

Evaluation of the genotoxic/antigenotoxic activities of the methanolic extract of *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke

Keren Hapuque da Silva Souza*
Alessandra Azevedo do Nascimento*
Edmara Caroline dos Santos Ribeiro**
Gleicyanne Furtado Frazao**
Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto*
Natanael da Silva Brito**
Sabrina da Conceição Barbosa**

Abstract

Amasonia campestris (Aubl.) Moldenke, belongs to the Lamiaceae family, found in the North, Northeast, Midwest and Southeast regions of Brazil. *A. campestris* tea is popularly used for the fight against malaria, diabetes among other diseases. Its common names are mendoca, macaw tail, macaw bamboo. The present study evaluated the genotoxic and antigenotoxic potential of the methanol extract of the roots of *Amasonia campestris* in polychromatic erythrocytes of Swiss mice. The animals were treated with different concentrations of *Amasonia campestris* (250, 500, 1000 and 2000 mg/kg b.w.) including positive control groups (doxorubicin, DXR 16 mg/kg body weight), negative (water) and solvent (dimethyl sulfoxide, DMSO). Concentrations were administered to the animals via a gavage as well as the negative control and solvent. The positive control was given intraperitoneally. The animals were treated daily with the respective doses for 15 days for genotoxic evaluation. After that, samples of caudal peripheral blood were collected at the hours: 24 and 48hrs after the first gavage, and on days 7 and 15. For the antigenotoxic evaluation, mice were treated on day 14 with intraperitoneal injections of DXR and caudal peripheral blood samples were collected 24 and 48hrs after this intervention. After the treatments, 2,000 polychromatic erythrocytes were counted per animal from each group to evaluate the frequency of Micronuclei. The results showed that the methanol extracts of the roots of *A. campestris* were not genotoxic because no statistically significant difference was observed when compared with the negative control. Animals treated with different concentrations of *Amasonia campestris* extracts associated with DXR had a significant reduction of micronucleated polychromatic erythrocytes when compared with the positive control. In conclusion, the methanolic extract of the roots of *Amasonia campestris* demonstrated antigenotoxic activity and did not prove to have genotoxic activity under the conditions used in this study.

Keywords: Antigenotoxicity. Polychromatic erythrocytes. Genotoxicity.

INTRODUCTION

Brazil has a great biodiversity, accompanied by an ethnic and cultural diversity that conserves a valuable knowledge associated with the use of medicinal plants, thus having great potential to develop studies resulting in appropriate technologies and therapies. Among

the plants of popular use for the treatment of diseases such as malaria and diabetes is *Amasonia campestris*. Some plants associated with these treatments are considered toxic, and despite their use by the population, there are no toxicological studies that guarantee their

DOI: 10.15343/0104-7809.20194302390405

*Federal University of Amapá - Graduate Program in Health Sciences - PPGCS/UNIFAP. Macapá/AP, Brazil

**Estácio College of Macapá - Biomedical Course. Macapá/AP, Brazil

E-mail: hapuque83@gmail.com



safe administration¹.

Santos *et al.*², reported that the Lamiaceae family, where *A. campestris* is inserted, possesses several biological activities. Among the bioactivities reported is their antioxidant activity, which is attributed to the presence of phenolic compounds; components produced by vegetables. Many phytochemical compounds with antioxidant activities have shown satisfactory effects during Doxorubicin therapy^{3,4,5}.

Amasonia campestris is a fruitful species, blooming and producing fruit every months of the year. This species inhabits the Amazonian domain in shady places and edges of forests, in latosols, and in savanoid environments, in the Cerrado, rupestrian field, and in transitional areas between the Caatinga and the Cerrado, near streams, on sandy, stony and rocky soils. It is also found in the states of Amapá, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia and Goiás, and countries bordering Brazil such as Venezuela, Guianas and Suriname. This plant is a perennial, which reaches up to one meter high and is popularly used as a root tea to aid in the treatment of malaria and diabetes. It belongs to the Lamiaceae family, of which 36 species have already been proven to have hypoglycemic activity^{6,1}.

Studies on the genotoxic and antigenotoxic evaluations of the species *Amasonia campestris* are not reported in the scientific literature. Due to the indiscriminate use by the population and the fulfillment of steps to register a probable herbal medicine based on this plant with National Agency of Sanitary Surveillance makes carrying out this study necessary⁷. In fact, pharmacological and genotoxic tests using animals are considered as an essential step in the research of new products intended for human use, including herbal medicines⁸.

Since genotoxic tests are a condition for the safety and feasibility of registration and commercialization of any medicine, this study aimed to evaluate the genotoxic and antigenotoxic activities of the methanolic extract of the *Amasonia campestris* roots in Swiss mice. Due to these factors, the present study raises the following problem: does the methanolic extract of this plant have genotoxic action? If not, does it have antigenotoxic activity?

MATERIALS AND METHODS

Obtaining the methanolic extract of the Amasonia campestris (Aubl.) Moldenke roots.

For the evaluation of the genotoxic and antigenotoxic activities of this study, the plant *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke, belonging to the family Lamiaceae and the genus *Amasonia*, was selected. The roots of the plant were collected in the municipality of Macapá-AP in the residential area of Alphaville; GPS location: Lat. -0.041004°N' Long. -51.111626°W, within a radius of 25 meters. From the specimen collected, a sample was prepared, which was deposited in the Amapaense - HAMAB Herbarium of the Institute of Scientific and Technological Research of Amapá - IEPA.

After this process, the roots were dried at 40°C for 72 hours, in a circulating air oven and later ground in a knife mill. The botanical material was subjected to a 1:5 cold soaking extraction process in methanol for 7 days and homogenized with periodic agitation to facilitate the extraction of the active constituents of the plant. The extracted solution was filtered and then concentrated in a rotary evaporator at 45°C until total solvent evaporation occurred, resulting in the crude methanolic extract of *Amasonia campestris*.

Subsequently, the extract passed through solubility tests with some compounds known as solvents, and Dimethylsulfoxide (DMSO) was selected in the concentration of 1 mL to perform the test in question.

Animals

For the experiments, 84 male Swiss mice aged 6-7 weeks and weighing approximately 25g were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigations in the Laboratory Animal Science Area - CEMIB, University of Campinas- UNICAMP. The mice were kept in plastic boxes in an experimental room under controlled conditions of temperature (23±2°C) and humidity (50±10%), they also were submitted to 12-hour light-dark

cycles, with *ad libitum* access to Presence® ration and filtered water.

At the end of the experiments all animals were submitted to euthanasia (according to Resolution Norm No. 13 of September 20, 2013), and the resulting carcasses were discarded according to item 1.6 of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of FCF-IQ/USP 2013⁹.

DNA Damage Inducing Chemical Agent

The chemotherapeutic Doxorubicin (DXR, Rubidox®) was used as a positive control because it induces the formation of micronuclei in blood cells. This chemical inducer was dissolved in distilled water and administered intraperitoneally (0.3 mL/animal) at the concentration of 16 mg/kg body weight (BW), which was established according to Franke *et al.*¹⁰ and Venkatesh *et al.*¹¹.

Evaluation of the Genotoxic activity

For the genotoxic evaluation, the animals were divided into 7 treatment groups, defined as: 4 groups treated with the different concentrations of the methanolic extract of *Amasonia campestris*, 250, 500, 1000 and 2000 mg/kg body weight (BW), 1 positive control group (Doxorubicin, DXR), 1 negative Control group (Water) and 1 solvent group (Dimethylsulfoxide). Concentrations were administered to the animals via gavage (0.5 mL) as well as the negative control and solvent. The positive control was given intraperitoneally (0.3 mL). The groups of animals received their daily treatments with the respective doses. Samples of the caudal peripheral blood samples were collected at: 24 and 48hrs after the first gavage, and on days 7 and 15. Overall, the experiment lasted 15 days^{12,13}.

Evaluation of Antigenotoxic activity

For the evaluation of the antigenotoxic activity the mice were divided and treated equally to the genotoxicity protocol. However, on the 14th day the groups that received the different concentrations of the methanolic extract of *Amasonia campestris* (250, 500,

1000 and 2000 mg/kg BW) and the solvent group (DMSO + DXR) were treated with intraperitoneal injections of DXR. Samples of caudal peripheral blood were collected 24 and 48 hours after the intervention^{12,13}.

The micronucleus test

The micronucleus test was developed consonant with the protocol described by Hayashy *et al.*¹⁴, and changes proposed by Alves *et al.*¹³. After 24 and 48 hours, 7 and 15 days of the treatments, the animals underwent a small cut at the end of the tail in order to collect a drop of blood to smear on a slide, the material was dried at room temperature, and fixed in methanol for 5 minutes.

After 24 hours, the slides were stained with a Giemsa solution for 15 minutes, washed in running water until the excess dye was removed, dried at room temperature and then subjected to microscopic analysis.

Slide Analysis

The slides of all the animals were coded and analyzed within a short time, in a blind test. Three observers performed the analysis, following a balanced system; that is, the same number of cells were analyzed on different slides, for each observer.

The slides were first analyzed under a microscope at 40x magnification to find fields of good technical quality where the cells were well scattered, undamaged and stained appropriately. After locating this field, the observers then analyzed the cells to identify the presence of micronuclei, using a 1000x magnification (immersion objective). The slides were made in duplicates where 2,000 polychromatic erythrocytes were analyzed per slide.

To calculate the Nuclear Division Index (NDI). A total of 400 erythrocytes per slide were analyzed using the formula:

$$NDI = \frac{PCE}{PCE + NCE}$$

At where:

PCE: number of polychromatic erythrocytes, and
NCE: Number of normochromatic erythrocytes.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed by analysis of variance for completely randomized experiments (ANOVA), with the F statistic calculations and their respective „p-value”. In cases where $p \leq 0.05$, the treatment averages

were compared using the Dunnett method, calculating the minimum significant difference of $\alpha=0.05$, using the Graph Pad Prism program 7.

Ethical aspects

The treatment protocols carried out in this study were submitted to the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Amapá-CEUA-UNIFAP and were approved under Opinion No. 012/2016.

RESULTS

The results obtained for the treatments of 24hr, 48hr and 7 days, 15 days in Swiss mice with different doses of the *Amasonia campestris* extract and these combined with intraperitoneal administration of DXR at 16 mg/

kg BW, along with their respective controls, are shown in Table 1. The doses of *A. campestris* administered did not show a statistically significant difference when compared with the Negative control.

Table 1 – Micronucleated Polychromatic Erythrocyte (MNPCE) frequency in peripheral blood of male Swiss mice treated with the different concentrations of *A. campestris* and their respective controls after 24, 48hr, and 7 and 15 days of treatment.

TREATMENT (mg.kg ⁻¹ BW)	MNPCEs/1000 PCEs ^a			
	24hr	48hr	7 days	15 days
Negative Control	1.08 ± 0.79	1.08 ± 0.79	1,33 ± 0,77	1.17 ± 0.57
DMSO	0.917 ± 0.90	1.25 ± 0.86	1,25 ± 0,45	1.25 ± 0.45
<i>A. campestris</i> 250 mg	1.25 ± 0.45	1.33 ± 0.49	1,08 ± 0,51	1.25 ± 0.75
<i>A. campestris</i> 500 mg	1.17 ± 0.38	1.17 ± 0.38	1,17 ± 0,57	1.17 ± 0.38
<i>A. campestris</i> 1000mg	1.25 ± 0.45	1.17 ± 0.38	1,09 ± 0,30	1.25 ± 0.45
<i>A. campestris</i> 2000mg	1.33 ± 0.49	1.33 ± 0.49	1,25 ± 0,75	1.25 ± 0.45
DXR				24.7 ± 0.65*

^aTwo thousand PCEs when analyzed by animal, for the total of 12000 cells per group; a Mean value ± standard deviation; *Statistically significant difference when compared with the Negative control (p value <0.05); DXR: Doxorubicin, Positive Control; DMSO: Dimethyl sulfoxide, Solvent.

The results obtained in the frequency of Micronucleated Polychromatic Erythrocytes (MNPCE) in peripheral blood of Swiss mice treated with the different concentrations of the *Amasonia campestris* methanolic extract and their respective controls are shown in Table 2.

Simultaneous administration of a single oral dose per gavage of each concentration of *A. campestris* extract associated with DXR injections resulted in a significant reduction of micronuclei, ranging from 56% to 57% (Table

2), of the MNPCE frequency, when compared with the group treated with DXR alone. The gradual increase in concentrations of the *A. campestris* extract did not result in a dose-dependent relationship.

The MNPCE frequency was lower in animals treated with DMSO + DXR than in those treated with DXR only, but these differences were not statistically significant. The NDI showed no evidence of cytotoxic potential in all groups evaluated (Table 3 and 4).

Tabela 2 – Frequência de Eritrócito Policromáticos Micronucleados (EPCMN) em sangue periférico de camundongos Swiss machos tratados com as diferentes concentrações *A. campestris* e seus respectivos controles após 24, 48 horas dos tratamentos.

TREATMENT (mg.kg-1BW)	MNPCEs/1000 PCEs ^{a,b}		% REDUCED	
	24h	48h	24h	48h
Negative Control	1.08 ± 0.79	1.08 ± 0.79	-	-
DMSO + DXR	22.8 ± 0.71 ^c	24.2 ± 1.03	-	-
<i>A. campestris</i> 250 mg + DXR	10.7 ± 0.65 ^{c,d}	10.8 ± 0.86 ^{c,d}	57%	57%
<i>A. campestris</i> 500 mg + DXR	10.7 ± 0.88 ^{c,d}	10.6 ± 0.79 ^{c,d}	57%	57%
<i>A. campestris</i> 1000 mg + DXR	10.8 ± 0.96 ^{c,d}	10.8 ± 0.86 ^{c,d}	56%	56%
<i>A. campestris</i> 2000 mg + DXR	10.9 ± 0.9 ^{c,d}	10.8 ± 0.83 ^{c,d}	56%	56%
DXR	23.2 ± 1.19 ^c	24.5 ± 0.90 ^c	-	-

^aValores de média ± desvio padrão; ^bDois mil PCEs quando analisado por animal, para o total de 12000 células por grupo; ^cDiferença estatisticamente significativa do grupo Controle Positivo (p value < 0,05); ^dDiferença estatisticamente significativa do grupo DXR (p value < 0,05); DXR: Controle Positivo; DMSO: Dimetilsulfóxido Dimetilfulfóxido, Solvente.

Tabela 3 – Nuclear Division Index (NDI) in peripheral blood of Swiss mice treated with the different concentrations *A. campestris* and their respective controls after 24, 48hrs, and 7 and 15 days of treatments.

CONCENTRATION mg/ kg BW	24h ^a	48h ^a	7 DAYS ^a	15 DAYS ^a
Negative Control	5.33 ± 0.52	5.33 ± 0.52	5.33 ± 0.52	5.33 ± 0.52
DMSO	6.33 ± 0.82	6.17 ± 0.98	7.17 ± 1.17	7.67 ± 0.52
DXR				16.83 ± 0.98
<i>A. campestris</i> 250 mg	5.50 ± 0.55	6.50 ± 0.55	6.83 ± 1.17	7.50 ± 0.55
<i>A. campestris</i> 500 mg	5.50 ± 0.55	6.33 ± 0.52	6.83 ± 1.17	7.50 ± 1.22
<i>A. campestris</i> 1000mg	5.17 ± 0.75	5.33 ± 0.52	6.83 ± 0.52	7.17 ± 0.75
<i>A. campestris</i> 2000mg	4.83 ± 0.75	5.33 ± 0.52	6.83 ± 0.82	7.17 ± 0.41

DXR: Doxorubicin, Positive Control; DMSO: Dimethyl sulfoxide, Solvent.

^a400 cells

Table 4 – Nuclear Division Index (NDI) in peripheral blood of Swiss mice treated with the different concentrations *A. campestris* associated with DXR and their respective controls after 24 and 48h of the treatments.

CONCENTRATION mg/kg BW	24h ^a	48h ^a
Negative Control	5.33 ± 0.52	5.33 ± 0.52
DXR	15.33 ± 0.52	17.17 ± 0.75
DMSO+ DXR	13.83 ± 0.98	14.00 ± 0.89
<i>A. campestris</i> 250 mg + DXR	10.67 ± 1.03	11.00 ± 0.89
<i>A. campestris</i> 500 mg + DXR	10.67 ± 1.03	10.67 ± 0.82
<i>A. campestris</i> 1000 mg + DXR	10.00 ± 0.00	10.83 ± 0.75
<i>A. campestris</i> 2000 mg + DXR	4.83 ± 0.00	10.83 ± 0.75

DXR: Doxorubicina, Controle Positivo; DMSO: Dimetilfulfóxido, Solvente.

^a 400 células

DISCUSSION

According to Sasidharan *et al.*¹², chemical studies of medicinal plants for the identification of secondary compounds are of great relevance for studies on bioactivities. A preliminary phytochemical study by Costa *et al.*⁶ showed the presence of several chemical compounds in the root extract of *Amasonia campestris*, such as organic acids, reducing sugars, phenols and tannins, alkaloids, purines, steroids and triterpenes, anthocyanins, depsides and depsidones. Regarding the phenolic compounds, the results were negative for flavonoids in this study, however, positive for phenols, tannins and anthocyanins.

Phenolic compounds are substances widely disseminated in Nature, and more than 8000 phenolic compounds have already been detected in plants. This group constitute various vegetables, fruits and industrialized products. These compounds act as antioxidants, since they have the ability to donate hydrogen or electrons, but they also have stable intermediate radicals, which prevent the oxidation of various food ingredients, especially lipids¹⁵. The study by Costa *et al.*⁶ is still preliminary, but we have an indicative finding that corroborates the finding in that study. The administration of the concentrations of *A. campestris* extract (250, 500, 1000 and 2000 mg/kg BW) with

intraperitoneal administration of DXR resulted in a significant 56% to 57% reduction of the Micronucleated Polychromatic Erythrocyte (MNPCE) frequency after 24- and 48-hour treatments, when compared with the DXR alone group. Therefore, the administered concentrations of the *A. campestris* extract did not show a proportional increase in the reduction of the genotoxic activity in the period of 24h and 48h, thus inferring absence in relation to the dose-dependent, this is possibly due to the presence of phenolic compounds present in the roots of the plant.

The decrease of the mutagenic effect of DXR in non-tumor cells has been the subject of experimental research on combined treatments of DXR with antioxidant substances, which are able to neutralize the damaging action of the free radicals that are generated^{16,17,18,19,20}.

Free radicals are unstable and reactive molecules, which have an unpaired electron in their orbital. The continuous production of free radicals is part of the normal cellular function and is essential to health in several biological activities. The balance of free radicals occurs through the production and removal performed by defense mechanisms of the body. In the occurrence of an imbalance caused by the exaggerated production of free radicals by

endogenous or exogenous factors, oxidative stress occurs, which is responsible for the appearance of several diseases^{20,21}.

For protection against free radicals to occur, the ingestion of antioxidants in the diet is essential. An antioxidant substance can modify the oxidative cycles inhibiting or retarding the damages by being able to interact with the free radicals using several mechanisms like: the elimination of species that initiate peroxidation, interaction with O₂ to prevent the formation

of peroxides, interruption of the auto-oxidative chain reaction and reduction of localized O₂ concentrations^{22,23}.

This is the first study to evaluate the genotoxic and antigenotoxic effects of *A. campestris* extract using a micronucleus test to face damage induced by DXR. It is important to perform a complete investigation regarding the phytochemical compounds of the *A. campestris* extract to direct new studies related to its biological effects.

CONCLUSION

The results of this study demonstrate an evident antigenotoxic potential of the methanolic extract of *Amasonia campestris*, since there was reduction of micronuclei ranging from 56 to 57% in all the concentrations used. The genotoxic potential of methanolic *Amasonia campestris* extract was discarded since all the concentrations used had mean and standard deviation values close to that of the negative control group.

Thus, the methanolic extract of *Amasonia campestris* demonstrated antigenotoxic activity in Swiss mice and did not demonstrate genotoxic activity under the conditions used in this study. However, other phytochemical studies are suggested in order to have consistent data to explore its use in the pharmaceutical industry, in actions aimed at promoting human health and also in future prevention strategies in clinical treatments associated with Doxorubicin.

REFERENCES

1. Guimarães Júnior, BS. Avaliação pré-clínica da toxicidade aguda e atividade hipoglicemiante do extrato metanólico das raízes de *Amasonia campestris* Lamiaceae [dissertação]. Macapá: Universidade Federal do Amapá - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas; 2015.
2. Santos JS, França F, Silva MJ, Sales MF. Levantamento das espécies de *Amasonia* (Lamiaceae) para o Brasil. *Rodriguésia*, 2012; 63(4): 1101-16.
3. MacGregor JT, Heddle, JA, Hite M; Margolin BH, Ramel C, Salamone MF, Tice RR, Wild D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocyte. *Mutation Research*. 1987; 189(2): 103-12.
4. Patel N, Joseph C, Corcoran G, Ray SD. Silymarin modulates doxorubicin-induced oxidative stress, Bcl-xL and p53 expression while preventing apoptotic and necrotic cell death in the liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010; 2415(2): 143-52.
5. Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa C, Sanchez-Rovira P.; Ramirez-Tortosa MC. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48(6): 1425-38.
6. Costa EVM, Ramos GQ, Góes LDM, Santos CBR, Andrade Net, VF, Carvalho JCT. In vivo and in vitro evaluation of antiplasmodial activity of *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2017; 11(32): 377-84.
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Guia para Condução De Estudos Não Clínicos De Toxicologia E Segurança Farmacológica Necessários Ao Desenvolvimento De Medicamentos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2013.
8. Souza Brito ARM. Manual de Ensaio Toxicológicos in vivo. Campinas: Editora da Unicamp; 1995.
9. NEVES SMP. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação [Tese].

São Paulo: Universidade de São Paulo. 2013.

10. Franke SI, Prá D, da Silva J, Erdtmann B, Henriques JA. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells in vivo. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2005; 583(1): 75-84.
11. Venkatesh P, Shantala B, Jagetia GC, Rao KK, Baliga MS. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by Aegle marmelos in mouse bone marrow: a micronucleus study. *Integrative Cancer Therapies*. 2007; 6(1): 42-53.
12. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução nº90 de 16 de março de 2004. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. *Diário Oficial da União* 18 mar 2004.
13. Alves J M, Munaro CC, Monteiro Neto MAB, Furtado RA, Senedese JM, Bastos JK, Taveres DC. In vivo protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. *Journal of Applied Toxicology*. 2013; 33(8): 854-60.
14. Hayashi M, Sofuni T, Morita T. Simulation study of the effects of multiple treatments in the mouse bone marrow micronucleus test. *Mutation Research*. 1991; 252(3): 281-87.
15. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*. 2011; 8(1): 1-10.
16. Degáspari CH, Waszczynskyj N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão acadêmica*. 2004; 5(1): 33-40.
17. Amara-Mokrane YA, Lebucher-Michel M.P, Balansard G, Duménil G, Botta B. Protective effects of a-heredin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*. 1996. 11(2): 161-67.
18. Antunes LMG, Takahash CS. Effects of high dose of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. *Mutation Research*. 1998. 419(1-3): 137-43.
19. Antunes LMG, Bueno RBL, Dias FL, Bianchi MLP. Acetylsalicylic acid exhibits anticlastogenic effects on cultured human lymphocytes exposed to doxorubicin. *Mutation Research*. 2007; 626(1-2): 155-61.
20. Valadares BLB, Graf U, Spano MA. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 46(3): 1103-10.
21. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002. 18(10): 872-79.
22. Oroian M, Escriche I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*. 2015; 74: 10-36.
23. Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidante activity. *Journal of Functional Foods*. 2015; 18(Pt B): 757-81.

Avaliação das atividades genotóxica/antigenotóxica do extrato metanólico da *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke

Keren Hapuque da Silva Souza*
Alessandra Azevedo do Nascimento*
Edmara Caroline dos Santos Ribeiro**
Gleicyanne Furtado Frazao**
Natanael da Silva Brito**
Sabrina da Conceição Barbosa**
Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto*

Resumo

Amasonia campestris (Aubl.) Moldenke, pertencente à família Lamiaceae, encontrada nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. O chá da *A. campestris* é utilizado popularmente para o combate à malária, diabetes entre outras enfermidades. Seu nome popular é mendoca, rabo de arara, bambã de arara. Diante disso, o presente estudo avaliou o potencial genotóxico e antigenotóxico do extrato metanólico das raízes de *Amasonia campestris* em eritrócitos policromáticos de camundongos Swiss. Os animais foram tratados com diferentes concentrações da *Amasonia campestris* (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg p.c.) incluindo grupos de controle positivo (doxorubicina, DXR, 16 mg/kg p.c.), negativo (água) e solvente (Dimetilsulfóxido, DMSO). As concentrações foram administradas nos animais via gavagem assim como o controle negativo e solvente. O controle positivo foi administrado intraperitonealmente. Os animais receberam tratamento diariamente com as respectivas doses durante 15 dias para avaliação genotóxica, após isso foram coletadas amostras de sangue periférico caudal nas horas: 24 e 48h após a primeira gavagem, e nos dias 7 e 15. Para avaliação antigenotóxica no dia 14 os camundongos foram tratados com injeções intraperitoneal de DXR e foram coletadas amostras de sangue periférico caudal nas horas: 24 e 48h ao término dessa intervenção. Após os tratamentos, foi feita a contagem de 2 mil eritrócitos policromáticos por animal de cada grupo, para avaliação da frequência de Micronúcleos. Os resultados, demonstraram que os extratos metanólicos das raízes da *A. campestris* não eram genotóxicos, pois não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle Negativo. Os animais tratados com as diferentes concentrações do extrato da *Amasonia campestris* associados a DXR obtiveram uma redução de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados significativa quando comparada ao controle positivo. Em conclusão, o extrato metanólico das raízes de *Amasonia campestris* demonstrou atividade antigenotóxica e não comprovou atividade genotóxica nas condições utilizadas nesse trabalho.

Palavras-chave: Antigenotoxicidade. Eritrócitos Policromáticos. Genotoxicidade.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma grande biodiversidade, acompanhada de uma diversidade étnica e cultural que conserva um valioso conhecimento associado ao uso de plantas medicinais, tendo assim grande potencial para serem desenvolvidas pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas. Entre as plantas de uso popular para auxílio de tratamento de enfermidades como malária e

diabetes está a *Amasonia campestris*, algumas plantas associadas a esses tratamentos são consideradas tóxicas, e apesar de seu uso por parte da população, não existem estudos toxicológicos que garantam sua administração segura¹.

Santos, et al.², relata, que a família Lamiaceae onde a *A. campestris* está inserida é detentora de diversas atividades biológicas.

DOI: 10.15343/0104-7809.20194302390405

*Universidade Federal do Amapá – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – PPGCS/UNIFAP. Macapá/AP, Brasil

** Faculdade Estácio de Macapá Curso de Biomedicina. Macapá/ AP, Brasil
E-mail: hapuque83@gmail.com



Entre as bioatividades relatadas está a atividade antioxidante, a qual é atribuída a presença de compostos fenólicos, componentes produzidos pelos vegetais. Muitos compostos fitoquímicos com atividades antioxidantes têm mostrado efeitos satisfatórios durante a terapia com Doxorubicina^{3, 4, 5}.

Amasonia campestris é uma espécie frutífera, floresce e frutifica em todos os meses do ano, esta espécie habita no domínio amazônico em locais sombreados e bordas de florestas, em latossolos, e em ambientes savanoides, no cerrado, campo rupestre, e em áreas de transição entre caatinga e cerrado, próximo a córregos, sobre solos arenosos, pedregosos e areno-pedregosos, sendo encontrada nos estados do Amapá, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia e Goiás e países que fazem fronteiras com o Brasil como Venezuela, Guianas e Suriname; perene, de até um metro de altura e usada popularmente em forma de chá das raízes para auxiliar no tratamento da malária e do Diabetes. Pertence à família Lamiaceae, da qual 36 espécies já foram comprovadamente reconhecidas como detentoras de atividade hipoglicemiante^{6,1}.

Estudos sobre as avaliações genotóxica e antígenotóxica da espécie *Amasonia campestris* não são relatados na literatura científica, o que torna necessária a realização desta pesquisa em função do uso indiscriminado pela população e do cumprimento de etapas para registro de um provável fitoterápico a base deste vegetal junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária⁷. Com efeito, os testes farmacológicos e genotóxicos utilizando animais são considerados como etapa imprescindível da pesquisa de novos produtos destinados ao uso em humanos inclusive os medicamentos fitoterápicos⁸.

Uma vez que testes genotóxicos são uma condição para a segurança e viabilização de registro e comercialização de qualquer medicamento, esta pesquisa propôs avaliar as atividades genotóxica e antígenotóxica do extrato metanólico das raízes de *Amasonia campestris* em camundongos Swiss. Devido a esses fatores, o presente estudo levanta o seguinte problema: o extrato metanólico da planta possui ação genotóxica? Se não, possui atividade antígenotóxica?

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato metanólico das raízes da Amasonia campestris (Aubl.) Moldenke.

Para a avaliação das atividades genotóxica e antígenotóxica deste trabalho, foi selecionada, a planta *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke, que pertence à família Lamiaceae e ao gênero *Amasonia*. As raízes da planta foram coletadas no município de Macapá-AP no residencial Alphaville, com localização GPS: Lat. -0.041004" N' Long. -51. 111626" W, em um raio de 25 metros. A partir do espécime coletado foi preparada uma exsicata, a qual foi depositada no Herbário Amapaense - HAMAB do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá – IEPA.

Após esse processo, as raízes secaram a 40°C por 72 horas, em estufa de ar circulante, posteriormente, moídas em moinho de facas. O material botânico foi submetido a um processo de extração por maceração a frio em metanol na proporção de 1:5 durante 7 dias e homogeneizado com agitação periódica para facilitar a extração dos constituintes ativos da planta. A solução extrativa foi filtrada e posteriormente concentrada em evaporador rotativo a 45°C até total evaporação do solvente, resultando no extrato metanólico bruto da *Amasonia campestris*.

Posteriormente, o extrato passou por testes de solubilidade com alguns compostos conhecidos como solventes, sendo selecionado o Dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração de 1 mL para a realização do teste em questão.

Animais

Para a realização dos experimentos foram adquiridos 84 camundongos machos da linhagem Swiss com 6-7 semanas de vida e aproximadamente 25g de peso corpóreo (p.c), oriundos do Centro Multidisciplinar para Investigações Biológicas na Área da ciência de Animais de Laboratório-CEMIB da Universidade de Campinas- UNICAMP. Os camundongos

foram mantidos em caixas plásticas em uma sala experimental, sob condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C) e umidade ($50 \pm 10\%$), tiveram também 12 horas de ciclo claro-escuro, com acesso *ad libitum* a ração da marca Presence® e água filtrada.

Findado os experimentos todos os animais foram submetidos a eutanásia (nos moldes da Resolução Normativa N° 13, de 20 de setembro de 2013), e as carcaças resultantes descartadas conforme item 1.6 do Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório da FCF-IQ/USP de 2013.⁹

Agente Químico Indutor de Danos no DNA

O quimioterápico Doxorubicina (DXR, Rubidox®) foi utilizado como controle positivo, pois o mesmo induz a formação de micronúcleos em células do sangue. O indutor químico foi dissolvido em água destilada e administrado intraperitonealmente (0,3 mL/animal) na concentração de 16 mg/Kg peso corpóreo, (p.c.), estabelecida de acordo com a literatura Franke et al.,¹⁰ e Venkatesh et al.,¹¹.

Avaliação da atividade Genotóxica

Para avaliação genotóxica, os animais estiveram divididos em 7 grupos de tratamentos, definidos como: 4 grupos tratados com as diferentes concentrações do extrato metanólico da *Amasonia campestris*, 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg peso corpóreo (p.c), 1 grupo de controle positivo (Doxorubicina, DXR), 1 grupo de Controle negativo (Água) e 1 grupo solvente (Dimetilsufóxido). As concentrações foram administradas nos animais via gavagem (0.5 ml) assim como o controle negativo e solvente. Já o controle positivo foi administrado intraperitonealmente (0.3 ml).

Os grupos de animais receberam tratamento diário com as respectivas doses. Sendo realizadas coletas das amostras de sangue periférico caudal nas horas: 24 e 48h após a primeira gavagem, e nos dias 7 e 15. Ao todo, o experimento durou 15 dias.^{12,13}

Avaliação da atividade Antigenotóxica

Para avaliação da atividade antigenotóxica os camundongos foram divididos e tratados igualmente ao protocolo de genotoxicidade, porém no 14º dia os grupos que receberam as diferentes concentrações do extrato metanólico da *Amasonia campestris* (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg p.c) e o grupo solvente (DMSO+DXR) foram tratados com injeções intraperitoneal de DXR. As amostras de sangue periférico caudal foram coletadas nas seguintes horas: 24 e 48h após a intervenção.^{12,13}

O teste de micronúcleo

O teste do micronúcleo foi desenvolvido consonante ao protocolo descrito por Hayashy, et al.¹⁴, e alterações propostas por Alves et al.¹³. Decorridas 24 e 48 horas, 7 e 15 dias dos tratamentos, os animais sofreram um pequeno corte na extremidade da cauda, a fim de coletar uma gota de sangue para a realização do esfregaço em lâmina, o material foi seco em temperatura ambiente, e fixado em metanol por 5 minutos.

Transcorridas 24 horas, as lâminas foram coradas com solução de giemsa por 15 minutos, e lavadas em água corrente até a retirada do excesso de corante, secando em temperatura ambiente, submetendo-se, na sequência, a análises microscópicas.

Análise das lâminas

As lâminas de todos os animais foram codificadas e analisadas dentro de um curto espaço de tempo, em teste cego. Três observadores realizaram a análise, seguindo um sistema balanceado, ou seja, um mesmo número de células fora analisado em lâminas diferentes, por cada observador.

As lâminas foram, em primeiro lugar, analisadas ao microscópio em aumento médio de 40x para encontrar campos com boa qualidade técnica, onde as células se encontravam bem espalhadas, não danificadas e coradas apropriadamente. Após localizar esse campo, os observadores seguiram a análise das células para identificar a presença do micronúcleo, usando um aumento de 1000x (objetiva de imersão). As

Lâminas foram feitas em duplicata onde foram analisados 2.000 Eritrócitos Policromáticos por lâmina. Para calcular o Índice de Divisão Nuclear (IDN). Um total de 400 eritrócitos por lâmina foram analisados, utilizando a fórmula:

$$IDN = \frac{EPC}{EPC + ENC}$$

Onde:

EPC: número de Eritrócitos policromáticos, e
ENC: Número de Eritrócitos Normocromáticos.

Análise estatística

A análise estatística se realizou por análise

de variância para experimentos inteiramente aleatorizados (ANOVA), com cálculos da estatística F e de seu respectivo “p-value”.

Nos casos em que $p \leq 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Dunnett, com o cálculo da diferença mínima significativa $\alpha=0,05$, usando o programa Graph Pad Prism 7.

Aspectos éticos

Os protocolos de tratamento a serem realizados neste trabalho foram submetidos a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá- CEUA – UNIFAP, sendo aprovado com o número 012/2016.

RESULTADOS

Os resultados obtidos para os tratamentos de 24, 48h e 7,15 dias em camundongos Swiss com diferentes doses do extrato da *Amasonia campestris* e estes combinados a administração intraperitoneal de DXR na dosagem de 16 mg/

kg de p.c., e seus respectivos controles são mostrados na tabela 1. As doses administradas da *A. Campestris*, não demonstraram diferença estatisticamente significativa quando comparadas ao controle Negativo.

Tabela 1 – Frequência de Eritrócito Policromáticos Micronucleados (EPCMNs) em sangue periférico de camundongos Swiss machos, tratados com as diferentes concentrações de *A. Campestris* e seus respectivos controles após 24, 48 h, e 7 e 15 dias de tratamento.

TRATAMENTO (mg.kg ⁻¹ p.c.)	EPCMNs/1000 EPCs ^a			
	24h	48h	7 dias	15 dias
Controle Negativo	1,08 ± 0,79	1,08 ± 0,79	1,33 ± 0,77	1,17 ± 0,57
DMSO	0,917 ± 0,90	1,25 ± 0,86	1,25 ± 0,45	1,25 ± 0,45
<i>A. Campestris</i> 250 mg	1,25 ± 0,45	1,33 ± 0,49	1,08 ± 0,51	1,25 ± 0,75
<i>A. Campestris</i> 500 mg	1,17 ± 0,38	1,17 ± 0,38	1,17 ± 0,57	1,17 ± 0,38
<i>A. Campestris</i> 1000mg	1,25 ± 0,45	1,17 ± 0,38	1,09 ± 0,30	1,25 ± 0,45
<i>A. Campestris</i> 2000mg	1,33 ± 0,49	1,33 ± 0,49	1,25 ± 0,75	1,25 ± 0,45
DXR				24,7 ± 0,65*

^aDois mil PCEs quando analisado por animal, para o total de 12000 células por grupo; ^aValores de média ± desvio padrão; *Diferença estatisticamente significativa quando comparado com o controle Negativo (p value < 0,05); DXR: Doxorubicina, Controle Positivo; DMSO: Dimetilsulfóxido, Solvente.

Os resultados obtidos na frequência de Eritrócito Policromáticos Micronucleados (EPCMN) em sangue periférico de camundongos Swiss tratados com as diferentes concentrações do extrato metanólico da *Amasonia campestris* e seus respectivos controles são mostrados na tabela 2.

A administração simultânea de uma dose oral única por gavagem de cada concentração de extrato da *A. Campestris* associados com injeções de DXR resultou em uma redução significativa de micronúcleos, que variou

de 56% a 57% (Tabela 2), na frequência de EPCMN, quando comparado com o grupo tratado apenas com DXR. O aumento gradual das concentrações do extrato da *A. Campestris* não resultou uma relação dose-dependente.

A frequência de EPCMN foi menor em animais tratados com DMSO + DXR do que nos tratados apenas com DXR, mas essas diferenças não foram estatisticamente significantes. O IDN não apontou qualquer indicio de potencial citotóxico em todos os grupos avaliados (Tabela 3 e 4).

Tabela 2 – Frequência de Eritrócito Policromáticos Micronucleados (EPCMN) em sangue periférico de camundongos Swiss machos tratados com as diferentes concentrações *A. campestris* e seus respectivos controles após 24, 48 horas dos tratamentos.

TRATAMENTO (mg.kg ⁻¹ p.c.)	MNPCEs/1000 PCEs ^{a,b}		REDUÇÃO %	
	24h	48h	24h	48h
Controle Negativo	1,08 ± 0,79	1,08 ± 0,79	-	-
DMSO + DXR	22,8 ± 0,71 ^c	24,2 ± 1,03	-	-
<i>A. Campestris</i> 250 mg + DXR	10,7 ± 0,65 ^{c,d}	10,8 ± 0,86 ^{c,d}	57%	57%
<i>A. Campestris</i> 500 mg + DXR	10,7 ± 0,88 ^{c,d}	10,6 ± 0,79 ^{c,d}	57%	57%
<i>A. Campestris</i> 1000 mg + DXR	10,8 ± 0,96 ^{c,d}	10,8 ± 0,86 ^{c,d}	56%	56%
<i>A. Campestris</i> 2000 mg + DXR	10,9 ± 0,9 ^{c,d}	10,8 ± 0,83 ^{c,d}	56%	56%
DXR	23,2 ± 1,19 ^c	24,5 ± 0,90 ^c	-	-

^aValores de média ± desvio padrão; ^bDois mil PCEs quando analisado por animal, para o total de 12000 células por grupo; ^cDiferença estatisticamente significativa do grupo Controle Positivo (p value < 0,05); ^dDiferença estatisticamente significativa do grupo DXR (p value < 0,05); DXR: Controle Positivo; DMSO: Dimetilsulfóxido Dimetilfulfóxido, Solvente.

Tabela 3 – Índice de Divisão Nuclear (IDN) em sangue periférico de camundongos Swiss tratados com as diferentes concentrações *A. campestris* e seus respectivos controles após 24, 48 h, 7 e 15 dias dos tratamentos.

CONCENTRAÇÃO mg/kg p.c	24h ^a	48h ^a	7 DIAS ^a	15 DIAS ^a
Controle Negativo	5.33 ± 0.52	5.33 ± 0.52	5.33 ± 0.52	5.33 ± 0.52
DMSO	6.33 ± 0.82	6.17 ± 0.98	7.17 ± 1.17	7.67 ± 0.52
DXR				16.83 ± 0.98
<i>A. Campestris</i> 250 mg	5.50 ± 0.55	6.50 ± 0.55	6.83 ± 1.17	7.50 ± 0.55
<i>A. Campestris</i> 500 mg	5.50 ± 0.55	6.33 ± 0.52	6.83 ± 1.17	7.50 ± 1.22
<i>A. Campestris</i> 1000mg	5.17 ± 0.75	5.33 ± 0.52	6.83 ± 0.52	7.17 ± 0.75
<i>A. Campestris</i> 2000mg	4.83 ± 0.75	5.33 ± 0.52	6.83 ± 0.82	7.17 ± 0.41

DXR: Doxorubicina, Controle Positivo; DMSO: Dimetilsulfóxido, Solvente.
a 400 células

Tabela 4 – Índice de Divisão Nuclear (IDN) em sangue periférico de camundongos Swiss tratados com as diferentes concentrações *A. campestris* associada a DXR e seus respectivos controles após 24 e 48h, dos tratamentos.

CONCENTRAÇÃO mg/kg p.c	24h ^a	48h ^a
Controle Negativo	5.33 ± 0.52	5.33 ± 0.52
DXR	15.33 ± 0.52	17.17 ± 0.75
DMSO+ DXR	13.83 ± 0.98	14.00 ± 0.89
<i>A. Campestris</i> 250 mg + DXR	10.67 ± 1.03	11.00 ± 0.89
<i>A. Campestris</i> 500 mg + DXR	10.67 ± 1.03	10.67 ± 0.82
<i>A. Campestris</i> 1000 mg + DXR	10.00 ± 0.00	10.83 ± 0.75
<i>A. Campestris</i> 2000 mg + DXR	4.83 ± 0.00	10.83 ± 0.75

DXR: Doxorubicina, Controle Positivo; DMSO: Dimetilfulfóxido, Solvente.

^a 400 células

DISCUSSÃO

Segundo Sasidharan *et al.*¹² estudos químicos de plantas medicinais para a identificação de compostos secundários são de grande relevância para pesquisa de bioatividades.

Um estudo fitoquímico preliminar realizado por Costa *et al.*⁶, demonstrou a presença de diversos compostos químicos no extrato das raízes de *Amasonia campestris*, como: ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis e taninos, alcalóides, purinas, esteróides e triterpenos, antocianinas, depsídeos e depsídonas. Com relação aos compostos fenólicos, os resultados foram negativos para flavonoides nesse estudo, porém, positivos para fenóis, taninos e antocianinas.

Os compostos fenólicos são substâncias largamente disseminadas na Natureza, mais de 8000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas. Esse grupo faz parte dos constituintes de vários vegetais, frutas e produtos industrializados. Esses compostos agem como antioxidantes, pois possuem a habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas além disso possuem radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, em especial os lipídios¹⁵.

O estudo de Costa, *et al.*⁶, ainda é preliminar, porém temos uma sugestiva que corrobora com o achado nesse trabalho, pois a administração

das concentrações (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg p.c) do extrato da *A. campestris*, com administração intraperitoneal de DXR resultou numa redução significativa de 56% a 57%, para os tratamentos de 24h e para os de 48h na frequência de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (EPCMN) quando comparado com o grupo tratado apenas com DXR. Por conseguinte, as concentrações administradas do extrato de *A. Campestris* não obtiveram aumento proporcional na redução da atividade genotóxica no período de 24h e 48h, inferindo assim, ausência em relação a dose-dependente, isso se deve possivelmente pela presença de compostos fenólicos presentes nas raízes da planta.

Estudos quanto a diminuição do efeito mutagênico da DXR, em células não tumorais, têm sido alvos de pesquisas experimentais em tratamentos combinados de DXR com substâncias antioxidantes, as quais são capazes de neutralizar a ação danosa dos radicais livres que são gerados^{16,17,18,19,20}.

Os radicais livres são moléculas instáveis e reativas, que possuem um elétron não emparelhado em seu orbital. A produção contínua dos radicais livres faz parte da função celular normal sendo essencial à saúde em diversas atividades biológicas. O equilíbrio dos

radicais livres se dá por meio da produção e remoção realizado por mecanismos de defesa do organismo. Na ocorrência de um desequilíbrio causado pela produção exagerada de radicais livres por fatores endógenos ou exógenos ocorre estresse oxidativo, o qual é responsável pelo aparecimento de diversas doenças^{20,21}.

Para que ocorra uma proteção aos radicais livres a ingestão de antioxidantes na dieta é essencial. Uma substância antioxidante pode modificar os ciclos oxidativos inibindo ou retardando os danos podendo interagir com os radicais livres utilizando diversos mecanismos

como: a eliminação de espécies que iniciam a peroxidação, interação com O₂ para a prevenção da formação de peróxidos, interrupção da reação em cadeia auto-oxidativa, e redução de concentrações de O₂ localizadas^{22,23}.

Este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos genotóxicos e antigenotóxicos do extrato de *A. campestris* usando o teste do micronúcleo frente aos danos induzidos pela DXR. Ressalta-se a importância de uma investigação completa quanto aos compostos fitoquímicos do extrato de *A. campestris*, para direcionar novos estudos relacionados aos seus efeitos biológicos.

CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa demonstram evidente potencial antigenotóxico do extrato metanólico da *Amasonia campestris*, pois houve redução de micronúcleos variando de 56 a 57% em todas as concentrações utilizadas. Já o potencial genotóxico extrato metanólico da *Amasonia campestris* foi descartado, pois todas as concentrações utilizadas tiveram valores de média e desvio padrão próximos ao do grupo de controle negativo.

Desta forma, o extrato metanólico da

Amasonia campestris demonstrou atividade antigenotóxica em camundongos Swiss e não demonstrou atividade genotóxica nas condições utilizadas nesse trabalho. No entanto, sugere-se a realização de outros estudos fitoquímicos, para que se tenham dados consistentes para explorar o seu uso na indústria farmacêutica e em ações voltadas para a promoção da saúde humana e também em futuras estratégias de prevenção em tratamentos clínicos em associação com a Doxorubicina.

REFERÊNCIAS

1. Guimarães Júnior, BS. Avaliação pré-clínica da toxicidade aguda e atividade hipoglicemiante do extrato metanólico das raízes de *Amasonia campestris* Lamiaceae [dissertação]. Macapá: Universidade Federal do Amapá - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas; 2015.
2. Santos JS, França F, Silva MJ, Sales MF. Levantamento das espécies de *Amasonia* (Lamiaceae) para o Brasil. *Rodriguésia*, 2012; 63(4): 1101-16.
3. MacGregor JT, Heddle, JA, Hite M; Margolin BH, Ramel C, Salamone MF, Tice RR, Wild D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocyte. *Mutation Research*. 1987; 189(2): 103-12.
4. Patel N, Joseph C, Corcoran G, Ray SD. Silymarin modulates doxorubicin-induced oxidative stress, Bcl-xL and p53 expression while preventing apoptotic and necrotic cell death in the liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010; 2415(2): 143-52.
5. Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa C, Sanchez-Rovira P.; Ramirez-Tortosa MC. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 48(6): 1425-38.
6. Costa EVM, Ramos GQ, Góes LDM, Santos CBR, Andrade Net, VF, Carvalho JCT. In vivo and in vitro evaluation of antiplasmodial activity of *Amasonia campestris* (Aubl.) Moldenke. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2017; 11(32): 377-84.
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Guia para Condução De Estudos Não Clínicos De Toxicologia E Segurança Farmacológica Necessários Ao Desenvolvimento De Medicamentos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2013.
8. Souza Brito ARM. Manual de Ensaios Toxicológicos in vivo. Campinas: Editora da Unicamp; 1995.
9. NEVES SMP. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo. 2013.
10. Franke SI, Prá D, da Silva J, Erdtmann B, Henriques JA. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells in vivo. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2005; 583(1): 75-84.
11. Venkatesh P, Shantala B, Jagetia GC, Rao KK, Baliga MS. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by *Aegle marmelos* in mouse bone marrow: a micronucleus study. *Integrative Cancer Therapies*. 2007; 6(1): 42-53.

12. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução nº90 de 16 de março de 2004. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Diário Oficial da União 18 mar 2004.
13. Alves J M, Munaro CC, Monteiro Neto MAB, Furtado RA, Senedese JM, Bastos JK, Taveres DC. In vivo protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. *Journal of Applied Toxicology*. 2013; 33(8): 854-60.
14. Hayashi M, Sofuni T, Morita T. Simulation study of the effects of multiple treatments in the mouse bone marrow micronucleus test. *Mutation Research*. 1991; 252(3): 281-87.
15. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*. 2011; 8(1): 1-10.
16. Degáspari CH, Waszczynskyj N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão acadêmica*. 2004; 5(1): 33-40.
17. Amara-Mokrane YA, Lebucher-Michel M.P, Balansard G, Duménil G, Botta B, Protective effects of -heredin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis*. 1996. 11(2): 161-67.
18. Antunes LMG, Takahash CS. Effects of high dose of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. *Mutation Research*. 1998. 419(1-3): 137-43.
19. Antunes LMG, Bueno RBL, Dias FL, Bianchi MLP. Acetylsalicylic acid exhibits anticlastogenic effects on cultured human lymphocytes exposed to doxorubicin. *Mutation Research*. 2007; 626(1-2): 155-61.
20. Valadares BLB, Graf U, Spano MA. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 46(3): 1103-10.
21. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002. 18(10): 872-79.
22. Oroian M, Escriche I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*. 2015; 74: 10-36.
23. Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidante activity. *Journal of Functional Foods*. 2015; 18(Pt B): 757-81.