spicatus*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 87-92, 2000.

SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J. P. A furostanol glycoside from rhizomes of *Costus spicatus*. **Phytochemistry**, v. 51, p.

931-935, 1999.

SIRAT, H. M. Study on the terpenoids of *Zingiber ottensi*. **Planta Medica**, v. 60, p. 497, 1994.

VAN DEN BERG, M. E. **Plantas Mediciniais na Amazônia** - Contribuição ao seu conhecimento sistemático. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993. 206 p.

VIEIRA, L. S.; ALBUQUERQUE, J. M. **Fitoterapia Tropical** - Manual de Plantas

Medicinais. Belém: FCAP/Serviço e Documentação e Informação, 1998.

VON BORSTEL, R. C.; DRAKE, J. W.; LOEB, L. A. Foreword. **Mutation Research**, v. 350, p. 1-3, 1996.

WATERS, M. D.; STACK, H. F.; JACKSON, M. A.; BROCKMAN, H. E.; DE FLORA S. Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. **Mutation Research**, v. 350, p. 109-129, 1996.