

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Genética e Bioquímica

Pós-Graduação em Genética e Bioquímica



**Efeito protetor do chá verde (*Camellia sinensis*)
contra a ação genotóxica da doxorrubicina em
células somáticas de *Drosophila melanogaster***

Bethânia Cristhine de Araújo

UBERLÂNDIA – MG

2008

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Genética e Bioquímica

Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Efeito protetor do chá verde (*Camellia sinensis*) contra a
ação genotóxica da doxorrubicina em células somáticas de
*Drosophila melanogaster***

Aluna: Bethânia Cristhine de Araújo

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título de Mestre
em Genética e Bioquímica (Área Genética)**

UBERLÂNDIA – MG

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- A663e Araújo, Bethânia Cristhine de, 1981
 Efeito protetor do chá verde (*Camellia sinensis*) contra a ação genotóxica da doxorubicina, em células somáticas de *Drosophila melanogaster* / Bethânia Cristhine de Araújo. - 2008.
- 79 f. : il.
- Orientador: Júlio César Nepomuceno.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Plantas medicinais - Teses. 2. *Drosophila melanogaster* - Teses.
3. Chá verde - Teses. I. Nepomuceno, Júlio César. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 633.88

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Genética e Bioquímica

Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Efeito protetor do chá verde (*Camellia sinensis*) contra a
ação genotóxica da doxorubicina em células somáticas de
*Drosophila melanogaster***

Aluna: Bethânia Cristhine de Araújo

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Examinadores: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Prof. Dr. Maurício Lehmann

Data da defesa:

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas.

Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

Dedico este trabalho aos meus pais **João Batista** e **Silvia Severo**, por me darem à possibilidade de sonhar coisas impossíveis e de caminhar livremente em direção aos meus sonhos e porque estiveram prontos, em todos os momentos, a compartilhar os desafios e alegrias da minha existência.

Agradecimentos Especiais

A **Deus** por ter me concedido serenidade para aceitar as coisas que não posso modificar, coragem para modificar aquelas que posso, e sabedoria para distinguir umas das outras.

Ao meu querido pai, **João Batista de Araújo** pela alegria de viver que demonstra e por me ensinar que a luta, o reconhecimento e o descanso são a metade do caminho rumo às vitórias da vida, você é meu maior exemplo papai; e à minha mãe **Silvia Severo de Araújo**, pela dedicação, os preciosos conselhos e por todo o apoio sempre em todos os sentidos... Obrigada porque nunca se cansaram de me mostrar o verdadeiro sentido da vida, do amor e da humildade. As portas que me foram abertas e cada conquista minha, com certeza são vitórias suas.

Ao meu irmão **João Paulo Severo de Araújo**, por tudo que faz de nós muito mais do que dois seres humanos, nos faz amigos e irmãos que se amam, me ensinou que devo aprender a respeitar seu jeito de ser, porque conheço o seu respeito por mim.

Ao meu amor **Sérgio Soares da Costa** pela inspiração, confiança, por me amar e porque sempre me incentivou a caminhar... por isso o sucesso deste momento tem muito de ti. Compreendeste minhas ausências, quando os estudos me roubaram tua companhia e em teu ombro muitas vezes derramei meus lamentos, acreditou em meus sonhos nos momentos em que eu mais precisei. Você é tudo de bom em minha vida.

A **Cristina das Dores Dias e Karyna Maria de Mello Locatelli** minhas amigas, companheiras e confidentes. Com vocês aprendi que amigos estão sempre com as mãos estendidas. Tentam e fazem, cedem sem esperar retorno, e sabem que o ato de compartilhar tantos momentos reforça ainda mais os conhecimentos que buscamos juntas... vocês são muito especiais.

As minhas primas **Dhébora Sayonara de Moraes Severo, Iris Rodrigues de Araújo, Juliane Rodrigues de Araújo e Marícia Rocha de Araújo** que sempre entenderam meu desejo de voar, por compreenderem os acontecimentos que me deixaram tantas vezes distante, pelo apoio, pelas risadas e especialmente pela companhia em muitos momentos desta minha caminhada.

Ao meu avô **Severo Alves** e ao tio **Wilson Alves** que sempre me apoiaram nesta minha caminhada longe de casa, sendo parte da minha família presente, pelo incentivo e admiração em meus estudos.

Aos meus **familiares** que mesmo à distância reconhecem meu desejo de ser melhor como pessoa e como profissional, pelos sentimentos que nos unem e por todas as alegrias e dificuldades que já vivemos juntos.

Ao casal **Helena Costa e Jânio Silva** e aos seus filhos, meus “pimpolhos”, **Gustavo Costa** e **Yuri Costa** por me dedicarem tanto carinho e pelo incentivo constante, além da amizade creio que novos laços nos unem agora.

Aos **professores** do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia que me mostraram que os verdadeiros mestres são aqueles que utilizam o Dom de ensinar para passar conhecimento a seus discípulos. Obrigada por terem me ensinado lições e conhecimentos que carregarei por toda vida.

Agradecimentos

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno**, por acreditar nas minhas competências e respeitar minhas fragilidades, pela amizade, oportunidades e pela orientação sempre competente na realização deste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora, **Prof. Dr. Mário Antônio Spanó** da Universidade Federal de Uberlândia e **Prof. Dr. Maurício Lehmann** da Universidade Luterana do Brasil, pela atenção com que leram este trabalho e pelas valiosas sugestões.

Ao **Prof. Dr. Ulrich Graf** do Instituto de Toxicologia da Universidade de Zurich, Suíça, pelo fornecimento das linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pelo convívio, estímulo e pela troca de experiências, em especial a **Alexandre Azenha Alves de Rezende, Elaine Silvia Dutra, Fabrício Freitas, Juliana Luzia França, Mariana Vaini de Freitas, Rafael Pena, Rita de Cássia Mascarenhas, Robson de Oliveira Júnior e Wender Ferreira Costa**.

Aos colegas do laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM): **Antônio Joaquim de Souza Castro, Geovanne D'Alfonso Júnior, Jeyson Césary Lopes, Marina Ferreira Lopes, Morgana Maria Fonseca Porto, Rosiane Soares Saturnino e Priscila Capellari Orsolin** pelo apoio, amizade e colaboração, e em especial à **Nayane Moreira Machado**, sem a sua ternura, disponibilidade e dedicação a execução experimental deste trabalho não teria sido possível.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)** que durante a realização do Curso de Mestrado me forneceu uma Bolsa de Estudos.

A **todos** que contribuíram direta ou indiretamente para a conquista de mais essa vitória, e que não foram citados.

Obrigada por me mostrarem que ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que não tenha nada a ensinar.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM – Patos de Minas, MG.

Recebemos o apoio financeiro dos seguintes órgãos:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
- Universidade Federal de Uberlândia – UFU
- Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM

Sumário Geral

	Página
Apresentação	01
Capítulo I	
1 Fundamentação Teórica	03
1.1 Danos oxidativos	03
1.2 Sistema de defesa antioxidante	05
1.2.1 Compostos fenólicos	08
1.2.1.1 Flavonóides	10
1.3 Chá verde (<i>Camellia sinensis</i>)	13
1.4 Doxorubicina	20
1.5 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática em células de <i>Drosophila melanogaster</i> - Somatic Mutation And Recombination Test (SMART)	24
1.5.1 Linhagens mutantes de <i>Drosophila melanogaster</i>	25
1.5.2 Cruzamentos	26
2 Referências Bibliográficas	30
Capítulo II	
Resumo	45
Abstract	46
Introdução.....	47
Material e Métodos	49
Compostos químicos	49
Preparação do extrato	49
Teste para detecção de Mutação e Recombinação (SMART) em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	49
Preparação e análise microscópica das asas	50
Análise estatística	50
Resultados e Discussão	51
Referências Bibliográficas	60

Lista de Tabelas

Página

Tabela I	Freqüência de manchas observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) de <i>Drosophila melanogaster</i> dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB), tratados com chá verde (CV) em três diferentes concentrações.....	57
Tabela II.	Freqüência de manchas observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de <i>Drosophila melanogaster</i> do cruzamento padrão (ST) e de alta bioativação metabólica (HB), tratados com chá verde (CV) em três diferentes concentrações e associadas a DXR (0,125 mg/mL).....	58

Lista de Figuras

Capítulo I

	Página
Figura 1. Estrutura básica dos flavonóides	11
Figura 2 Aspecto geral da planta <i>Camellia sinensis</i>	14
Figura 3 Estrutura química dos flavanóis presentes no chá verde	16
Figura 4 Fórmula estrutural da doxorubicina	21
Figura 5 <i>Drosophila melanogaster</i> , à esquerda o macho apresentando o pente sexual (pontos escuros nas patas anteriores, indicados pelas setas) e à direita a fêmea	24
Figura 6 Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz (aumento de 400X), com apresentação de pêlos múltiplos - <i>mwh</i> (seta maior), de pêlos <i>flare</i> (seta média) e de pêlos normais (seta menor)	26
Figura 7 Esquema representativo dos Cruzamentos no teste SMART (A) Cruzamento Padrão (ST) utilizando fêmeas virgens <i>flr³/TM3</i> , cruzadas com machos <i>mwh/mwh</i> e (B) Cruzamento de Alta Capacidade de Bioativação (HB) cruzando fêmeas virgens <i>ORR</i> e machos <i>mwh/mwh</i>	27
Figura 8 Fenótipo das asas dos descendentes de <i>D. melanogaster</i> (A) trans-heterozigotos marcados - MH (<i>mwh +/+ flr³</i>); (B) heterozigotos balanceados – BH (<i>mwh +/ TM3, Bds</i>)	28

Capítulo II

	Página
Figura 1. Porcentagem de mutação e recombinação gênica nos descendentes ST, tratados com DXR (0,125mg/mL), isoladamente e associada a diferentes concentrações de CV.....	54
Figura 2. Porcentagem de mutação e recombinação gênica nos descendentes HB, tratados com DXR (0,125mg/mL), isoladamente e associada a diferentes concentrações de CV	54

Lista de Abreviaturas

$^1\text{O}_2$ - oxigênio singlete
BH – heterozigoto balanceado
C - catequina
CAT - catalase
CV – chá verde
DDT - para-diclorodifeniltricloroetano
DNA – ácido desoxirribonucleico
DXR – doxorubicina
EC - epicatequina
ECG - epicatequina galato
EGC - epigallocatequina
EGCG - epigallocatequina galato
ERO – espécies reativas de oxigênio
flr – *flare*
GC - galocatequina
GPX - glutathione peroxidase
 H_2O_2 - peróxido de hidrogênio
HOCl – ácido hipocloroso
HOO - radical hidroperoxila
MH – trans-heterozigoto marcado
mL - mililitro
mwh – *multiple wing hairs*
NO – óxido nítrico
 O_2^- - ânion superóxido
 O_2 – oxigênio
OH – radical hidroxila
ORR – oregon R
RNA – ácido ribonucleico
ROH - alcóxil
ROOH - peróxil
SMART – *Somatic Mutation And Recombination Test*
SOD - superóxido dismutase
ST – *Standard Cross*
TM3 Bd^s – *Third Multiple3 Beaded Serrate*
UFU – Universidade Federal de Uberlândia

Apresentação

A *Camellia sinensis* é uma planta da família *Theaceae*, da qual se obtém os três principais tipos de chás: o verde (japonês e chinês), o preto (indiano) e o oolong (chá preto chinês). Esta bebida largamente consumida é referida na literatura como uma das melhores fontes de compostos fenólicos, o que lhe confere uma boa alternativa de antioxidantes naturais.

O chá verde (CV) é preparado de forma a prevenir a fermentação (oxidação) das folhas e, por esta razão, promove a inativação de enzimas catalíticas e permite a manutenção de seus constituintes, em suas estruturas básicas.

O CV é rico em compostos polifenólicos como a catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina e epicatequina galato, flavonóides responsáveis por controlar e prevenir algumas doenças, além de outros componentes, como a vitamina K, cafeína, pigmentos, carboidratos, e aminoácidos.

Durante séculos o CV é considerado uma bebida saudável. Depois da água, é a bebida não alcoólica mais consumida no mundo. Existem, no entanto, muitas pretensões exageradas quanto aos seus benefícios para a saúde, mas resultados de intensas pesquisas confirmam alguns atributos benéficos que o consumo regular do CV pode oferecer.

Hoje, o CV é considerado um alimento funcional que fornece benefícios fisiológicos, graças a seus componentes ativos que exercem importante atividade antioxidante, o que retarda o processo de envelhecimento, assim como, auxilia na prevenção de doenças crônicas e degenerativas como o câncer e doenças cardiovasculares.

A atuação do CV é extremamente importante na intercepção dos radicais livres que ocasionam danos na molécula de DNA e às membranas celulares. A atividade antioxidante das catequinas, presentes neste chá, pode prevenir a citotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo em diferentes tecidos.

Os efeitos positivos do consumo do CV também foram descobertos em estudos epidemiológicos que revelaram a forte ligação do chá na redução do risco de câncer em geral.

Considerando que as pesquisas revelam atributos benéficos do CV para a saúde humana, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos iniciou um plano para a utilização do CV como quimiopreventivo do câncer, naquele país.

Contudo, dados epidemiológicos sugerem que a associação entre o consumo regular de CV e a redução do risco do aparecimento de doenças é conflitante e equivocada. Os efeitos fisiológicos do chá ou das catequinas do chá no estresse oxidativo, parecem ser proeminentes em modelos animais, porém acredita-se que a absorção das catequinas *in vivo* atinja baixas concentrações plasmáticas e não atue de modo eficiente.

Enfim, várias investigações relacionadas ao consumo do CV sugerem que este apresenta diversos efeitos benéficos sobre a saúde humana. Entretanto, ainda há controvérsias, por isso, são necessárias mais pesquisas para elucidar as propriedades e os mecanismos de ação desta bebida apreciada pelo mundo inteiro.

Diante disso, este trabalho possui como objetivo investigar e avaliar a possível ação antígeno-tóxica do chá verde (*Camellia sinensis*), nas concentrações 25; 50 e 75mg/mL, contra a ação genotóxica da doxorubicina (0,125mg/mL), geradora de radicais livres, usando o teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em asa de *Drosophila melanogaster*.

Este trabalho será apresentado sob a forma de capítulos. No Capítulo I são abordados assuntos como a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e os sistemas de defesa antioxidantes. O chá verde (CV) possui papel central neste trabalho, por isso é descrito com detalhes: definições, conceitos, aplicações, benefícios do uso desta planta e pesquisas serão, portanto, destacadas neste capítulo. O teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster* também é elucidado, sendo explicados todos os componentes que envolvem o uso deste teste para a investigação dos efeitos do chá verde em organismos experimentais.

O Capítulo II consiste do manuscrito intitulado “Protective effects of green tea (*Camellia sinensis*) against genotoxic action of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*”, que deverá ser enviado para publicação na Revista Genetics and Molecular Biology, publicada pela Sociedade Brasileira de Genética.

Capítulo I

1 - Fundamentação Teórica

1.1 – Danos oxidativos

A maioria dos organismos vivos dispõe de um processo aeróbio para obtenção de energia, a respiração. Este processo possibilita o aproveitamento máximo das moléculas alimentares energéticas, ocorre por meio de sistemas enzimáticos, que se encontram aderidos às membranas internas das mitocôndrias, sendo denominado cadeia respiratória ou cadeia transportadora de elétrons (Kuss, 2005).

A respiração gera uma sequência oxidativa e produz como intermediários o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroperoxila ($HOO^{\cdot}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), compostos que podem se tornar subprodutos e que apresentam reatividade química superior à do oxigênio molecular (Wilhelm Filho; Silva e Boveris, 2001).

O ânion superóxido, o radical hidroperoxila, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, além dos compostos que não fazem parte da cadeia respiratória, como o oxigênio singlete ($^1O_2$), o óxido nítrico (NO), alcóxil (ROH) e peróxil (ROOH), recebem a denominação espécies reativas de oxigênio (ERO), termo preferencialmente usado por incluir todas essas espécies, radicalares ou não, que contém oxigênio (Picada et al., 2003).

O termo radical livre, geralmente utilizado, designa uma espécie química (átomo ou molécula) que possui um elétron desemparelhado no seu orbital de valência (número ímpar de elétron). Esta situação confere ao radical uma alta reatividade química, especialmente como agente oxidante (Picada et al., 2003).

As ERO são produzidas normalmente nos seres vivos como consequência de diversos processos metabólicos, que envolvem reações de transferência de elétrons, ou seja, são subprodutos do metabolismo da mitocôndria, do citocromo P450 e da ativação de células inflamatórias. Também

podem ser formadas devido à ação química e física de agentes como radiação gama, UVA e H_2O_2 (Shami e Moreira, 2004).

A produção de ERO pode ser incrementada por fatores genéticos e/ou ambientais. Entre os fatores ambientais, também denominados exógenos, encontram-se o fumo, a poluição atmosférica, os componentes e o tipo de dieta, medicamentos, radiação ionizante e não-ionizante. Quanto aos fatores endógenos, destaca-se que os radicais livres são capazes de lesar componentes celulares, inclusive o DNA, modificando sua estrutura e função (Saffari e Sadrzadeh, 2004).

Além disso, a produção de ERO está relacionada com o desencadeamento de doenças neurodegenerativas (Barja, 2004), cataratas, diabetes, inflamações crônicas, doenças auto-imunes, isquemia, artrite reumatóide e doença intestinal inflamatória (Halliwell e Gutteridge, 1999), além de envelhecimento acelerado, câncer e doenças cardiovasculares (Calabrese et al., 2007).

Os danos que as ERO podem causar aos organismos vivos podem ser classificados em cinco categorias: 1) citotoxicidade ou morte celular; 2) mutagênese, devido aos danos em ácidos nucléicos ou às suas enzimas; 3) estresse mecânico endotelial que pode ocasionar aterosclerose; 4) inativação de antiproteases e 5) desagregação de polissacarídeos nos tecidos, que gera processos degenerativos (Moraes-de-Souza, 2007).

Durante o metabolismo basal das células aeróbicas normais, existe uma produção constante de ERO, acompanhada pela contínua inativação destas formas reativas pelos sistemas antioxidantes, que conseguem manter as concentrações de ERO em níveis compatíveis com as funções celulares (controle transcricional). Quando há uma produção excessiva de ERO, maior do que a sua velocidade de remoção pelos sistemas de defesa antioxidante, ocorre um balanço a favor das espécies reativas de oxigênio, favorecendo uma situação denominada estresse oxidativo (Picada et al., 2003).

Um dos principais riscos das ERO é a sua citotoxicidade, resultante da oxidação lipídica das membranas celulares (Choe e Min, 2006). As membranas plasmáticas e os sistemas de membranas, como o retículo sarcoplasmático e a membrana mitocondrial, são alvos potenciais dos radicais livres. A peroxidação de

lipídeos das membranas pode levar à perda de sua organização em bicamada lipídica, alterando suas propriedades estruturais e funcionais, tal como a permeabilidade seletiva (Xu et al., 1997).

Além da peroxidação de lipídeos outros danos oxidativos, que valem ressaltar, são a oxidação de proteínas e a oxidação de ácidos nucleicos. A ação danosa dos radicais livres pode provocar alterações importantes nas moléculas protéicas, como a modificação de aminoácidos, a formação de compostos carbonilados e a desnaturação (Song et al., 2002), isso pode causar mudanças conformacionais que resultam na perda da capacidade funcional das proteínas.

A produção de danos oxidativos em ácidos nucleicos é atribuída a mecanismos diversos como: a ação da radiação ionizante diretamente ou por meio de radicais hidroxila, a atuação de espécies reativas formadas por reações envolvendo metais de transição e a ação oxidativa de produtos da própria peroxidação lipídica (Lim et al., 2004).

Porém, a ocorrência de um estresse oxidativo freqüentemente é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes. A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos leva ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar e impedir a indução de danos (Sies, 1993).

1.2 – Sistema de defesa antioxidante

Os sistemas biológicos são protegidos dos danos provocados por espécies reativas de oxigênio através de basicamente três etapas: 1) prevenção: proteção contra a formação de ERO; 2) interceptação: através de sistemas antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos, que interceptam as ERO e impedem a continuação das reações em cadeia e, 3) reparo: sistemas que atuam quando há ocorrência de algum dano (Picada et al., 2003).

O conceito de antioxidante foi definido por Sies e Stahl (1995), como: “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada à do substrato oxidável, atrasa ou inibe significativamente a oxidação deste substrato de maneira eficaz”, ou seja, são compostos que atuam inibindo e/ou

diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos oxidantes (Soares, Andreazza e Salvador, 2005).

Os antioxidantes podem ser divididos em naturais, normalmente presentes no organismo; compostos sintéticos com atividade antioxidante e, ainda, segundo Picada e colaboradores (2003), de acordo com seu mecanismo de ação em: a) enzimas antioxidantes; b) antioxidantes preventivos; c) antioxidantes seqüestradores e estabilizadores; e d) outros antioxidantes.

O sistema de defesa antioxidante é constituído por mecanismos bioquímicos de inativação das ERO, que podem ser endógenos (antioxidantes enzimáticos) como o sistema formado pela superóxido-dismutase (SOD), glutathione-peroxidase (GPX) e catalase (CAT), as quais catalisam a redução dos oxidantes primariamente no meio intracelular; ou exógenos (antioxidantes não-enzimáticos) que são compostos provenientes exclusivamente da dieta ou de suplementação (Moraes-de-Souza, 2007).

No sistema enzimático as SOD, metalo-enzimas abundantes em células aeróbicas, agem sobre o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), dismutando-o a H_2O_2 (Picada et al., 2003). A GPX inativa os peróxidos lipídicos e de hidrogênio, sendo na mitocôndria de mamíferos a principal defesa contra o H_2O_2 . A CAT é uma ferro-hemoenzima, presente nos peroxissomas e também atua inativando o peróxido de hidrogênio (Ames; Shigenaga e Hagen, 1993).

No entanto, esses mecanismos de defesa contra as ERO, no organismo humano, podem ser insuficientes e os danos causados podem se tornar cumulativos e resultar em estresse oxidativo. Desta forma, em adição aos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, a inclusão de antioxidantes na dieta (vitaminas, compostos fenólicos, glutathione e outros) é importante, pois estes aumentam a capacidade de inativar estas espécies instáveis e diminuem o risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres (Lee; Koo e Min, 2004).

As vitaminas antioxidantes têm papel importante na prevenção de doenças. A vitamina E é um antioxidante com papel na peroxidação de lipídeos e além dessa, estudos sugerem que as vitaminas C e o beta-caroteno impedem que ocorra um aumento das lesões no DNA, demonstrando que estas possuem um potencial efeito na estabilidade genômica dos seres vivos (Nepomuceno, 2005).

Assim, as vitaminas A, C, E, e os carotenóides são substâncias muito estudadas como agentes quimiopreventivos, funcionando como antioxidantes nos sistemas biológicos (Costa e Nepomuceno, 2006), pois, acredita-se que os nutrientes antioxidantes exercem efeito protetor contra o câncer, através da diminuição dos danos oxidativos no DNA (Cozzi et al., 1997).

Os alimentos de origem vegetal, de várias espécies, também apresentam atividade antioxidante natural (Moure et al., 2001). Diversos estudos têm demonstrado a importância do consumo de alimentos, com propriedades antioxidantes, na prevenção de doenças crônicas e desordens degenerativas relacionadas ao envelhecimento (Luximon-Ramma et al., 2003).

Neste sentido, vale ressaltar a importância geral dos produtos definidos como alimentos funcionais, que são aqueles que contêm em sua composição alguma substância biologicamente ativa, que ao ser adicionada na dieta usual, desencadeia processos metabólicos ou fisiológicos que resultam na redução do risco de doenças (Pollonio, 2000).

Devido à capacidade de prevenção ou tratamento de doenças crônicas, como o câncer e doenças cardíacas, os alimentos funcionais são temas de intensas pesquisas científicas. Na proteção contra o câncer, as substâncias químicas presentes nesses alimentos atuam de forma a desintoxicar o organismo de drogas, toxinas, carcinógenos e mutágenos (Mahan e Escott-Stump, 2005).

Essas ações de desintoxicação possuem mecanismos de sobreposição e complementares, como a neutralização de radicais livres, a inibição de enzimas que ativam a produção de ERO e a indução das enzimas que desintoxicam carcinógenos (Lampe, 1999).

Pelo fato de atuarem como bloqueadores ou supressores, os alimentos funcionais podem reduzir o risco de câncer. Os agentes bloqueadores impedem o carcinógeno ativo ou promotor de tumor de atingir o tecido alvo por vários mecanismos ou uma combinação destes, através da captura e seqüestro de carcinógenos reativos ou bloqueando eventos celulares necessários para a promoção do tumor (Mahan e Escott-Stump, 2005).

Os agentes supressores têm ações menos definidas, mas podem deter a carcinogênese atuando de modo a impedir a manifestação maligna de células que foram expostas a agentes causadores de câncer (Wattenberg, 1997).

Com relação à redução do risco de doença cardíaca coronária, os alimentos funcionais parecem atuar na proteção do colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) da oxidação, reduzindo a síntese ou absorção de colesterol e afetando a pressão e coagulação sanguíneas (Craig e Beck, 1999; Mahan e Escott-Stump, 2005).

Os alimentos funcionais contêm substâncias classificadas como nutrientes ou não-nutrientes capazes de atuar na promoção de efeitos benéficos à saúde. Sgarbieri e Pacheco (1999) classificam como nutrientes com funções fisiológico-funcionais os macronutrientes: ácidos graxos ω -3, que reduzem o risco de doenças cardiovasculares e câncer; as fibras alimentares, proteínas, aminoácidos e outros; além dos micronutrientes como: o cálcio, zinco, beta-caroteno, vitaminas B, C, D e E, que atuam de forma protetora no sistema imunológico além de prevenir vários tipos de câncer.

Da mesma forma, as principais classes de substâncias não-nutrientes, presentes nos alimentos com funções fisiológico-funcionais são: os organossulfurados, que atuam elevando os níveis de glutathione e no combate ao câncer e doenças cardiovasculares (Mazza, 1998); os terpenos, oligossacarídeos e indólicos, com ação antimutagênica e efeito anticarcinogênico (Sgarbieri e Pacheco, 1999).

Por fim, ressaltam-se os compostos fenólicos, que são substâncias não-nutrientes, presentes nos alimentos funcionais, que reagem com os radicais livres e substâncias carcinogênicas protegendo contra vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares, reduzindo a glicose sanguínea e atuando na quelação de metais (Goldberg, 1994; Sgarbieri e Pacheco, 1999).

1.2.1 – Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são os principais grupos de antioxidantes encontrados nas plantas e sua atividade se deve principalmente às suas propriedades redox, que permitem que eles atuem como agentes redutores ou doadores de hidrogênio. Além disso, também apresentam um potencial efeito na quelação de metais (Williams et al., 2004; Atoui et al., 2005).

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe que inclui uma diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (Escarpa e Gonzáles, 2001).

Amplamente distribuídos, os compostos fenólicos estão presentes no reino vegetal, nos microorganismos e fazendo parte do metabolismo animal. No entanto, os animais são incapazes de sintetizar o anel aromático e, por isso, os compostos fenólicos, produzidos em pequenas quantidades pelos mesmos, utilizam o anel benzênico de substâncias presentes na dieta alimentar (Carvalho et al., 2003).

A síntese de compostos fenólicos pode ocorrer por duas rotas biogénéticas: pela via do ácido chiquímico, a partir de carboidratos e da qual se originam os fenilpropanóides; ou pela via do acetato-polimato que inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A e produz fenólicos simples; desta rota se originam os flavonóides e seus derivados (Carvalho et al., 2003).

Os compostos fenólicos podem inibir os processos da oxidação em certos sistemas, mas isso não significa que eles possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos. Esses compostos podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (Decker, 1997).

Mesmo assim, o vinho tinto e os chás (verde e preto) são reconhecidos como benéficos à saúde, por conterem substâncias fenólicas com propriedades antioxidantes, antiaterogênicas e anticancerígenas (Sgarbieri e Pacheco, 1999).

Devido às suas estruturas químicas heterogêneas, os compostos fenólicos são encontrados nas formas livres ou conjugados, podendo se ligar à grande variedade de substâncias naturais como a glicose, galactose, xilose e ramnose, por meio de ligações glicosídicas, aumentando ainda mais sua variedade química (Piccin, 2004).

Quanto à sua cadeia carbônica principal os compostos fenólicos podem ser classificados em quatro classes principais: ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, cumarinas e flavonóides das quais derivam outras subclasses (Escarpa e Gonzáles, 2001).

Os ácidos hidroxibenzóicos são os compostos fenólicos mais representativos em relação à ocorrência e variedade, apresentam estruturas mais

simples, como o ácido gálico, por exemplo, e desempenham funções biológicas vitais para as plantas (Macheix et al., 1990).

Os ácidos hidroxicinâmicos são conhecidos como fenilpropanóides e representam um grande grupo de produtos naturais derivados dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, ou em alguns casos do processo de biossíntese do ácido chiquímico (Robbers et al., 1999). Quatro derivados do ácido cinâmico são amplamente distribuídos no reino vegetal: ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido sinápico (Carvalho et al., 2003).

As cumarinas estão distribuídas no reino vegetal principalmente na sua forma glicosídica, mas em reduzido número de famílias, especialmente *Apiaceae* e *Rutaceae* e são freqüentemente responsáveis pelo odor fragrante dos vegetais, pelo sabor ardente, aromático e amargo (Carvalho et al., 2003).

Os flavonóides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, constituem uma classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. Representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (Carvalho et al., 2003).

1.2.1.1 - Flavonóides

Os flavonóides são uma classe de compostos naturais, de considerável interesse científico e terapêutico, e várias de suas propriedades já foram estudadas nas últimas décadas, destacando-se o potencial antioxidante, anticarcinogênico e seus efeitos protetores aos sistemas renal, cardiovascular e hepático (Behling et al., 2004).

Segundo Havsteen (2002) o termo flavonóide é um nome coletivo dado aos pigmentos de plantas derivados da benzo-g-pirona e estes compostos são constituídos por um esqueleto de dinenil propano ($C_6C_3C_6$) com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (Figura 1).

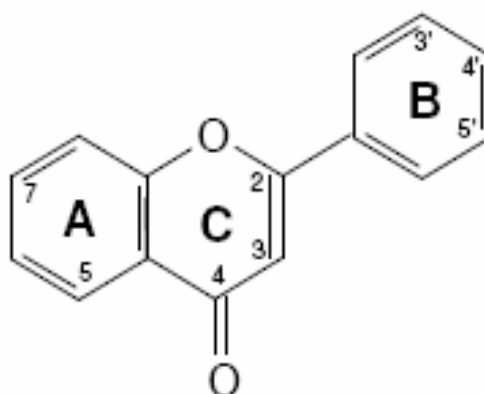


Figura 1. Estrutura básica dos flavonóides.

Fonte: Havsteen (2002).

Os flavonóides constituem a classe de compostos polifenólicos mais abundante na dieta humana, sendo encontrados em uma grande variedade de frutas, hortaliças e bebidas, como o vinho e os chás verde e preto (Manach et al., 2004; Bixby et al., 2005).

Estudos sugerem que o consumo de uma dieta rica em polifenóis está associado à redução no risco do desenvolvimento de certas patologias, tais como o câncer e as doenças cardiovasculares. Os benefícios à saúde proporcionados pelo consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos são atribuídos, principalmente, às suas notáveis propriedades antioxidantes (Mckay e Blumberg, 2002).

Embora os flavonóides apresentem propriedades antioxidantes importantes na prevenção de doenças, trabalhos como o de Heim e colaboradores (2002) demonstraram uma atividade pró-oxidante destas substâncias *in vitro*, mostrando assim, que relatos de mutagenicidade, baseada no dano oxidativo causado pelos flavonóides, também são de grande interesse.

Outros trabalhos, porém, mostraram que os flavonóides, assim como alguns de seus metabólitos, apresentam grande habilidade para a neutralização de radicais livres (Cren-Olivé et al., 2003). Todavia, a efetividade da ação antioxidante desses compostos está, essencialmente, relacionada à sua estrutura química individual (Odontuya et al., 2005).

Os estudos *in vitro* de Bixby et al. (2005) e Odontuya et al. (2005) mostraram que os flavonóides são potentes neutralizadores de diversas espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. Além disso, os flavonóides podem interferir na ação oxidante de metais de transição (van Acker, 1996). A inibição da peroxidação lipídica, promovida por flavonóides, parece estar relacionada à doação de hidrogênio a espécies radicais (Rice-Evans et al., 1996; Lotito e Fraga, 2000).

Portanto, sabe-se que alguns flavonóides são capazes de se ligar a íons metálicos, impedindo-os de atuarem como catalisadores na produção de radicais livres. Essa atividade é o resultado de um conjunto de propriedades, tais como atividade quelante de ferro, atividade seqüestradora de radicais livres, inibição das enzimas cicloxigenase, lipoxigenase, NADPH-oxidase, xantina-oxidase e fosfolipase, e estimulação de enzimas com atividades antioxidantes como a CAT e a SOD (Trueba e Sanchez, 2001).

O emprego terapêutico de plantas contendo flavonóides é bastante conhecido, embora ainda empírico. Apesar de alguns resultados controversos, em geral, apresenta efeitos benéficos. Pesquisas sugerem ainda, que os flavonóides podem ser usados para o tratamento de doenças circulatórias, hipertensão e agindo como cofator da vitamina C, além de também serem apontados como responsáveis por ação antitumoral considerável, podendo agir ainda como antivirais, anti-hemorragicos, hormonais, antiinflamatórios e antimicrobianos (Carvalho et al., 2003).

Os flavonóides diferem entre si pela sua estrutura química e características particulares e já foram descritos mais de 5000 tipos de flavonóides (Behling et al., 2004) que podem ser subdivididos nas seguintes subclasses: a) flavanol, b) antocianidina, c) flavanona, d) flavanonol (diidroflavonol), e) flavonas, f) isoflavanona e g) flavonol (Moraes-de-Souza, 2007).

A subclasse flavanol (flavan-3-ol), diferente da maioria dos flavonóides, não se apresenta na forma glicosilada. São os flavonóides mais encontrados na natureza e caracterizam-se pela ligação saturada entre os carbonos 2 e 3, pela ausência de carbonila no carbono 4 e pela hidroxila ligada ao carbono 3. Destacam-se entre os flavanóis as catequinas e seus derivados: epicatequina,

galocatequina e epigallocatequina (Moraes-de-Souza, 2007), todos compostos presentes no CV.

1.3 - Chá verde (*Camellia sinensis*)

As plantas são utilizadas como produtos terapêuticos desde a pré-história e, em todo o mundo, milhares de produtos de origem vegetal são utilizados nas mais variadas formas: cataplasmas, infusão, macerado filtrado, tinturas, ungüentos, pomadas, xarope, cápsulas e na sua forma *in natura* (Schmitz et al., 2005).

O chá é a segunda bebida mais consumida no mundo, superada apenas pela água (Weisburger, 1997) e, segundo esse autor, a história do chá, como uma bebida, data do ano de 2700 a.C. na China, de onde a tradição foi levada para o Japão, e se difundiu na Ásia e colônias asiáticas sendo mais tarde expandida pelo mundo todo (Trevisanato e Kim, 2000).

O consumo de chá no Brasil está historicamente relacionado a práticas curativas, tendo suas origens nas culturas indígena e negra, porém, no fim do século XX, o aumento no consumo da bebida levou à formulação de legislação específica (Moraes-de-Souza, 2007).

Em 1998 foi aprovado o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Chás – Plantas destinadas à Preparação de Infusões ou Decocções. Em 2005 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, por meio da Resolução nº. 267, aprovou o Regulamento Técnico que propõe a seguinte definição:

“Chá é o produto constituído de uma ou mais partes de espécie (s) vegetal (is) inteira (s), fragmentada (s) ou moída (s), com ou sem fermentação, tostada (s) ou não, constantes de Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás” (Anvisa, 2007).

Este Regulamento Técnico designa 47 espécies vegetais para o preparo de Chás, mas reforça a exclusão das espécies vegetais com finalidade medicamentosa ou farmacoterapêutica. No entanto, Lorenzi e Matos (2002) classificaram 23, das 47 espécies constantes no Regulamento citado, como

plantas medicinais, pelo fato de serem utilizadas na medicina popular, caseira ou tradicional.

Diversos estudos já demonstraram atividades biológicas relacionada à composição fenólica de espécies vegetais que são utilizadas para o preparo de infusões de chás, demonstrando que são fontes potencias de compostos bioativos que conferem atividade antioxidante e outras importantes propriedades biológicas (Atoui et al., 2005; Gramza e Korczak, 2005; Panza, 2007).

O chá verde consiste em uma bebida preparada a partir da infusão de folhas da planta *Camellia sinensis* (*Ericales*, *Theaceae*) (Figura 2). O processo de manufaturação do CV envolve o aquecimento de folhas colhidas frescas, a fim de promover a inativação de enzimas catalíticas. Desta forma, previne-se a fermentação (oxidação) do chá, obtendo-se um produto seco e estável (Balentine, 1992; Frei e Higdon, 2003). A fermentação parcial ou total das folhas de *Camellia sinensis* resulta em dois outros tipos de chá, o *oolong* e o chá preto, respectivamente (Balentine, 1992).



Figura 2. Aspecto geral da planta *Camellia sinensis*.

Fonte: <http://www.jungleseeds.com/images/cameliasinensis.jpg>

Tanto o CV quanto o chá preto e o *oolong* são obtidos a partir da mesma planta, mas a maioria dos estudos experimentais demonstra efeitos

antimutagênicos e anticarcinogênicos do chá preparado na forma verde, ou de frações polifenólicas isoladas de CV (Manfredini et al., 2004).

Del Rio et al. (2004) analisaram o perfil fenólico dos chás verde e preto e encontraram a seguinte distribuição entre as classes: CV (77,1% de flavanol; 13,2% de flavonol; 7,6% de ácido hidroxicinâmico e 2,2% de ácido hidroxibenzóico), chá preto (54,8% de tearrubigina, 7,3% de teaflavina, 8,9% de ácido hidroxibenzóico; 8,6% de flavonol; 7,0% de ácido hidroxicinâmico e 3,3% de flavanol).

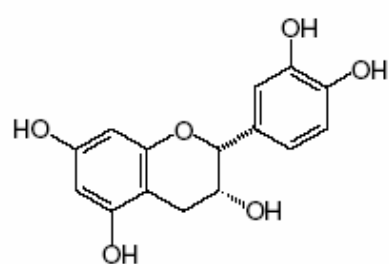
A diferença de perfil entre os dois chás, originários da mesma espécie, é explicado pelo fato de que no CV há inativação de polifenoloxidasas, que permite a manutenção dos flavonóides em suas estruturas básicas. No chá preto o processo de fermentação total das folhas modifica os flavanóis, produzindo novas estruturas: a tearrubigina e a teaflavina (Del Rio et al., 2004).

O CV é considerado uma bebida saudável há séculos. Porém existem muitas pretensões, freqüentemente exageradas, quanto aos benefícios do CV para a saúde. Dessa maneira vários estudos produziram resultados que afastaram os mitos, mas ao mesmo tempo também confirmaram alguns benefícios importantes para a saúde, em relação ao seu consumo regular (Graham, 1992).

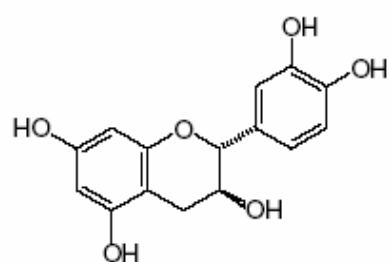
O CV foi introduzido no mercado também como auxiliar em regimes dietéticos, pela sua ação lipolítica e diurética e, ainda, como antipruriginoso e emoliente em afecções dermatológicas (Carvalho et al., 2003).

O CV é constituído por diversas classes de compostos fenólicos, já citados anteriormente tais como: flavanóis e ácidos fenólicos, que correspondem a 30% do peso seco das folhas de *Camellia sinensis* (Picard, 1996), além do ácido caféico (cafeína), vitamina K, pigmentos, carboidratos, aminoácidos e outras substâncias (Hong et al., 2001).

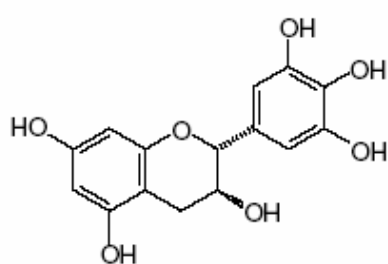
Os principais flavanóis presentes no CV (Figura 3) são a catequina (C), a galocatequina (GC), a epicatequina (EC), a epigalocatequina (EGC), a epicatequina galato (ECG) e a epigalocatequina galato (EGCG) (Balentine, 1992), esta última corresponde a mais abundante catequina do CV, representando cerca de 61% dos flavanóis (Picard, 1996).



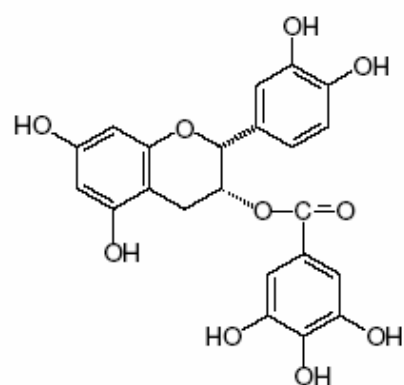
Catequina



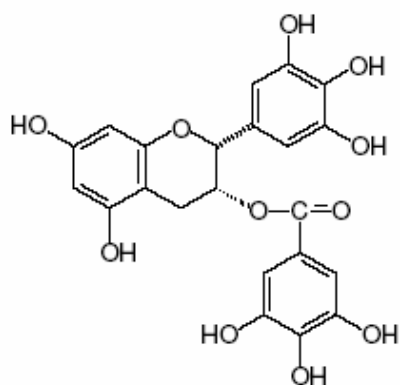
Epicatequina



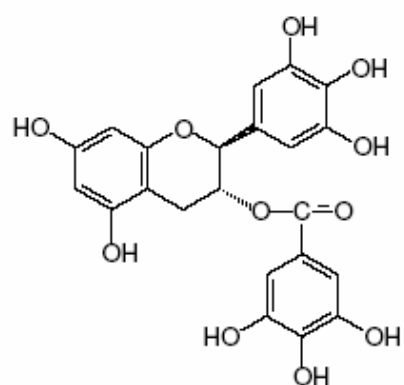
Epigallocatequina



Epicatequina galato



Epigallocatequina galato



Galocatequina galato

Figura 3. Estrutura química dos flavanóis presentes no chá verde.

Fonte: Balentine (1992).

No entanto, segundo Salah et al. (1995), considerando a relação entre o potencial antioxidante das catequinas e a sua composição relativa no CV, a seqüência de participação desses compostos na efetividade antioxidante da bebida, se estabelece na seguinte ordem decrescente: EGC > EGCG > ECG > EC > C.

O teor de catequina e, conseqüentemente, a atividade antioxidante do CV depende de alguns fatores externos tais como: a parte da planta utilizada, a forma do processamento das folhas antes da secagem, a localização geográfica do plantio e as condições de cultivo (Mckay e Blumberg, 2002), além da atividade da polifenoloxidase, do beneficiamento, da temperatura, do estágio de amadurecimento e de outros fatores que são determinantes para o nível de atividade. Em teoria, quanto mais madura for a planta maiores serão os teores de compostos fenólicos e sua atividade antioxidante (Moure et al., 2001).

A atividade antioxidante das catequinas pode prevenir a citotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo em diferentes tecidos (Asfar et al., 2003; Rah et al., 2005). As propriedades antioxidantes do CV são apontadas como o principal fator na prevenção e no tratamento de diversas doenças crônico-degenerativas, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e outras (Song et al., 2002).

Em seu trabalho de revisão Zaveri (2006) relata que o aumento na formação de radicais livres e, conseqüentemente, a geração de estresse oxidativo são processos diretamente associadas ao envelhecimento e responsáveis por ocasionar muitas doenças como o câncer, doenças de Parkinson e Alzheimer. Contudo, o CV e suas catequinas fornecem mecanismos que auxiliam a inibir ou retardar esses danos.

Os efeitos positivos do consumo do CV foram, também, descobertos, quando estudos epidemiológicos revelaram sua forte ligação à redução do risco de câncer, em particular do câncer de estômago (Uesato et al., 2001).

O consumo de CV tem mostrado ser uma prática protetora contra agentes químicos, indutores de carcinoma no estômago, pulmão, duodeno, esôfago, pâncreas, fígado, mama e cólon (Uesato et al., 2001). A EGCG presente no CV tem demonstrado atividade em reduzir e impedir a formação de tumores (Manfredini et al., 2004).

Embora os efeitos quimiopreventivos do chá não estejam completamente elucidados, várias teorias têm sido propostas. Em suas pesquisas, Uesato e colaboradores (2001) sugerem que a EGCG pode prevenir o surgimento de câncer através da inibição da atividade da uroquinase, telomerase e angiogênese, o que também foi demonstrado por Steinmetz e Potter (1991).

Estudos em animais e em seres humanos revelaram que o consumo de CV pode elevar a capacidade antioxidante no plasma (Leenen et al., 2000; Sung et al., 2000; Skrzydlewska et al., 2002). As catequinas do CV foram descritas como eficazes neutralizadoras de diferentes espécies reativas tais como: o superóxido, hidroxila, peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete, óxido nítrico e peroxinitrito, além de interromper a peroxidação de lipídeos (Bixby et al., 2005).

Os efeitos fisiológicos do chá ou das catequinas do chá no estresse oxidativo, parecem ser proeminentes em modelos animais, porém, acredita-se que a absorção das catequinas *in vivo* atinja baixas concentrações plasmáticas (Higdon e Frei, 2003).

Ao mesmo tempo, estudo sobre a peroxidação lipídica *in vivo*, feito por Hodgson et al., (2002), entre os consumidores de CV e o grupo controle, que ingeria água quente, sugeriu que o consumo de CV não inibe a peroxidação lipídica. Por outro lado, existem evidências de que a oxidação de LDL – colesterol, relacionada ao risco de arteriosclerose e doenças cardíacas, seja inibida pelas catequinas presentes nesse chá (Weisburger e Chung, 2002).

Ainda assim, as catequinas do CV parecem exercer efeitos modulatórios na atividade das enzimas glutathione peroxidase e glutathione reductase, o que pode estar associado ao aumento da expressão de enzimas detoxificadoras, induzida por flavonóides (Panza, 2007). De forma complementar, estudos sugerem que a atividade antioxidante dos flavonóides do CV, além de ocorrer diretamente, por meio da neutralização de espécies reativas, pode se processar através de mecanismos indiretos, como, por exemplo, a preservação e modulação de enzimas antioxidantes (Skrzydlewska et al., 2002).

Além disso, existem relatos de que os polifenóis do CV podem inibir a atividade de enzimas envolvidas com a produção de ERO, como, por exemplo, a ciclooxigenase, a lipooxigenase e a xantina oxidase (Hong et al., 2001).

Os polifenóis dos chás também exibem efeito quimiopreventivo contra agentes de iniciação, promoção e progressão no desenvolvimento dos cânceres (Verhoeven et al., 1997). Parece que as substâncias presentes no CV, principalmente a EGCG, evitam o sangramento de tumores de pele, impedem o aparecimento de lesões cancerosas no estômago, ajudam no tratamento do câncer de intestino e diminuem a proliferação das células cancerígenas do pulmão (Saffari e Sandrzadeh, 2004).

A ação anticancerígena das substâncias fenólicas presentes nos chás foi testada em tumores induzidos por vários tipos de carcinógenos, em diferentes órgãos: pulmão, induzido por N-nitrosodietilamina (NDEA) e 4-(metilnitrosamino)1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), em camundongos (Shi et al., 1994); tumores de esôfago induzidos por N-nitrosometilbenzilamina (NMBZA) (Han e Xu, 1990); tumores de pele induzidos pela luz ultravioleta, em camundongos (Wang et al., 1992); tumores de estômago e intestino provocados por vários carcinógenos como dietilnitrosamina, N-metilnitrosouréia, dimetilhidrazina e N-butil-N-(4-hidroxibutil) nitrosamina em ratos (Hirose et al., 1993).

Estima-se que aproximadamente 25 mil novos artigos experimentais, na área da quimioprevenção, tenham sido publicados nas últimas três décadas (Nepomuceno, 2005). Mas, segundo esse autor, é problemática a extrapolação desses resultados, em laboratório, no desenvolvimento de estratégias e recomendações para humanos.

Nesse aspecto, é importante ressaltar que a forte atividade anticarcinogênica do CV, e de seus componentes fenólicos, é observada em concentrações usualmente consumidas por seres humanos. A preponderância das evidências sugere então, de maneira cautelosa, que o CV, através de seus componentes, pode atuar como modulador do metabolismo de carcinógenos; como antioxidante, protegendo o DNA de danos oxidativos; e por último, como agente inibidor da proliferação celular (Sgarbieri e Pacheco, 1999).

O papel do CV na prevenção de neoplasias malignas foi observado em estudos *in vitro* e *in vivo*. Nakachi, Eguchi e Imai (2003) realizaram um estudo epidemiológico com pacientes que consumiam quantidades elevadas de CV, onde observaram a diminuição no número de mortes por câncer e doenças relacionadas com o envelhecimento.

Estudos em modelos animais também demonstraram que o CV pode inibir a carcinogênese em todos os estágios: iniciação, promoção e progressão (Chung et al., 2003). Segundo Gouni-Berthold e Sachinidis, (2004) a inibição do processo tumorigênico é atribuída à combinação dos efeitos antioxidantes, antiproliferativos e pró-apoptóticos das catequinas. O CV pode ainda inibir o processo de angiogênese, metástases e a invasão tumoral em modelos animais (Fassina et al., 2004).

Portanto, a participação do CV na prevenção de neoplasias malignas é devida à ação de suas catequinas na lesão causada, pelos radicais livres, no DNA das células e na indução da apoptose de células tumorais, entre outras. Sendo assim, o CV pode ser usado como terapia complementar recomendada para pacientes oncológicos, uma vez que os antioxidantes podem ser úteis na redução dos efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia por reduzir sua toxicidade (Behling et al., 2004).

Enfim, várias investigações, relacionadas ao consumo do CV, sugerem que este apresenta diversos efeitos benéficos sobre a saúde humana. Entretanto, como ainda há controvérsias, são necessárias mais pesquisas para elucidar as propriedades e os mecanismos de ação desta bebida apreciada pelo mundo inteiro. Diante disso, este trabalho torna-se relevante à medida que possui como objetivo investigar e avaliar a possível ação antígeno-tóxica do CV (*Camellia sinensis*), nas concentrações (25; 50 e 75mg/mL), contra a ação genotóxica da doxorubicina (0,125mg/mL), geradora de radicais livres. Uma vez comprovado que o CV não apresenta potencial genotóxico, procurou-se investigar os possíveis efeitos protetores ou moduladores desta bebida.

1.4 - Doxorubicina

Os agentes que causam danos em nosso material genético e que induzem neoplasias são normalmente presentes no meio como: a luz solar, radiações ionizantes ou agentes químicos (Setlow, 2001). Um tipo de agente químico mutagênico é o cloridrato de doxorubicina, que possui efeitos cardiotóxicos, genotóxicos, teratogênicos e, ainda, tem a capacidade de

intercalar-se à molécula de DNA gerando radicais livres que estão envolvidos no seu mecanismo de citotoxicidade contra uma variedade de tumores (Gilman et al., 1996).

Entretanto, este mecanismo citotóxico de radicais livres pode não ser eficiente em muitos tipos de células tumorais devendo existir outros mecanismos. Sabe-se que a doxorrubicina (DXR), em concentrações muito baixas, interfere com a atividade da topoisomerase II, enzima associada ao DNA que atenua o estresse causado nesta molécula durante a transcrição e replicação, esta interferência ocasiona quebras no DNA, e este fator está correlacionado à citotoxicidade da DXR (Keizer et al., 1990).

O primeiro agente antibiótico cristalino isolado de culturas de uma espécie de *Streptomyces* foi a actinomicina A, subseqüentemente, muitos outros foram obtidos, dentre eles o cloridrato de doxorrubicina (Figura 4), um antibiótico citotóxico antraciclínico isolado de culturas de *Streptomyces peucetius* var. *caesius* (Gilman et al., 1996).

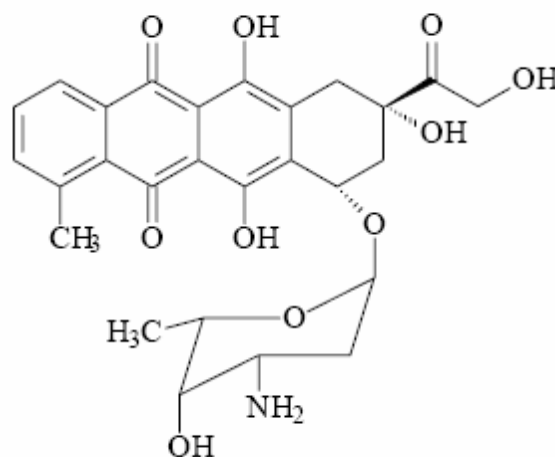


Figura 4. Fórmula estrutural da doxorrubicina.

Fonte: Gilman et al., (1996).

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

tumores sólidos e é um componente valioso de vários esquemas de quimioterapia (Gilman et al., 1996).

Além disso, a DXR é um dos agentes mais eficazes utilizados no tratamento dos carcinomas de mama, ovário, endométrio, bexiga e tireóide, bem como no câncer de pulmão. Está incluída em vários esquemas de associação para linfomas difusos e doença de Hodgkin. Pode ser utilizada em leucemias agudas, em mielomas múltiplos, neuroblastomas, tumor de Wilms, sarcomas osteogênico, de Ewing e de tecidos moles e, ainda, em outros tumores sólidos. Demonstra ainda atividade em carcinomas de testículo, próstata, colo do útero, cabeça e pescoço e no mieloma de células plasmáticas (Sikic, 2005).

As propriedades citotóxicas da DXR, sobre as células malignas e seus efeitos, parecem estar relacionadas com a capacidade de intercalação dos anéis planos tetraciclina, entre os pares de bases nucleotídicas, causando conseqüentes danos à síntese de DNA (Sikic, 2005).

A DXR é ativa durante todo o ciclo celular, mas as células na fase S são mais sensíveis, provocando efeitos antiproliferativos aos tecidos tumorais, mas também a outros tecidos como a medula óssea, mucosa gastrintestinal e oral, folículos capilares e outros (Sikic, 2005).

Portanto, a doxorrubicina provoca manifestações tóxicas diversas como mielossupressão, tromboplastina, anemia, estomatite, perturbações gastrintestinais, manifestações dermatológicas, toxicidade cardíaca e derrame pericárdico (Gilman et al., 1996).

Os efeitos cardiotoxícos, genotóxicos, embriotóxicos e teratogênicos foram comprovados em testes *in vivo* realizados com camundongos, cães, coelhos e ratos. Pode ainda, potencializar a toxicidade de outros agentes antineoplásicos, uma vez que a via de eliminação da doxorrubicina é o sistema hepatobiliar. Assim, se função hepática for reduzida pode retardar a eliminação da droga e causar o aumento da toxicidade global (Pfizer Itália S.r.l., 2006).

Outros estudos demonstraram, ainda, que a DXR induz mutações e recombinações somáticas em células de asas de *Drosophila melanogaster* (Lehmann et al., 2003; Costa e Nepomuceno, 2006; Fragiorgi et al., 2007;

Valadares et al., 2008). Por isso, neste trabalho a DXR foi utilizada como controle positivo, tendo em vista, sua comprovada ação genotóxica.

Os efeitos genotóxicos da DXR são responsáveis por induzir aumento na frequência de aberrações cromossômicas em células somáticas e redução na produção de células germinativas (gametas), comprovados em testículos de camundongos (Au e Hsu, 1980 *apud* Valadares, 2002), e em cultura de linfócitos humanos (Antunes e Takahashi, 1998).

Os efeitos genotóxicos da doxorrubicina podem ser diminuídos, pela ação das vitaminas C e E em células da medula óssea de ratos Wistar (Antunes e Takahashi, 1998) e ainda em células de asas de *Drosophila melanogaster*, quando ministradas em doses pequenas (Costa e Nepomuceno, 2006).

Enfim, este antibiótico antracíclico possui vários efeitos terapêuticos e tóxicos, mas o efeito bioquímico mais importante neste estudo é a capacidade de intercalação da DXR com o DNA. Neste processo muitas funções do DNA são afetadas inclusive a síntese de RNA, ocorrendo também quebras mono e bifilamentares bem como, a troca de cromátides irmãs (Gilman et al., 1996), demonstrando que as antraciclinas, como a DXR, são mutagênicas e carcinogênicas.

Ainda há de se ressaltar que muitos agentes que causam danos ao DNA têm, também, atividade recombinogênica, como a DXR, levando a mais danos ao material genético (Hoffmann, 1994). A recombinação pode promover a perda da heterozigose em células somáticas e germinativas o que pode estar envolvido com a progressão de neoplasias (Happle, 1999).

Neste contexto, ressalta-se a importância da genética toxicológica que destaca o uso de testes que detectam agentes que de algum modo causam danos ao DNA, com potencial genotóxico em qualquer tipo de célula (Erdtmann et al., 2003). Um destes testes, o SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*), foi desenvolvido por Graf e colaboradores (1984). O SMART detecta alterações genéticas, resultantes de mutação e/ou recombinação somática ocorridas no disco imaginal das asas de *Drosophila melanogaster*.

1.5 - Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática em células de *Drosophila melanogaster*- Somatic Mutation And Recombination Test (SMART)

Os geneticistas trabalham com muitas espécies de animais experimentais entre eles a *Drosophila melanogaster* (Figura 5) que vem sendo estudada desde 1928, quando Herman J. Muller, que procurava qualquer mutação letal no cromossomo X da mosca, descobriu resultados que forneceram as primeiras evidências de um mutágeno (Suzuki et al., 2002).

A *D. melanogaster* é o organismo teste do SMART (Somatic Mutation And Recombination Test), o teste somático de asa desenvolvido por Graf et al., (1984), para detecção de mutação, deleção ou recombinação gênica, causadas por agentes genotóxicos, bem como a ação antigenotóxica de diversas substâncias.

Este organismo eucarioto é ideal para estudos de genotoxicidade e antigenotoxicidade *in vivo*, por possuir pequeno número de cromossomos, sistema enzimático semelhante ao dos mamíferos, tempo curto de geração, grande número de mutantes, linhagens bem caracterizadas, além do baixo custo, rapidez e confiabilidade dos testes (Graf et al., 1984; Vogel, 1987).



Figura 5. *Drosophila melanogaster*, à esquerda o macho apresentando o pente sexual (pontos escuros nas patas anteriores, indicados pelas setas) e à direita a fêmea.

Fonte: MRC Dunn Human Nutrition Unit (2008).

O SMART permite avaliar vários eventos como mutações pontuais, deleções ou tipos específicos de translocação, assim como, recombinação mitótica, além do fato de ser um teste mais rápido, mais sensível e de menor custo que outros testes que detectam tais eventos (Graf et al., 1984; Vogel, 1987).

Dessa maneira, o SMART possui uma alta eficiência para detectar a atividade genotóxica de mutágenos de várias classes químicas. Podendo ainda detectar um grande número de promutágenos, ativados por diversas vias metabólicas de bioativação enzimática (Graf et al., 1984).

1.5.1 - Linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*

No teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de *Drosophila melanogaster* as linhagens usadas são:

- ✓ *mwh/mwh* (*mwh*, multiple wing hair);
- ✓ *flr³/ln(3LR)TM3* (*flr³*, *flare3*);
- ✓ *ORR; flr³/ln(3LR)TM3* (Oregon R, *flare3*).

As moscas da linhagem *mwh* possuem o gene marcador no cromossomo 3 (3-0,3) numa posição distal, caracterizado por expressar três ou mais pêlos em cada célula (Figura 6). De acordo com Graf et al., (1984), a linhagem é mantida em homozigose por ser esta uma mutação viável. Os indivíduos *flare³* possuem o gene *flr³* numa posição proximal, também no cromossomo 3 (3-38,8) e o pêlo malformado é caracterizado por se assemelhar a uma chama (Figura 6).

O gene marcador *flr³* é letal em homozigose (Graf et al., 1984; Guzmán-Rincón e Graf, 1995), no entanto, foi desenvolvido um cromossomo homólogo balanceador *TM3, Bds* (*Third Multiple 3, Beaded-serrate*) que mantém a heterozigose da linhagem *flr³* (Lindesley e Zimm, 1992).

A linhagem *Oregon R; flare³* (*ORR*) foi construída por Frölich e Würigler (1989) e apesar de apresentar o marcador *flr³*, se difere da linhagem *flare³* por apresentar os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem Oregon R resistente ao DDT, além de possuir alta atividade de enzimas citocromo P 450 (Hallström, 1986). Pelo alto nível de citocromo P 450 constitutivo na linhagem *ORR*, o teste SMART torna-se mais sensível à ativação de promutágenos via citocromo.

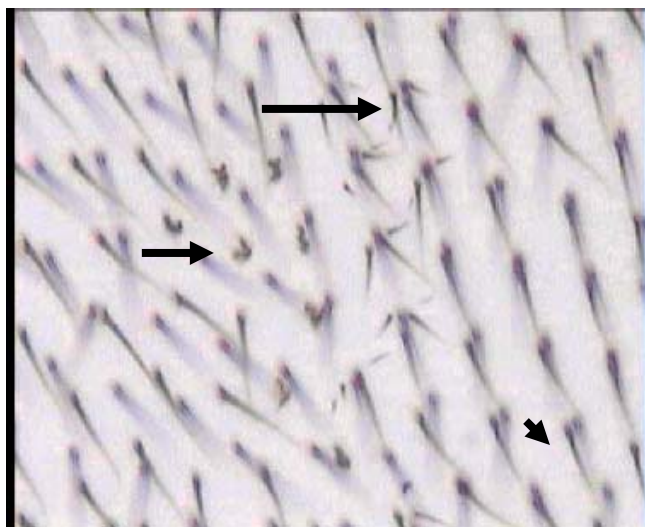


Figura 6. Fotomicrografia, com microscópio óptico de luz (aumento de 400X), com apresentação de pêlos múltiplos - *mwh* (seta maior), de pêlos *flare* (seta média) e de pêlos normais (seta menor).

Fonte: foto retirada no Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Centro Universitário de Patos de Minas

1.5.2 – Cruzamentos

Para obtenção dos descendentes no teste SMART são realizados os seguintes cruzamentos:

1) Cruzamento Padrão (ST- *Standard Cross*):

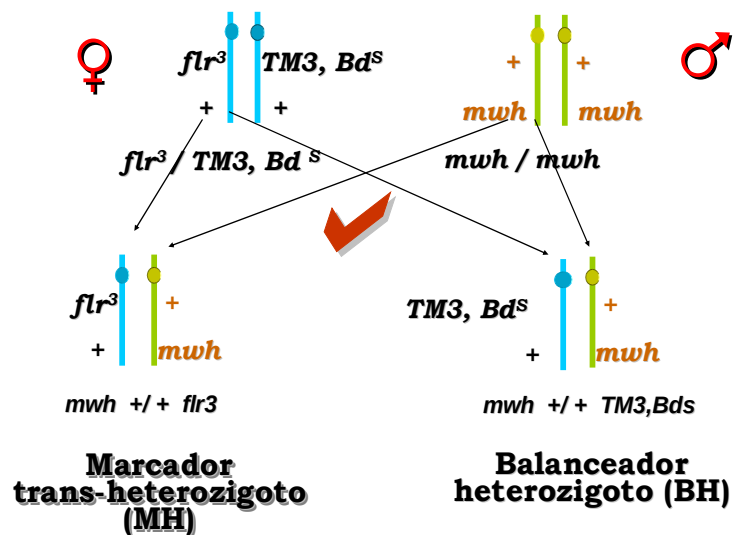
Fêmeas virgens *flr³/ln(3LR)TM3*, *ri p^p sep I(3)89Aabx^{34e}* e *Bd^s* cruzadas com machos *mwh* (Graf et al., 1989) (Figura 7 A);

2) Cruzamento de Alta Bioativação (HB- *High Bioactivation Cross*):

Fêmeas virgens *ORR; flr³/ln(3LR)TM3*, *ri p^p sep I(3)89Aabx^{34e}* e *Bd^s* cruzadas com machos *mwh* (Graf e van Schaik, 1992) (Figura 7 B).

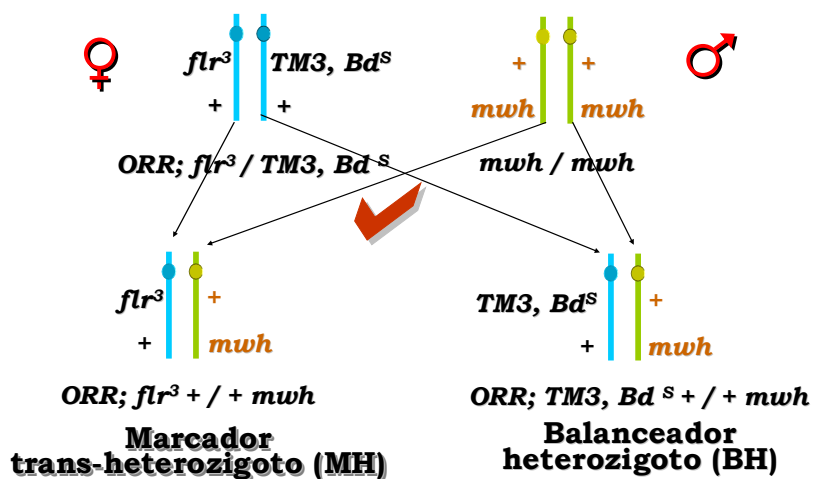
Destes cruzamentos nascem dois tipos de descendentes: trans heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Esses descendentes são distintos fenotipicamente, baseado no marcador TM3, *Bd^s*. Os MH (*mwh +/ + flr³*) apresentam os cromossomos estruturalmente normais, enquanto que os BH (*mwh +/ + TM3,Bd^s*) apresentam um cromossomo com um balanceador gênico com múltiplas inversões (*TM3,Bd^s*) (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

Cruzamento Padrão



(A)

Cruzamento de Alta Bioativação



(B)

Figura 7. Esquema representativo dos Cruzamentos no teste SMART (A) Cruzamento Padrão (ST) utilizando fêmeas virgens $flr^3/TM3$, cruzadas com machos mwh/mwh e (B) Cruzamento de Alta Capacidade de Bioativação (HB) cruzando fêmeas virgens ORR e machos mwh/mwh .

Os indivíduos MH expressam pêlos mutantes nas asas originados de mutação ou recombinação ocorridas no locus gênico *mwh* e *flr*³. Já os descendentes BH possuem um cromossomo balanceador TM3/Bd^s, com múltiplas inversões, que inviabiliza, nos descendentes, o aparecimento da recombinação, ocorrendo apenas eventos mutagênicos. O fenótipo dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) desenvolve asa normal, com borda lisa (Figura 8 A), enquanto que no heterozigoto balanceado (BH), as asas são mal formadas, com aparência picotada ou serrilhada, denominadas “serrate” (Figura 8 B) (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).



(A)



(B)

Figura 8. Fenótipo das asas dos descendentes de *D. melanogaster*: (A) trans-heterozigotos marcados - MH (*mwh* +/+ *flr*³); (B) heterozigotos balanceados – BH (*mwh* +/- TM3, Bds).

Fonte: Foto retirada no Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Centro Universitário de Patos de Minas

O teste da mancha da asa (SMART) baseia-se no fato que, durante o início do desenvolvimento embrionário da *D. melanogaster*, grupos de células (discos imaginais) proliferam mitoticamente durante o desenvolvimento das larvas, até se diferenciarem em estruturas do corpo da mosca adulta (olhos, asas, etc.). Se ocorrer uma alteração genética em uma das células do disco imaginal, esta alteração estará presente em todas as células descendentes e formará um clone de células mutantes, que será detectado como uma mancha de pêlos mutantes na asa da mosca adulta (Guzmán–Rincón e Graf, 1995).

Os pêlos mutantes são então, classificados em manchas: simples quando expressam apenas um dos marcadores *mwh* ou *flr*³ originadas por mutação, deleção ou recombinação distal; e gêmeas quando expressam os dois marcadores *mwh* e *flr*³ na mesma mancha (Graf et al., 1984).

Quanto ao tamanho, as manchas se classificam em simples pequenas, quando possuir um ou dois pêlos mutantes, caracterizadas por se formarem durante o último e penúltimo ciclos de divisão mitótica, que ocorrem na fase de pupa. Ou manchas simples grandes, se houver três ou mais pêlos mutantes, são alterações produzidas mais cedo, ou seja, são formadas durante o desenvolvimento larval no início das divisões mitóticas. A posição da mancha é determinada de acordo com o setor da asa que possui sete regiões: A, B, C', C, D, D' e E (Graf et al., 1998).

2 – Referências Bibliográficas

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás, <http://www.anvisa.gov.br> (Sep. 9, 2007) LEM Software http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/519_98.htm

Ames BN, Shigenaga M and Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 90:7915-7922.

Antunes LMG and Takahashi CS (1998) Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin – induced chromosomal damage in wistar rat bone marrow cells. *Mutation Research* 419:137–143.

Asfar S, Abdeen S, Dashti H, Khoursheed M, Al-Sayer H, Mathew T and Al-Bader A (2003) Effect of green tea in prevention and reversal of fasting-induced intestinal mucosa damage. *Nutrition* 19:536-540.

Atoui AK, Mansouri A, Boskou G and Kefalas P (2005) Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic prolife. *Food Chemistry* 89:27-36.

Balentine DA (1992) Manufacturing and chemistry of tea. In: Huang M (ed) *Phenolic compounds in food and their effects on health I: analysis, occurrence, and chemistry*. American Chemical Society, Washington, pp 102-117.

Barja G (2004) Free radicals and aging. Review. *Trends in Neurosciences* 27:595-600.

Behling EB, Sendão MC, Francescato HDC, Antunes LMG and Bianchi MLP (2004) Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. *Revista de Nutrição Alimentar* 15:285-292.

Bixby M, Spieler L, Menini T and Gugliucci A (2005) *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. *Life Science* 77:345-358.

Calabrese V, Guagliano E, Sapienza M, Calafato S, Puleo E, Pennisi G, Mancuso C, Butterfield DA and Stella AG (2007) Redox regulation of cellular stress response in aging and neurodegenerative disorders: role of vitagenes. *Neurochemical Research* 32:757-773.

Carvalho JCT, Gosmann G and Schenkel (2003) Compostos Fenólicos Simples e Heterosídicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA and Petrovick PR *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 5rd edition. UFRGS Press, Porto Alegre, pp 519-535.

Choe E and Min DB (2006) Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5:169-186.

Chung FL, Schwartz J, Herzog CR and Yang YM (2003) Tea and cancer prevention: studies in animals and humans. *Journal of Nutrition* 133: 3268–3274.

Costa WF and Nepomuceno JC (2006) Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and mineral on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47:18-24.

Cozzi R, Ricordy R, Aglitti T, Gatta V, Perticone P and Salvia R (1997) Ascorbic acid and β -carotene as modulators of oxidative damage. *Carcinogenesis* 18:223-228.

Craig W and Beck L (1999) Phytochemicals: health protective effects. *Canadian Journal of Dietetic Practice and Research* 60:78-84.

Cren-Olivé C, Teissier E, Duriez P and Rolando C (2003) Effect of catechin O-methylated metabolites and analogues on human LDL oxidation. *Free Radical Biology and Medicine* 34:850-855.

Decker EA (1997) Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Reviews* 55:396-407.

Del Rio D, Stewart AJ, Mullen W, Burns J, Lean MEJ, Brighenti F and Crozier A (2004) HPLC-MSn analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green tea and black tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31:2807-2815.

Erdtmann B, Silva J, Henriques JAP (2003) *Genética Toxicológica*. 1st edition. Alcance Press, Porto Alegre, 422 pp.

Escarpa A and Gonzáles MC (2001) A overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 31:57-139.

Fassina G, Vene R, Morini M, Minghelli S, Benelli R, Noonan DM and Albini A (2004) Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate. *Clinical Cancer Research* 10:4865–4873.

Fragiorge EJ, Spanó MA and Antunes LMG (2007) Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Biology* 30:449-455.

Frei B and Higdon JV (2003) Antioxidant activity of tea polyphenols *in vivo*: evidence from animal studies. *Journal of Nutrition* 133:3275-3284.

Frölich A and Würzler FE (1989) New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research* 216:179-187.

Gilman AG, Limbird LE and Hardman JG (1996) *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10rd edition. McGraw Hill Press, Rio de Janeiro, 1671 pp.

Goldberg I (1994) Functional foods - designer foods, pharmafoods, nutraceuticals. 1st edition. Chapman & Hall Press, New York, 571 pp.

Gouni-Berthold I and Sachinidis A (2004) Molecular mechanisms explaining the preventive effects of catechins on the development of proliferative diseases. *Current Pharmaceutical Design* 10:1261–1271.

Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB and Kale PG (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis* 6:153-188.

Graf U, Abraham SK, Guzmán-Rincón J and Würgler FE (1998) Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 402:203-209.

Graf U, Frei H, Kägi A, Katz AJ and Würgler FE (1989) Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research* 222:359-373.

Graf U and van Schaik N (1992) Improved high bioactivation cross for the wing somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 271:59-67.

Graham HN (1992) Green tea composition, consumption and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine* 21:334-350.

Gramza A and Korczak J (2005) Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science and Technology* 16:351-358.

Guzmán-Ricón J and Graf U (1995) *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth FM et al. (eds). *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental changes*. Plenum Press, New York, p.169-181.

Halliwell B and Gutteridge JMC (1999) Free radicals in biology and medicine. 3rd edition. Clarenton Press, Oxford, 936 pp.

Hallström I (1986) Genetic regulation of the cytochrome P-450 in *Drosophila melanogaster*. Progress in Clinical and Biological Research 209:419-425.

Han C and Xu Y (1990) The effect of Chinese tea on the occurrence of esophageal tumors induced by N-nitrosobenzylamine in rats. Biomedical and Environmental Science 3:35-42

Happle R (1999) Loss of heterozygosity in the human skin. Journal of the American Academy of Dermatology 41:143-164.

Havsteen BN (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology and Therapeutics 96:67-202.

Heim KE, Tagliaferro AR and Bobilya DJ (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry 13:572-584.

Higdon J and Frei B (2003) Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 43:89-143.

Hirose M, Hoshiya T, Akagi K, Takahashi S, Hara Y and Ito N (1993) Effects of green tea catechin in a rat multi-organ carcinogenesis model. Carcinogenesis 14:1549-1553.

Hodgson JM, Croft KD, Mori TA, Burke V, Beilin LJ and Puddey IB (2002) Regular ingestion of tea does not inhibit in vivo lipid peroxidation in humans. The Journal of Nutrition 132:55-58.

Hoffmann GR (1994) Induction of genetic recombination: consequences and model systems. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 24:59-66.

Hong J, Smith TJ, Ho CT, August DA and Yang CS (2001) Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochemical Pharmacology* 62:1175-1183.

Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ and Joenje H (1990) Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacology and Therapeutics* 47:219-231.

Kuss F (2005) Agentes oxidantes e antioxidantes: Seminário de Bioquímica do tecido animal, <http://www.ufrgs.br> (Jun. 17, 2007) LEM Software http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/ag_oxid_antioxid.pdf

Lampe JW (1999) Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *American Journal Clinical Nutrition* 70:475-490.

Lee J, Koo N and Min DB (2004) Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3:21-33.

Leenen R, Roodenburg AJC, Tijburg LBM and Wiseman AS (2000) A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *European Journal of Clinical Nutrition* 54:87-92.

Lehmann M, Franco A, Vilar KSP, Reguly, ML and Andrade HHR (2003) Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research-Genetic Toxicology* 539:167-175.

Lim P, Wuenschell GE, Holland V, Lee DH, Pfeifer GP, Rodriguez H and Termini J (2004) Peroxyl radical mediated oxidative DNA base damage: implications for lipid peroxidation induced mutagenesis. *Biochemistry* 43:15339-15348.

Lindsley DL and Zimm GG (1992) The genome of *Drosophila melanogaster*. 1st edition. Academic Press, San Diego, 1133 pp.

Lorenzi H and Matos FJA (2002) Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Instituto Plantarum Press, Nova Odessa, 544 pp.

Lotito S and Fraga CG (2000) Catechins delay lipid oxidation and α -tocopherol and β -carotene depletion following ascorbate depletion in human plasma. *Society for Experimental Biology and Medicine* 225:32-38.

Luximon-Ramma A, Bahorun T and Crozier A (2003) Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83:496-502.

Macheix JJ, Fleuriet A and Billot J (1990) Fruit phenolics. CRC Press, Florida, 392 pp.

Mahan LK and Escott-Stump S (2005) Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 11rd edition. Rocca Press, São Paulo, 1242 pp.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C and Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79:727-747.

Manfredini V, Martins VD and Benfato MS (2004) Chá verde: Benefícios para a Saúde Humana. Infarma Press, Porto Alegre 16:68-72.

Mazza G (1998) Functional foods: biochemical and processing aspects. Technomic Publishing, Lancaster, 460 pp.

Mckay DL, Blumberg JB (2002) The role of tea in human health: an update. *Journal of the American College of Nutrition* 21:1-13.

Moraes-de-Souza RA (2007) Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba - SP, 59 pp.

Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez JM, Sineiro J, Dominguez H, Nuñez MJ and Parajó JC (2001) Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72:145-171.

Nakachi K, Eguchi H and Imai K (2003) Can teatime increase one's lifetime? *Ageing Research Reviews* 2:1-10.

Nepomuceno JC (2005) Diet and cancer: antioxidant vitamins. *Bioscience Journal* 2:141-146.

Odontuya G, Hoult JRS and Houghton PJ (2005) Structure-activity relationship for antiinflammatory effect of luteolin and derived glycosides. *Phytotherapy Research* 19:782-786.

Panza VSP (2007) Efeito do Consumo de Chá Verde no estresse oxidativo em praticantes de Exercício Resistido. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis - SC, 143 pp.

Pfizer Itália S.r.L. (2006) ADRIBLASTINA® RD: pó liofilizado. Bula de remédio.

Picada JN, Kern AL, Ramos LLP and Saffi J (2003) O estresse oxidativo e as defesas antioxidantes. In: Erdtmann B, Silva J, Henriques JAP. *Genética Toxicológica*. 1st edition. Alcance Press, Porto Alegre, pp 251-264.

Picard DND (1996) The Biochemistry of green tea polyphenols and their potential application in Human Skin Cancer. *Alternative Medicine Review* 1:31-38.

Piccin E (2004) Determinação de polifenóis totais utilizando sistemas de análise por injeção em fluxo. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP, 98 pp.

Pollonio MAR (2000) Alimentos funcionais: as recentes tendências e os envolvidos no consumo. *Higiene Alimentar* 14:26-31.

Rah DK, Han DW, Baek HS, Hyon SH and Park JC (2005) Prevention of reactive oxygen species-induced oxidative stress in human microvascular endothelial cells by green tea polyphenol. *Toxicology Letters* 155:269-275.

Rice-Evans CA, Miller NJ and Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20:933-956.

Robbers JE, Speedie MK and Tyler VE (1999) *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. Premier Press, São Paulo, 372 pp.

Saffari Y and Sadrzadeh SMH (2004) Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage *in vitro*. *Life Sciences* 74:1513-1518.

Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP and Rice-Evans CA (1995) Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chainbreaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 322:339-346.

Schmitz W, Saito AY, Estevão D and Saridakis HO (2005) Green tea as a chemoprotector. *Seminário de Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina – PR*, 26:119-130.

Setlow RB (2001) Human cancer. *Mutation Research* 477:1-6.

Sgarbieri VC and Pacheco MTB (1999) Physiologically Functional Foods. Review. Brazilian Journal of Food Technology 2:7-19.

Shami NJIE and Moreira EAM (2004) Licopeno como agente antioxidante. Revista de Nutrição 17:227-236.

Shi ST, Wang ZY, Smith TJ, Hong JY, Chen WF, Ho CT and Yang CS (1994) Effects of green tea and black tea on 4-(methylnitrosamino)-1(3-pyridyl)-1-butanone bioactivation, DNA methylation, and lung tumorigenesis in A/J mice. Cancer Research 54:4641-4647.

Sies H (1993) Strategies of antioxidant defence. European Journal of Biochememistry 215:213-219.

Sies H and Stahl W (1995) Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. American Journal of Clinical Nutrition 62:1315-1321.

Sikic BI (2005) Fármacos Antineoplásicos. In: Craig CR and Stitzel RE Farmacologia Moderna com Aplicações Clínicas. 6rd edition. Guanabara Koogan Press, Rio de Janeiro, pp 601-618.

Skrzydłewska E, Farbiszewski R, Michalak K and Ostrowska J (2002) Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology 9:232-238.

Soares DG, Andreazza AC and Salvador M (2005) Evaluation of compounds with antioxidant activity in *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 41:95-100.

Song DU, Jung YD, Chay KO, Chung MA, Lee KH, Yang SY, Shin BA and Whan AB (2002) Effect of drinking green tea on age-associated accumulation maillard-

type fluorescence and carbonyl groups in aortic and skin collagen. Archives of Biochemistry and Biophysics 397:424-429.

Steinmetz KA and Potter JD (1996) Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. Journal of the American Dietetic Association 96:1027-1039.

Sung H, Nah J, Chun S, Park H, Yang SE and Min WK (2000) *In vivo* antioxidant effect of green tea. European Journal of Clinical Nutrition 54:527-529.

Suzuki DT, Griffiths, AJF, Miller JH, Lewontin RC and Gelbart WM (2002) Introdução a Genética. 7rd edition. Guanabara Koogan Press, Rio de Janeiro, 794 pp.

Trevisanato SI and Kim YI (2000) Tea and Health. Nutrition Reviews 58:1-10.

Trueba GP and Sanchez GM (2001) Los flavonóides como antioxidantes naturales. Acta Farmacologia Bonaerense 20:297-306.

Uesato S, Kitagawa Y, Kamishimoto M, Kumagai A, Hori H and Nagasawa H (2001) Inhibition of green tea catechins against the growth of cancerous human colon and hepatic epithelial cells. Cancer Letters 170:41-44.

Valadares BLB (2002) Ação anti-recombinogênica da própolis contra efeitos genotóxicos da doxorubicina em *Drosophila melanogaster*. Dissertação de Mestrado: Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG, 68 pp.

Valadares, BLB, Graf U and Spanó MA (2008) Inhibitory effect of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. Food and Chemical Toxicology 46:1103-1110.

van Acker SABE, van den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJF and Bast A (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radical Biology and Medicine 20:331-342.

Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA, van den Brandt PA and van Poppel G (1997) A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chemical-Biological Interactions* 103:79-129.

Vogel EW (1987) Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy. *Mutagenesis* 2:161-171.

Wang ZY, Huang MT, Ferraro T, Wong CQ, Lou WR, Reuhl K, Yang CS and Conney AH (1992) Inhibitory effect of green tea in the drinking water on tumorigenesis by ultraviolet light and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in the skin of SKH-1 mice. *Cancer Research* 52:1162-1174.

Wattenberg LW (1997) An overview of chemoprevention: current status and future prospects. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 216:133-141.

Weisburger JH (1997) Tea and health: a historical perspective. *Cancer Letters* 114:315-317.

Weisburger JH and Chung FL (2002) Mechanisms of chronic disease causation by nutritional factors and tobacco products and their prevention by tea polyphenols. *Food and Chemical Toxicology* 40:1145-1154.

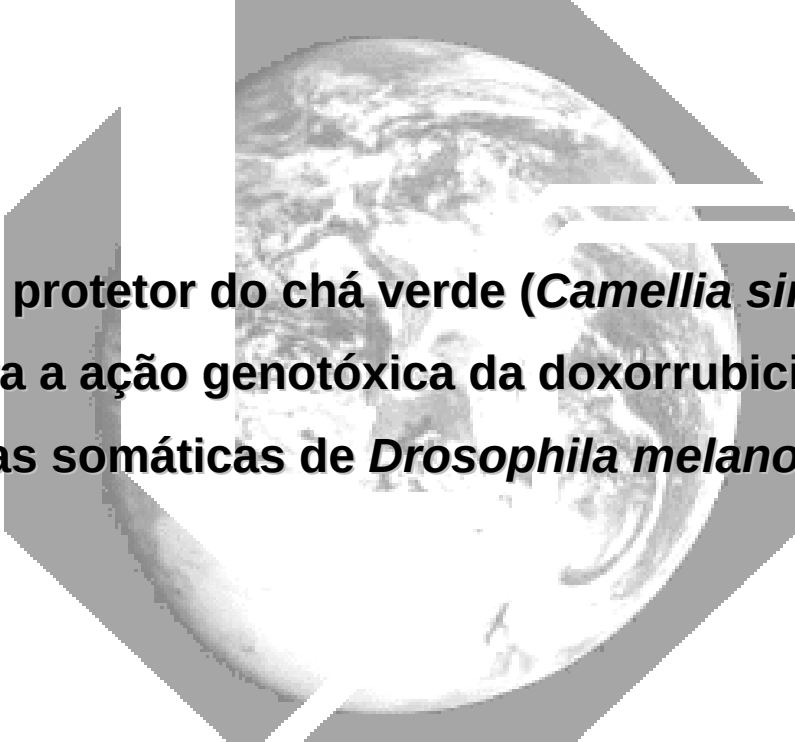
Wilhelm Filho D, Silva EL and Boveris A (2001) Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: Yunes RA and Calixto JB *Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal*. Argos Press, Chapecó, pp 317-334.

Williams RJ, Spencer JPE and Rice-Evans C (2004) Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine* 36:838-849.

Xu KY, Zweier JL and Becker LC (1997) Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circulation Research* 80:76-81.

Zaveri NT (2006) Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sciences* 78:2073–2080.

Capítulo II



**Efeito protetor do chá verde (*Camellia sinensis*)
contra a ação genotóxica da doxorubicina em
células somáticas de *Drosophila melanogaster***

**Protective effects of green tea (*Camellia sinensis*) against
genotoxic action of doxorubicin in somatic cells of
*Drosophila melanogaster***

Sumário

Capítulo II

	Página
Resumo	45
Abstract	46
Introdução	47
Material e Métodos	49
Compostos químicos	49
Preparação do extrato	49
Teste para detecção de Mutação e Recombinação (SMART) em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	49
Preparação e análise microscópica das asas	50
Análise estatística	50
Resultados e Discussão	51
Referências Bibliográficas	60

Resumo

O chá verde (CV) é considerado um alimento funcional com atividade antioxidante, que retarda o processo de envelhecimento e auxilia na prevenção de doenças crônicas e degenerativas, como o câncer e doenças cardiovasculares. As catequinas, presentes neste chá, podem inativar os radicais livres que causam danos na molécula de DNA e dessa maneira, prevenir a citotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo, em diferentes tecidos, atuando no processo de quimioprevenção. Neste estudo dois diferentes cruzamentos, ST e HB foram utilizados para avaliar o efeito do CV em três diferentes concentrações (25, 50 e 75mg/mL) combinados com um agente tumoral, doxorrubicina (DXR), de comprovada ação genotóxica; através do teste para detecção de manchas (SMART) na asa de *Drosophila melanogaster*. Os resultados obtidos demonstram que para os descendentes MH não houve aumento, estatisticamente significativo, nas frequências de manchas, nos indivíduos tratados apenas com CV, tanto no cruzamento padrão (ST) quanto no cruzamento de alta bioativação (HB - caracterizado pelo alto nível constitutivo de citocromo 450). Contudo, foi observada uma redução, estatisticamente significativa, no total de manchas mutantes, nos descendentes MH, de ambos os cruzamentos (ST e HB), em todas as concentrações do CV quando associadas com a DXR. Estes resultados sugerem que o CV não possui efeito genotóxico, e, apresenta efeito protetor contra a ação mutagênica e recombinogênica induzida pela DXR em células somáticas de *D. melanogaster*, nas concentrações experimentais utilizadas neste estudo.

UNITERMOS: genotoxicidade, antigenotoxicidade, SMART, teste da mancha da asa.

Abstract

The green tea is considered a functional food with antioxidant activity, and this delays the process of old age and helps in the prevention of chronicle and degenerative diseases, such as cancer and heart affections. Of catechins, present in green tea, may is extremely important in the inactivation of free radicals, which provoke damages to the DNA molecules and to the cell membranes prevent the cytotoxicity induced by the oxidative stress in different tissues, by actuating in the process of chemoprevention. In this study two crosses, ST and HB aimed at evaluating the protective effects of green tea in three different concentrations (25, 50 e 75mg/mL), combined with the antitumor agent, doxorubicin (DXR), of the genotoxic action; by the of wing spot test (SMART) of *Drosophila melanogaster*. The results obtained demonstrated that in MH descendants there was not a statistically significant increase in the frequencies of spots, in the individuals treated with green tea, in standard cross (ST) as well as in the high bioactivation cross (HB - characterized by a high constitutive level of cytochrome P450) . However we could observe a statistically significant decrease in the sum of mutant spots, in MH descendants of both crossings (ST and HB), in all concentrations of green tea associated to DXR. These results suggest that green tea does not present genotoxic effect, but presents protective affect against the mutagenic and recombinagenic action of DXR in the somatic cells of *D. melanogaster*, in the experimental concentrations used in this study.

Keywords: genotoxic, antigenotoxic, SMART, wing spot test.

Introdução

O chá verde (CV) é uma bebida preparada a partir da infusão de folhas da planta *Camellia sinensis* (*Ericales*, *Theaceae*), sendo constituído por diversas classes de compostos fenólicos, como: flavanóis e ácidos fenólicos, correspondentes a 30% do peso seco das folhas de *C. sinensis* (Picard, 1996), além de ácido caféico (cafeína), pigmentos, carboidratos, aminoácidos e outras substâncias (Hong et al., 2001). Os flavonóides e as catequinas são os principais componentes químicos terapêuticos da planta *C. sinensis*, sendo potentes antioxidantes, seqüestradores de radicais livres, quelantes de metais e inibidores da peroxidação lipídica (Yang; Prabhu e Landau, 2000).

Os flavonóides constituem a classe de compostos fenólicos mais abundantes na dieta humana, sendo encontrados em uma grande variedade de frutas, hortaliças e bebidas, como o CV (Manach et al., 2004). O consumo de uma dieta rica em polifenóis está associado à redução no risco do desenvolvimento de câncer e doenças cardiovasculares (Mckay e Blumberg, 2002). Sendo ainda destacadas as ações antioxidante, antiinflamatória, antialérgica e anticarcinogênica destes compostos (Zuanazzi, 2002).

Os principais flavanóis presentes no CV são a catequina (C), a galocatequina (GC), a epicatequina (EC), a epigalocatequina (EGC), a epicatequina galato (ECG) e a epigalocatequina galato (EGCG) (Balentine, 1992).

Pesquisas evidenciam a atuação do CV em neoplasias malignas. De acordo com Katiyar e Elmets (2001) o extrato de CV, inibe a formação de tumores de pele induzidos por carcinógenos químicos ou pela radiação UVB, tendo como principal responsável pela quimioproteção o flavanol EGCG.

O papel do CV na prevenção de tumores malignos foi constatado ainda em estudos feitos por Nakachi, Eguchi e Imai (2003), onde, durante 13 anos, observaram que uma população com idade inferior a 79 anos, que consumia quantidades elevadas de CV, apresentava uma redução significativa no número de mortes por câncer e doenças relacionadas com o envelhecimento.

A atividade quimioprotetora do CV foi verificada, também, por meio de estudos epidemiológicos, que relatam a baixa incidência de câncer de mama e

próstata nos japoneses e populações chinesas, que consomem regularmente o CV (Adhami; Ahmad e Mukhtar, 2003; Park e Surh, 2004).

O cloridrato doxorubicina (DXR) é um agente antineoplásico composto por metilparabeno, lactose além da doxorubicina, isolado de culturas de *Streptomyces peucetius var. caesius*. É usado restritamente por hospitais clínicas de Oncologia com emprego específico em neoplasias malignas (Gilman et al., 1996), especialmente em leucemias agudas, linfomas, sendo ainda um dos agentes mais eficazes no tratamento quimioterápico dos carcinomas de mama, ovário, endométrio, bexiga, pulmão e outros.

A DXR é capaz de gerar radicais livres e esta capacidade é considerada primordial, pois, inviabiliza o processo de divisão celular, desencadeando um mecanismo citotóxico que fornece o efeito antitumoral a este agente. No entanto, pelo fato da DXR ser ativa durante todo o ciclo celular, provoca efeitos antiproliferativos tanto aos tecidos neoplásicos, quanto aos tecidos normais, sendo por isso, genotóxica em células não tumorais (Keizer et al., 1990).

Em *Drosophila melanogaster*, a DXR induz mutações e recombinações em células somáticas, detectadas pelo teste da mancha da asa (SMART) (Lehman et al., 2003; Costa e Nepomuceno, 2006; Fragiorgis et al., 2007; Valadares et al., 2008). O SMART baseia-se no fato que, durante o início do desenvolvimento embrionário da *D. melanogaster*, grupos de células (discos imaginais) proliferam mitoticamente até se diferenciarem em estruturas do corpo da mosca adulta (olhos, asas, etc.). Se ocorrer uma alteração genética em uma das células do disco imaginal, esta alteração formará um clone de células mutantes que será detectado como uma mancha de pêlos mutantes, na asa da mosca adulta (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

Utilizando o SMART como sistema teste este trabalho teve como objetivo avaliar a possível ação antigenotóxica do CV, contra a ação genotóxica da DXR (0,125mg/mL), geradora de radicais livres.

Material e Métodos

Compostos químicos

Cloridrato de doxorubicina (DXR, CAS 23214-92-8), conhecido comercialmente como Doxolem, lote nº 81166, fabricado por Eurofarma Laboratórios Ltda e distribuído pela Zodiac Produtos Farmacêuticos S/A, São Paulo, Brasil.

Preparação do extrato

O Chá verde (CV) (*Camellia sinensis*), na forma de folhas, fabricado por Flores & Ervas Produtos Naturais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil, lote nº 009107, foi adquirido em farmácia local. O extrato aquoso foi preparado na forma de infusão, pelo fato deste método ser o mais comumente utilizado pela população. Foram feitas três preparações de infusões 2,5g, 5,0g e 7,5g de folhas secas para 100 mL de água osmose reversa. As infusões foram feitas de acordo com o regulamento técnico destinado à preparação de infusões (Anvisa, 2008). Os extratos permaneceram em repouso durante 30 minutos e posteriormente foram filtrados com gaze estéril. Os extratos, nas concentrações finais de 25, 50 e 75 mg/mL, foram utilizados imediatamente após a preparação.

Teste para detecção de Mutação e Recombinação (SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

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

Nos experimentos realizados foram efetuados dois tipos de cruzamentos: Cruzamento Padrão (“ST- Standard Cross”) utilizando fêmeas virgens *flr*³/*ln*(3 LR)TM3, *ri pp sep l*(3)89Aa *bx*^{34e} e *Bd*^s, cruzadas com machos *mwh/mwh* (Frölich e Würgler, 1989); e Cruzamento de Alta Capacidade de Bioativação (“HB- High Bioactivation Cross”) cruzando fêmeas virgens *ORR* / *ORR*; *flr*³/*ln*(3 LR)TM3, *ri p*^p *sep l*(3)89Aa *bx*^{34e} e *Bd*^s com machos *mwh/mwh* (Graf et al., 1984).

Após 48 horas do início dos cruzamentos foi realizada a ovoposição, por um período de 8 horas, em frascos contendo uma base sólida de ágar (4% de ágar em água) e uma camada de fermento biológico (*Sacharomyces cerevisiae*) suplementado com açúcar. Após 72 +/- 4 horas, as larvas do 3º estágio foram lavadas com água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina.

Grupos com cerca de 100 larvas foram transferidos para frascos de vidro de 25 mL, contendo 1,5 g de meio alternativo de purê de batatas (marca Yoki® Alimentos S.A, lote nº. B2LC7F1) e CV (25, 50 e 75mg/mL) associados ou não com DXR (0,125mg/mL). Esta concentração de DXR é conhecida como sendo genotóxica para a *Drosophila* no teste SMART (Fragiorge et al., 2007; Costa e Nepomuceno, 2006) e as concentrações de CV são similares às aquelas usadas pela população. Larvas também foram tratadas, apenas com 0,125 mg/mL de DXR, como controle positivo, e água osmose reversa (estéril) como controle negativo. Pelo fato dos possíveis compostos serem fotossensíveis todos os frascos do tratamento foram envolvidos com papel alumínio.

Preparação e análise microscópica das asas

Após se alimentarem do meio teste e completar as etapas de desenvolvimento (metamorfose) as moscas adultas foram coletadas e conservadas em etanol 70%. As moscas preservadas tiveram suas asas destacadas com o auxílio de pinças entomológicas e estas foram estendidas aos pares sobre lâminas. Para fixação das asas foi utilizada solução de Faure (30g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50g de hidrato de cloral e 50 mL de água destilada). Para análise microscópica das asas foi utilizado microscópio óptico de luz, com aumento de 400X, onde foram registrados o número e os tipos de manchas encontradas (Graf et al., 1998).

Análise estatística

Para avaliar a ação genotóxica do CV foi realizada a análise dos dados experimentais, por meio do teste Binomial Condicional de Kastenbaum e Bowman descrito por Frei e Würgler (1988). Para a análise estatística de antigenotoxicidade, as frequências de cada tipo de mancha por mosca, foram

comparadas aos pares (controle negativo versus CV; DXR isoladamente versus CV + DXR), usando o teste *U* de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würigler, 1995).

Resultados e Discussão

Pesquisas recentes estimam a existência de mais de 8000 citações que relatam os potenciais benefícios apresentados pelo CV (*Camellia sinensis*) em relação à saúde humana (Nagle et al., 2006). Alguns destes estudos, tanto epidemiológicos quanto em modelos animais sugerem que o CV pode reduzir o risco de vários tipos de câncer, como: pele, mama, próstata e pulmão (Mukhtar e Ahmad, 2000).

Em adição às propriedades quimiopreventivas, o CV e seu principal constituinte, a epigallocatequina galato (EGCG), podem oferecer proteção contra doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento (Mandel et al., 2004), prevenir a angiogênese (Pfeffer et al., 2003), apresentando ainda, benefícios contra doenças cardiovasculares (Sano et al., 2004), propriedades antibacterianas (Stapleton et al., 2004), anti-HIV (Nance e Shearer, 2003), antiinflamatórias (Dona et al., 2003) e benefícios no emagrecimento e controle do diabetes (Tsuneki et al., 2004).

Neste estudo foram analisadas aproximadamente 24.400 células em cada asa de *D. melanogaster* e a análise estatística forneceu as Tabelas I e II que demonstram as freqüências de manchas mutantes: simples pequenas (MSP), simples grandes (MSG), manchas gêmeas (MG) e o total de manchas (TM) em asas de *D. melanogaster*. As Tabelas informam ainda a freqüência de indução de manchas (10^5) sem correção e corrigida pelo controle.

A Tabela I apresenta os resultados das freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH descendentes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB), tratados com CV em três diferentes concentrações (25, 50 e 75 mg/mL) e os controles positivo (DXR 0,125 mg/mL) e negativo (água osmose reversa).

Os dados desta Tabela mostram que não houve aumento estatisticamente significativo ($\alpha > 0,05$), nas freqüências de manchas induzidas

pelo CV, quando comparadas com o controle negativo, em ambos os cruzamentos, o que demonstra que o CV não apresenta potencial genotóxico.

A Tabela II mostra a frequência de manchas mutantes, observadas nos descendentes MH e BH provenientes dos cruzamentos ST e HB, tratados com CV nas três diferentes concentrações (25, 50 e 75mg/mL) associadas a DXR 0,125 mg/mL. Os resultados apontam um aumento estatisticamente significativo ($\alpha < 0,05$), nas frequências de manchas simples grandes, manchas gêmeas e total de manchas, nos descendentes MH, tanto do cruzamento ST quanto do HB, tratados com DXR. Este aumento, nas frequências de manchas mutantes, reforça os relatos de genotoxicidade deste quimioterápico.

Por outro lado, os tratamentos associados de CV e DXR, produziram respostas que foram significativamente menores que o tratamento conduzido somente com DXR. Esta redução, induzida pelo CV, foi observada no total de manchas, nos descendentes MH, de ambos os cruzamentos (ST e HB), em todas as concentrações do CV, o que sugere uma ação antigenotóxica do chá verde.

Analisando as asas dos indivíduos BH com a presença do cromossomo *TM3 (mwh/TM3)*, é possível separar a taxa de eventos correspondentes à mutação da taxa de recombinação, porque os eventos do tipo recombinação são letais e, portanto, inviáveis nas células das moscas com este genótipo. Na análise dos descendentes BH, do cruzamento ST verifica-se, nas moscas tratadas somente com DXR, uma frequência de clones mutantes que corresponde a 8,8% de mutação e 91,2% de recombinação. Esta forte atividade recombinogênica da DXR, em células somáticas de *D. melanogaster* já havia sido descrita por Lehmann et al. (2003), Costa e Nepomuceno (2006) e Fragiorgio et al. (2007).

Verifica-se, ainda, na Tabela II reduções, estatisticamente significativas, nas frequências de manchas gêmeas nos descendentes MH de ambos cruzamentos para todas as concentrações de CV. Esses resultados indicam uma possível atividade antirecombinogênica do CV, que foi confirmada pela análise dos descendentes BH. Quando larvas, descendentes do cruzamento ST, foram tratadas com DXR em combinação com as concentrações 25, 50 e 75mg/mL de CV apresentaram 21,9%, 29,2% e 15,7% de mutação, enquanto para eventos recombinogênicos a porcentagem foi de 78,1%, 70,8% e 84,3% respectivamente, como mostra a Figura 1.

Para os descendentes do cruzamento HB, tratados com DXR foi verificada uma taxa de 7,9% de mutação e 92,1% de recombinação. Os descendentes do cruzamento HB tratados com DXR em combinação com 25, 50 e 75 mg/mL de CV apresentaram, respectivamente, 85,8%, 89,8% e 73,8% dos clones mutantes devido a recombinação (Figura 2). Tais valores revelam que o CV apresentou potencial antirecombinogênico quando comparado ao quimioterápico DXR.

Os mecanismos usados pelo CV para inibir a genotoxicidade da DXR não foram analisados diretamente. Contudo, é sabido que um dos mecanismos da DXR é o de gerar radicais de oxigênio livres, ocasionando estresse oxidativo na célula tumoral (Keizer et al., 1990). Estudos feitos por esses autores demonstraram que a administração de agentes antioxidantes ou quimioprotetores, é capaz de inibir os danos induzidos pela DXR. Com isso, a atividade antioxidante do CV, relatada por vários autores (Sung et al., 2000; Dhawan et al., 2002; Zaveri, 2006; Moraes-de-Souza, 2007), é um possível mecanismo de ação contra os efeitos genotóxicos provocados pela DXR.

Mustata et al. (2005) mostraram que o CV apresenta polifenóis, como: catequina, ácido gálico, epicatequina, epigallocatequina, epigallocatequina galato e epicatequina galato que apresentam atividade antioxidante maior que as vitaminas C e E.

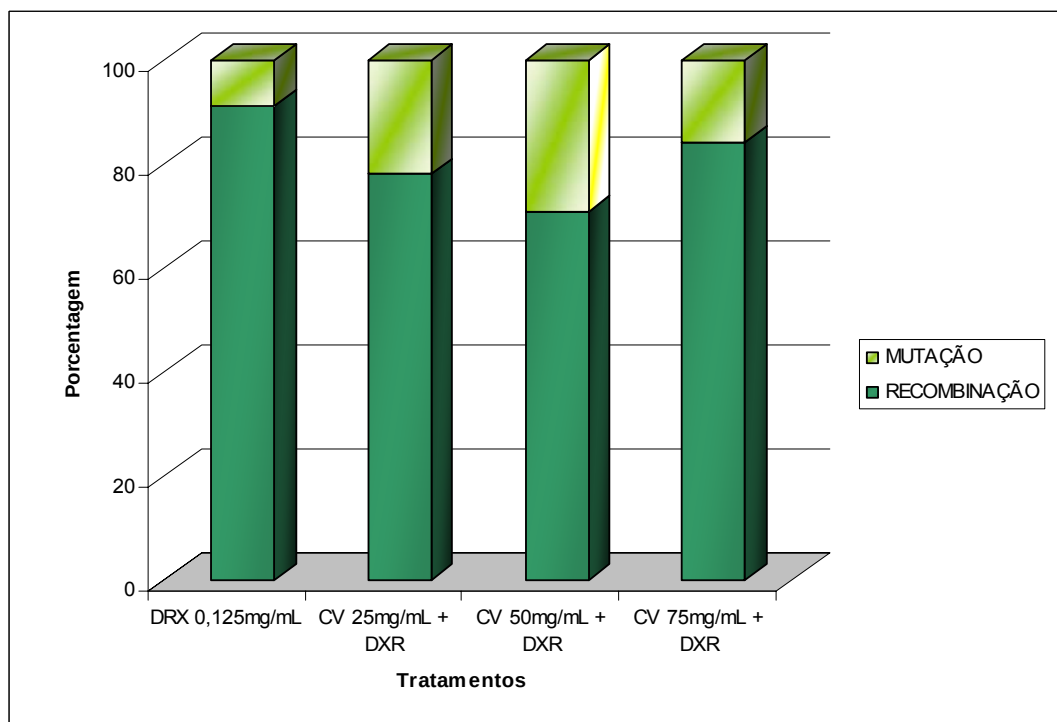


Figura 1. Porcentagem de mutação e recombinação gênica nos descendentes ST, tratados com DXR (0,125mg/mL), isoladamente e associada a diferentes concentrações de CV.

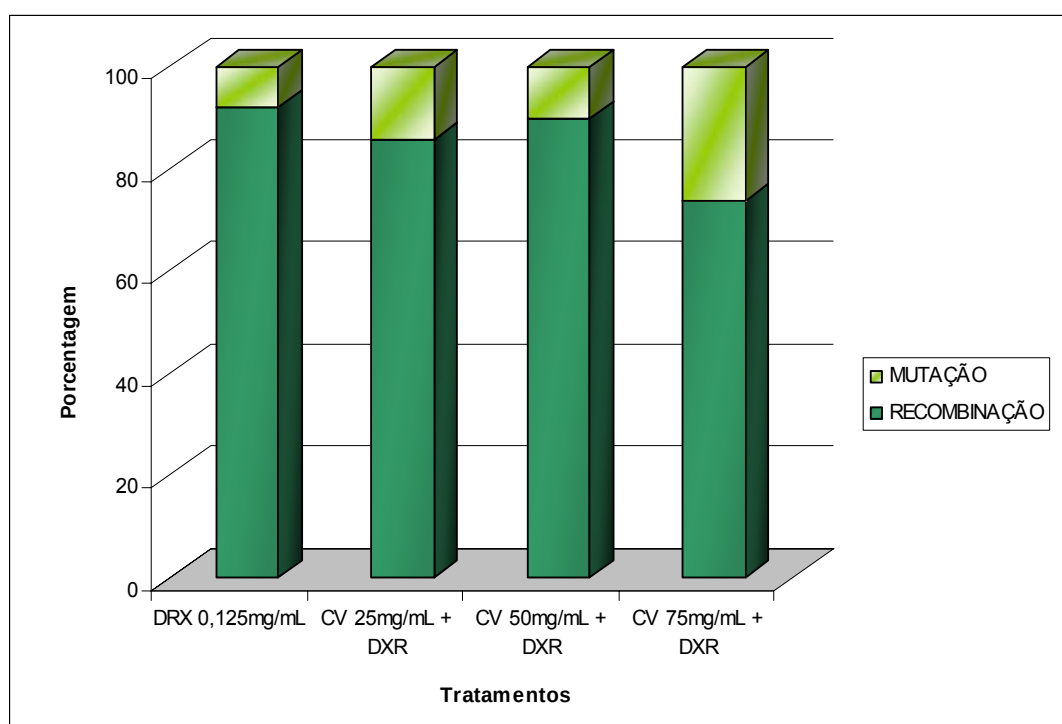


Figura 2. Porcentagem de mutação e recombinação gênica nos descendentes HB, tratados com DXR (0,125mg/mL), isoladamente e associada a diferentes concentrações de CV.

Em 1992 Hayatsu e colaboradores já investigavam o potencial antimutagênico do CV, usando testes em *Drosophila*. Neste estudo, a epigalo catequina galato (EGCG), componente do CV, suprimiu a ação mutagênica de carcinógenos. Os autores testaram o 2-hydroxyamino-6-methyldipyrido [1,2-a:3', 2' -d] imidazole ou Glu-P-1(NHOH) e também o 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido-[4,3-b] indole ou Trp-P-2(NHOH) em culturas de células FM3A em ratos, mostrando que a EGCG foi efetiva em reduzir a mutagenicidade ocasionada por estes compostos.

O ácido caféico, um dos componentes do CV descrito por Hong et al. (2001) foi estudado por Karekar et al. (2000) como antioxidante através dos testes de Ames e de mancha de asa de *Drosophila melanogaster* (SMART). Nesse estudo o ácido caféico demonstrou efeito antimutagênico contra aflatoxina B₁, usando *Salmonella typhimurium*. Pelo teste da mancha da asa este componente do CV apresentou ausência de efeitos mutagênicos quando testado isoladamente, o que coincide com os resultados deste trabalho. Em associação com a aflatoxina B₁, apresentou redução significativa de manchas.

A capacidade antioxidante do CV foi demonstrada por Sung et al. (2000) com experimentos *in vivo*, que revelaram esta propriedade em seres humanos, que consumiram grandes quantidades de CV. Saffari e Sadrzadeh (2004) também investigaram e comprovaram a capacidade antioxidante da EGCG usando membranas de eritrócitos humanos.

Estudos feitos por Cai et al. (2002) confirmaram a atividade antioxidante do CV em microsomos de fígado de ratos. O extrato de CV também inibiu a formação de tumores de pele, induzidos por carcinógenos químicos e radiação UVB em ratos. Essa atividade foi atribuída à capacidade antioxidante de redução na formação de radicais livres do principal constituinte do CV, a EGCG, conforme mostram Katiyar e Elmets (2001).

A diminuição na frequência de manchas mutantes nos tratamentos que associaram CV à DXR pode ser atribuída ainda, à ativação da via de apoptose. Yang et al. (2000) confirmam que o CV atua no aumento da apoptose, o que é fundamental para sua ação quimiopreventiva. Da mesma maneira, estudos realizados por Saeki et al. (2000) detectaram a capacidade das catequinas de induzirem apoptose em células de linfoma de histiócitos humanos.

A indução da apoptose, por EGCG, em células tumorais, ocorre segundo Gupta et al. (2004) por meio da inibição do fator NF- κ B (fator nuclear *kappa* B – componente da via de ativação que regula a expressão de genes anti-apoptóticos), resultando em ativação das caspases e inibição de NF κ B, o que ocasiona a apoptose.

Mittal et al. (2004) verificaram em suas pesquisas que a EGCG inibiu de 20 a 100% a divisão das células de carcinoma de mama e não interferiu no crescimento das células normais. A EGCG aumentou a porcentagem de apoptose em até 51%. Estes pesquisadores propõem que o mecanismo de indução de apoptose pode ser pela inibição da telomerase e diminuição da expressão do mRNA de hTERT, uma subunidade catalítica desta enzima.

Assim, os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que, nas condições experimentais citadas, a DXR induz mutação e recombinação em células somáticas de *Drosophila melanogaster* e que o CV além de não possuir efeito genotóxico, apresenta efeito protetor contra a ação recombinogênica da DXR nas concentrações testadas.

Tabela I. Frequência de manchas observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB), tratados com chá verde (CV) em três diferentes concentrações

DXR (mg/mL)	CV (mg/mL)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (No. de manchas) diag. Estatístico ^a										Total manchas mwh ^c (n)		
			MSP (1-2 cels) ^b		MSG (>2 cels) ^b		MG		TM						
			<i>m</i> = 2		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 5		<i>m</i> = 2						
Cruzamento ST															
<i>mwh/flr</i> ³															
0	0	40	0,53	(21)		0,20	(08)		0,00	(00)		0,73	(29)		29
0,125	0	40	0,70	(28)	i	1,13	(45)	+	0,98	(39)	+	2,80	(112)	+	107
0	25	40	0,85	(34)	i	0,05	(02)	-	0,00	(00)	i	0,90	(36)	-	36
0	50	40	0,83	(33)	i	0,08	(03)	-	0,03	(01)	i	0,93	(37)	i	37
0	75	40	0,70	(28)	i	0,10	(04)	-	0,00	(00)	i	0,80	(32)	-	32
Cruzamento HB															
<i>mwh/flr</i> ³															
0	0	20	1,40	(28)		0,05	(01)		0,00	(00)		1,45	(29)		29
0,125	0	20	1,70	(34)	-	2,60	(52)	+	1,60	(32)	+	5,90	(118)	+	114
0	25	20	1,65	(33)	-	0,20	(04)	i	0,00	(00)	i	1,85	(37)	-	36
0	50	20	1,65	(33)	-	0,05	(01)	i	0,05	(01)	i	1,75	(35)	-	35
0	75	20	1,55	(31)	-	0,10	(02)	i	0,10	(02)	i	1,75	(35)	-	35

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo em relação ao controle negativo; -, negativo; i, inconclusivo;

m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância a = b = 0,05

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

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

Tabela II. Frequência de manchas observadas nos descendentes trans-heterozigotos (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) e de alta bioativação metabólica (HB), tratados com chá verde (CV) em três diferentes concentrações e associadas a DXR (0,125 mg/mL)

DXR (mg/mL)	CV (mg/mL)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (No. de manchas) diag. Estatístico ^a										Total manchas mwh ^c (n)	Média das classes de tam. clones mwh ^{c,d} (i)	Frequência de indução de manchas (por 10 ⁵ células por divisão celular) ^f			
			MSP		MSG		MG		TM		S/ correção por tam. ^{d,e} n/NC				C/ correção por tam. ^{d,e} (2 ⁱ⁻²) X (n/NC)			
			(1-2 cels) ^b		(>2 cels) ^b		m = 5		m = 2									
Cruzamento ST																		
mwh/flr ³																		
0	0	40	0,53	(21)	0,20	(08)	0,00	(00)	0,73	(29)	29	2,21	1,49	1,71				
0,125	0	40	0,70	(28) i	1,13	(45) +	0,98	(39) +	2,80	(112) +	107	3,90 {4,53}	5,48 {4,00}	20,42 {23,01}				
0,125	25	40	0,60	(24) -	0,90	(36) -	0,30	(12) *	1,80	(72) *	67	4,04 {5,45}	3,43 {1,95}	14,16 {21,24}				
0,125	50	40	0,70	(28) -	0,60	(24) *	0,33	(13) *	1,63	(65) *	64	3,03 {3,71}	3,28 {1,79}	6,70 {5,88}				
0,125	75	40	0,80	(32) -	0,33	(13) *	0,20	(08) *	1,33	(53) *	51	2,67 {3,27}	2,61 {1,13}	4,15 {2,72}				
mwh/TM ³																		
0	0	30	0,13	(04)	0,03	(01)	g	0,17	(05)	5	1,80	0,34	0,3					
0,125	0	30	0,27	(08) i	0,00	(00) i	0,27	(08) i	7	1,29 {0,00}	0,48 {0,14}	0,29 {0,03}						
0,125	25	30	0,37	(11) i	0,00	(00) i	0,37	(11) i	11	1,36 {1,00}	0,75 {0,41}	0,48 {0,20}						
0,125	50	30	0,47	(14) i	0,00	(00) i	0,47	(14) i	14	1,14 {0,78}	0,96 {0,61}	0,53 {0,26}						
0,125	75	30	0,20	(06) i	0,00	(00) i	0,20	(06) i	6	1,00 {3,00}	0,41 {0,07}	0,2 {0,00}						
Cruzamento HB																		
mwh/flr ³																		
0	0	20	1,40	(28)	0,05	(01)	0,00	(00)	1,45	(29)	29	1,52	2,97	2,13				
0,125	0	20	1,70	(34) -	2,60	(52) +	1,60	(32) +	5,90	(118) +	114	4,22 {5,14}	11,68 {8,71}	54,39 {76,83}				
0,125	25	20	1,75	(35) -	1,30	(26) *	0,95	(19) *	4,00	(80) f+	78	3,28 {4,33}	7,99 {5,02}	19,43 {25,18}				
0,125	50	20	2,20	(44) -	0,80	(16) *	0,55	(11) *	3,55	(71) *	69	2,72 {3,60}	7,07 {4,10}	11,68 {12,42}				
0,125	75	20	1,60	(32) -	0,15	(03) *	0,15	(03) *	1,90	(38) *	38	2,05 {3,78}	3,89 {0,92}	4,04 {3,16}				

<i>mwh/TM³</i>																
0	0	20	0,25	(05)	0,00	(00)	^g	0,25	(05)	5	1,20	0,51	0,29			
0,125	0	20	0,40	(08) i	0,05	(01) i		0,45	(09) i	9	1,44	{1,75}	0,92	{0,41}	0,63	{0,34}
0,125	25	20	0,45	(09) i	0,10	(02) i		0,55	(11) i	11	1,64	{2,00}	1,13	{0,61}	0,88	{0,61}
0,125	50	20	0,35	(07) i	0,00	(00) i		0,35	(07) i	7	1,00	{0,50}	0,72	{0,20}	0,36	{0,07}
0,125	75	20	0,45	(09) i	0,05	(01) i		0,50	(10) i	10	1,20	{1,20}	1,02	{0,51}	0,59	{0,29}

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo em relação ao controle negativo; -, negativo; i, inconclusivo;

Teste U - Mann, Whitney: * = redução estatisticamente significativa (comparado com o controle doxorrubicina 0,125 mg/mL).

m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância a = b = 0,05.

^bIncluindo manchas simples flr3 raras.

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

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

4 - Referências Bibliográficas

Adhami VM, Ahmad N and Mukhtar H (2003) Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention. *Journal of Nutrition* 133:2417-2424.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), <http://www.anvisa.gov.br> (May 13, 2008) LEM Software http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/519_98.htm

Balentine DA (1992) Manufacturing and chemistry of tea. In: Huang M (ed) *Phenolic compounds in food and their effects on health I: analysis, occurrence, and chemistry*. American Chemical Society Press, Washington, pp 102-117.

Cai YJ, Ma LP, Hou LF, Zhou B, Yang L and Liu ZL (2002) Antioxidant effects of green tea polyphenols on free radical initiated peroxidation of rat liver microsomes. *Chemistry and Physics of Lipids* 120:109-117.

Costa WF and Nepomuceno JC (2006) Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and mineral on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47:18-24.

Dhawan A, Anderson D, Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Clifford MN and Loannides C (2002) Evaluation of the antigenotoxic potential of monomeric and dimeric flavanols, and black tea polyphenols against heterocyclic amine-induced DNA damage in human lymphocytes using the Comet assay. *Mutation Research* 515:39-56.

Dona M, Dell'Aica I, Calabrese F, Benelli R, Morini M, Albini A and Garbisa S (2003) Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. *Journal of Immunology* 170:4335-4341.

Fragiorgio EJ, Spanó MA and Antunes LMG (2007) Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Biology* 30:449-455.

Frei H and Würgler FE (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research* 203:297-308.

Frei H and Würgler FE (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research* 334:247-258.

Frölich A and Würgler FE (1989) New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research* 216:179-187.

Gilman AG, Limbird LE and Hardman JG (1996) As bases farmacológicas da terapêutica. 10rd edition. McGraw Hill Press, Rio de Janeiro, 1671 pp.

Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB and Kale PG (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis* 6:153-188.

Graf U, Abraham SK, Guzmán-Rincón J and Würgler FE (1998) Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 402:203-209.

Gupta S, Hastak K, Afaq F, Ahmad N and Mukhtar H (2004) Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis. *Oncogene* 23:2507-2522.

Guzmán-Ricón J and Graf U (1995) *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth FM (ed) *Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental changes*. Plenum Press, New York, p.169-181.

Hayatsu H, Inada N, Kakutani T, Arimoto S, Negishi T, Mori K, Okuda T and Sakata I (1992) Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)-epigallocatechin gallate. *Preventive Medicine* 21:370-376.

Hong J, Smith TJ, Ho CT, August DA and Yang CS (2001) Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochemical Pharmacology* 62:1175-1183.

Karekar V, Joshi S and Shind SL (2000) Antimutagenic prolife of tree antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research* 468:183-194.

Katiyar SK and Elmets CA (2001) Green tea polyphenolic antioxidants and skin photoprotection. *International Journal of Oncology* 18:1307-1313.

Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ and Joenje H (1990) Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacology and Therapeutics* 47:219-231.

Lehmann M, Franco A, Vilar KSP, Regul, ML and Andrade HHR (2003) Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research-Genetic Toxicology* 539:167-175.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C and Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79:727-747

Mandel S, Weinreb O, Amit T and Youdim MB (2004) Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases. *Journal of Neurochemistry* 88:1555–1569.

Mckay DL and Blumberg JB (2002) The role of tea in human health: an update. *Journal of the American College of Nutrition* 21:1-13.

Mittal A, Pate MS, Wylie RC, Tollefsbol TO and Katiyar SK (2004) EGCG down-regulates telomerase in human breast carcinoma MCF-7 cells, leading to suppression of cell viability and induction of apoptosis. *International Journal of Oncology* 24:703-710.

Moraes-de-Souza RA (2007) Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba - SP, 59 pp.

Mukhtar H and Ahmad N (2000) Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *American Journal of Clinical Nutrition* 71:1698–1702.

Mustata GT, Rosca M, Biemel KM, Reihl O, Smith MA, Viswanathan A, Strauch C, Du Y, Tang J, Kern TS, Lederer O, Brownlee M, Weiss MF and Monnier V (2005) Paradoxical Effects of Green Tea (*Camellia sinensis*) and Antioxidant Vitamins in Diabetic Rats. *American Diabetes Association* 54:517-525.

Nagle DG, Ferreira D and Zhou YD (2006) Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry* 67:1849–1855.

Nakachi K, Eguchi H and Imai K (2003) Can teatime increase one's lifetime? *Ageing Research Reviews* 2:1-10.

Nance CL and Shearer WT (2003) Is green tea good for HIV-1 infection? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112:851–853.

Park OJ and Surh YJ (2004) Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies. *Toxicology Letters* 150:43-46.

Pfeffer U, Ferrari N, Morini M, Benelli R, Noonan DM and Albini A (2003) Antiangiogenic activity of chemopreventive drugs. *International Journal of Biological Markers* 18:70–74.

Picard DND (1996) The Biochemistry of green tea polyphenols and their potential application in Human Skin Cancer. *Alternative Medicine Review* 1:31-38

Saeki K, Hayakawa S, Isemura M and Miyase T (2000) Importance of a pyrogallol-type structure in catechin compounds for apoptosis-inducing activity. *Phytochemistry* 53:391-394.

Saffari Y and Sadrzadeh SMH (2004) Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. *Life Sciences* 74:1513-1518.

Sano J, Inami S, Seimiya K, Ohba T, Sakai S, Takano T and Mizuno K (2004) Effects of green tea intake on the development of coronary artery disease. *Circulation Journal* 68:665–670.

Stapleton PD, Shah S, Anderson JC, Hara Y, Hamilton-Miller JM and Taylor PW (2004) Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *International Journal of Antimicrobial Agents* 23:462–467.

Sung H, Nah J, Chun S, Park H, Yang SE and Min WK (2000) *In vivo* antioxidant effect of green tea. *European Journal of Clinical Nutrition* 54:527-529.

Tsuneki H, Ishizuka M, Terasawa M, Wu JB, Sasaoka T and Kimura I (2004) Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans. *BMC Pharmacology* 4:1-10.

Valadares BLB (2002) Ação anti-recombinogênica da própolis contra efeitos genotóxicos da doxorubicina em *Drosophila melanogaster*. Dissertação de Mestrado: Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia – MG, 68 pp.

Valadares, BLB, Graf U and Spanó MA (2008) Inhibitory effect of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. Food and Chemical Toxicology 46:1103-1110.

Yang CS, Prabhu S and Landau J (2000) Prevention of carcinogenesis by tea polyphenols. Drug Metabolism Reviews 33: 37-253.

Zaveri NT (2006) Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. Life Sciences 78:2073–2080.

Zuanazzi JAS (2002) Flavonóides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello GCP, Mentz LA and Petrovick PR Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 2nd edition. UFSC Press, Florianópolis, pp 499-526.