



**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica**

**Investigação das Atividades Mutagênica, Antimutagênica e
Antioxidante de Extratos Etanólicos de *Aiouea trinervis*,
Nectandra cissiflora, *Ocotea minarum* (Lauraceae) e dos
Alcalóides Triptofol, Ocoteína e Dicentrina**

Aluna: Zaira da Rosa Guterres

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

UBERLÂNDIA- MG

2008



**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica**

**Investigação das Atividades Mutagênica, Antimutagênica e
Antioxidante de Extratos Etanólicos de *Aiouea trinervis*,
Nectandra cissiflora, *Ocotea minarum* (Lauraceae) e dos
Alcalóides Triptofol, Ocoteína e Dicentrina**

Aluna: Zaira da Rosa Guterres

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia, como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em Genética e
Bioquímica (Área de concentração: Genética).

UBERLÂNDIA –MG

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- G983i Guterres, Zaira da Rosa, 1960-
Investigação das atividades mutagênica, antimutagênica e antioxidante de extratos etanólicos de *Aiouea trinervis*, *Nectandra cissiflora*, *Ocotea minarum* (Lauraceae) e dos alcalóides triptofol, ocoteína e dicentrina / Zaira da Rosa Guterres. - 2008.
188 f. : il.
- Orientador: Mário Antônio Spanó.
Co-orientador: Mário Sérgio Mantovani.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Mutagênese - Teses. I. Spanó, Mário Antônio. II. Mantovani, Mário Sérgio. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575.224.4



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

Investigação das Atividades Mutagênica, Antimutagênica e Antioxidante de Extratos Etanólicos de *Aiouea trinervis*, *Nectandra cissiflora*, *Ocotea minarum* (Lauraceae) e dos Alcalóides Triptofol, Ocoteína e Dicentrina

Aluna: Zaira da Rosa Guterres

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof.Dr. Mário Antônio Spanó (Orientador)

Examinadores: Prof^a Dr^a Berenice Quinzani Jordão

Prof^a Dr^a Denise Crispim Tavares

Prof. Dr. Edson Luis Maistro

Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Data da Defesa: ____/____/____

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

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Dedicatória

Dedico este trabalho a Maris Stela Corrêa Forster, pois ele é decorrente da oportunidade de estudar, a qual você proporcionou-me, há décadas atrás.

Serei eternamente grata!

Epígrafe

“(...) Essa é a oportunidade histórica da docência, oportunidade que não existe fora de nós próprios, num certo compartimento do tempo, à espera que vamos a seu encalço, mas nas relações entre nós e o tempo, na intimidade dos acontecimentos, no jogo das contradições. Oportunidade que vamos criando, fazendo na própria história nossa biografia. A história nos castiga quando não aproveitamos a oportunidade de termos algum compromisso com as teias sociais que criam e recriam a ciência e a educação (...)”

Paulo Freire

Pedagogia da Esperança, 1992.

Agradecimentos

Ao Programa de Capacitação de Docentes da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, pelo apoio financeiro e institucional que possibilitou a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Mário Antônio Spanó, pela orientação, exemplo de pessoa e profissional. Espero contar com sua valiosa colaboração em futuros projetos, bem como a sua amizade.

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani, que foi fundamental nesta trajetória, pelo apoio e incentivo, disponibilizando o seu laboratório sempre que necessário.

À Prof^a Dr^a Berenice Quinzani Jordão, Prof^a Dr^a Denise Crispim Tavares, Prof. Dr. Edson Luis Maistro e Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno, pela disponibilidade em participar da banca examinadora, pela leitura cuidadosa do texto e pelas valiosas sugestões.

À Prof^a Dr^a Lidilhone Harsmek por auxiliar no ensaio antioxidante DPPH, por sua amizade e apoio.

À prof^a Dr^a Lilian May Grespan Estodutto da Silva, por ter isolado e fornecido o triptofol e a γ -lactona. Por sua disponibilidade em colaborar, por sua amizade.

À Ana Francisca Gomes da Silva, doutoranda em Química, pelo árduo trabalho em isolar os alcalóides ocoteína e dicentrina.

MSc. Milena Martins, Ana Carolina Miranda e Cláudio Rodrigo Nogueira por identificarem os metabólitos secundários presentes em *Aiouea trinervis*, *Nectandra cissiflora* e *Ocotea minarum*.

À Dr^a Neila Coelho de Souza, por auxiliar nos primeiros experimentos, pela amizade e companheirismo nestes anos.

Ao MSc. Alexandre Azenha Alves de Rezende, pelo auxílio e sugestões no encaminhamento deste trabalho, por sua amizade e companheirismo, serei sempre grata.

Ao meu companheiro Mauro Gonçalves Dantas, por ter compreendido as minhas crises e o estresse nestes quatro anos.

Aos meus pais Elza e Ascimar, que ensinaram a ter determinação e disciplina. Obrigado por todos esses anos de aprendizado.

Aos meus irmãos e sobrinhos, agradeço pela compreensão, afeto e carinho.

Ao Senhor Paulo Moderno, pelo valioso auxílio junto ao Laboratório de Mutagênese da UFU.

Agradeço a todos que contribuíram para a minha formação.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia-MG) com apoio financeiro das seguintes Agências de Fomento e Instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).
- Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS).
- Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).

Lista de abreviações

β	Beta.
γ	Gama.
μg	Micrograma.
μL	Microlitro
ADP	Adenosina difosfato.
ATP	Adenosina trifosfato.
A549	Linhagem de células de carcinoma de pulmão.
Bcl-2	<i>B cell Leukemia 2</i> .
BH	<i>Balancer heterozygous</i> /Heterozigoto balanceado.
BHT	Hidroxi tolueno butilado.
C	Carbono.
CAS	<i>Chemical abstract service</i> .
CAT	Catalase.
Co-A	Acetil coenzima A.
CpG	Regiões ricas em dinucleotídeos CG.
<i>C-Raf-1</i>	<i>Protein kinase</i> .
CYP450	Sistema citocromo.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano.
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazila.
DXR	Cloridrato de doxorrubicina.
EE	Extrato etanólico.
EROS	Espécies reativas de oxigênio.
<i>flr</i> ³	<i>Flare</i> .
F_M	Freqüência de manchas observadas.
F_R	Freqüência de recombinação.
F_T	Freqüência total de manchas.
GC	Guanina-citosina.
GPX	Glutathione peroxidase dependente de selênio.
GSH	<i>Glutathione</i> .

GST	<i>Glutathione-S-transferase.</i>
HB	<i>High bioactivation cross /cruzamento de alta bioativação.</i>
HL-60	<i>Myeloid cells.</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio.
HuH-7	Linhagem de células de hepatoma humano.
HT-29	Linhagem de células de câncer de cólon humano.
IC ₅₀	<i>Mean inhibiting concentration.</i>
KB	Linhagem de células leucêmicas.
K-ras	Proto-oncogene.
LNCaP	Linhagem de células de câncer de próstata humano.
Mel-5	<i>Melanoma cell lines.</i>
MH	Trans-heterozigoto marcado/ <i>marker-heterozygous.</i>
<i>mwh</i>	<i>Multiple wing hairs.</i>
nm	Nanômetro.
ORR	<i>DDT-resistant Oregon R.</i>
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido.
(OH [•])	Radical hidroxila.
P-388	Linhagem de células de leucemia linfocítica.
p53	Gene supressor tumoral.
PC-3	Linhagem de células de câncer de próstata humano.
QR	Quinona redutase.
RAW 264.7	Macrophage-like.
RNA	Ribonucleic acid.
ROS	<i>Reactive oxygen species.</i>
SLs	<i>Sesquiterpene lactones.</i>
SMART	<i>Somatic mutation and recombination test.</i>
SNC	Sistema nervoso central.
SOD	Superóxido dismutase.
TPA	<i>12-O- tetraacanoylphorbol-13-acetate.</i>
ST	<i>Standart cross /Cruzamento padrão.</i>
Topo	Topoisomerase.
UDP- UGT	Uridina difosfoglucoronato glucoroniltransferase.
UV	Ultravioleta.

Capítulo I

Figura 1. Mapa com apresentação da distribuição mundial das Lauraceae.....	5
Figura 2. <i>Aiouea trinervis</i>	7
Figura 3. <i>Nectandra cissiflora</i>	8
Figura 4. <i>Ocotea minarum</i>	9
Figura 5. Esquema simplificado das principais vias de biossíntese de metabólitos secundários.....	11
Figura 6. Unidades básicas dos terpenos.....	13
Figura 7. Estruturas químicas dos polifenóis quercetina (flavonóide); resveratrol (estilbeno) e sesamina (lignana).....	14
Figura 8. Estrutura química do alcalóide indólico – triptofol.....	19
Figura 9. Estrutura química do alcalóide aporfínico dicentrina.....	21
Figura 10. Mecanismos de ação das topoisomerases I e II.....	25
Figura 11. Estrutura química da doxorrubicina.....	27

Figura 12. Esquema representativo de defesas celulares contra estresse oxidativo.....	32
Figura 13. Fotomicrografia mostrando mancha simples com pêlos múltiplos (A); mancha simples com pêlos <i>flare</i> (B); e mancha gêmea (C) com pêlos múltiplos (seta maior) e pêlos <i>flare</i> (seta menor) adjacentes...	42
Figura 14. Esquema representativo de divisão mitótica normal em células primordiais dos discos imaginais de asas de <i>D. melanogaster</i>	43
Figura 15. Esquema representativo de divisão mitótica com ocorrência de mutação em células primordiais dos discos imaginais de asas de <i>D. melanogaster</i>	44
Figura 16. Esquema representativo de divisão mitótica com ocorrência de deleção em células primordiais dos discos imaginais de asas de <i>D. melanogaster</i>	45
Figura 17. Esquema representativo de divisão mitótica com ocorrência de recombinação entre o centrômero e o locus <i>flare</i> em células primordiais dos discos imaginais de asas de <i>D. melanogaster</i>	46
Figura 18. Esquema representativo da adição de um átomo de hidrogênio no radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).....	47
Figura 19. Fotografia de placa de ELISA, demonstrando reação de óxido-redução entre extratos etanólicos e a substância 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).....	48

Capítulo 2

Tabela 1: Anti-oxidant activities on scavenging the DPPH free radical of extract from <i>A. trinervis</i> (EE).....	88
Tabela 2: Summary of results obtained with the <i>Drosophila</i> wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) and balancer-heterozygous (BH) progeny of the standard cross (ST) after chronic treatment of larvae with ethanolic extracts (EE) from the leaves of <i>A. trinervis</i> and doxorubicin (DXR).....	89
Tabela 3: Summary of results obtained with the <i>Drosophila</i> wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) and balancer heterozygous (BH) progeny of the high bioactivation (HB) cross (HB) after chronic treatment of larvae with ethanolic extracts (EE) from the leaves of <i>A. trinervis</i> and doxorubicin (DXR).....	90
Tabela 4: Summary of results obtained with the <i>Drosophila</i> wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) progeny of the standard (ST) cross after chronic treatment of larvae with ethanolic extracts from the fruits (EE) of <i>A. trinervis</i>	91
Tabela 5: Summary of results obtained with the <i>Drosophila</i> wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) progeny of the standard (ST) cross after chronic treatment of larvae with γ -lactone (isobutyl lactone A).....	92

Capítulo 3

Tabela 1: Anti-oxidant activities on scavenging the DPPH free radical of extract from <i>N. cissiflora</i>	127
---	-----

Tabela 2: Summary of results obtained with the <i>Drosophila</i> wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) and (BH) progeny of the standard (ST) cross after chronic treatment of larvae with ethanolic extracts (EE) the leaves of <i>N. cissiflora</i> and doxorubicin (DXR).....	128
---	-----

Tabela 3: Summary of results obtained with the <i>Drosophila</i> wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) and (BH) progeny of the high bioactivation (HB) cross after chronic treatment of larvae with ethanolic extracts (EE) the leaves of <i>N. cissiflora</i> and doxorubicin (DXR).....	129
---	-----

Tabela 4: Summary of results obtained with the <i>Drosophila</i> wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) and (BH) progeny of the standard (ST) cross after chronic treatment of larvae with ethanolic extracts (EE) the stem of <i>N. cissiflora</i> and doxorubicin (DXR).....	130
---	-----

Tabela 5: Summary of results obtained with the <i>Drosophila</i> wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) and (BH) progeny of the high bioactivation (HB) cross after chronic treatment of larvae with ethanolic extracts (EE) the stem of <i>N. cissiflora</i> and doxorubicin (DXR).....	131
---	-----

Capítulo 4

Tabela 1: Frequências de manchas observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos	
--	--

balanceados (BH) de <i>D. melanogaster</i> do cruzamento padrão (ST) após tratamento crônico com extrato etanólico (EE) de folhas de <i>O. minarum</i> e doxorrubicina (DXR).....	160
---	-----

Tabela 2: Frequências de manchas observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de <i>D. melanogaster</i> do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB) após tratamento crônico com extrato etanólico (EE) de folhas de <i>O. minarum</i> e doxorrubicina (DXR).....	161
--	-----

Tabela 3: Frequências de manchas observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de <i>D. melanogaster</i> do cruzamento padrão (ST) após tratamento crônico com extrato etanólico (EE) de frutos de <i>O. minarum</i> e doxorrubicina (DXR).....	162
--	-----

Capítulo 5

Tabela 1: Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de <i>D. melanogaster</i> do cruzamento padrão (ST) após tratamento crônico com diferentes concentrações do alcalóide triptofol.....	187
--	-----

Tabela 2: Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de <i>D. melanogaster</i> do cruzamento padrão (ST) após tratamento crônico com diferentes concentrações dos alcalóides ocoteína e dicentrina.....	188
---	-----

Sumário

Página

Capítulo 1- Fundamentação Teórica

1. Família Lauraceae.....	5
1.2 Metabólitos Secundários.....	10
1.2.1 Terpenos.....	12
1.2.2 Compostos Fenólicos.....	14
1.2.3 Compostos Nitrogenados.....	15
1.3 Produção de Metabólitos Secundários pelas Plantas e Fatores Associados.....	16
1.3.1 Metabólitos Secundários Isolados dos Gêneros <i>Aiouea</i> , <i>Nectandra</i> e <i>Ocotea</i> e suas Atividades Biológicas.....	18
1.3.2 Alcalóides.....	22
1.4 Inibidores de Topoisomerase.....	25
1.5 Atividade Antioxidante.....	29
1.6 Mecanismos Quimiopreventivos dos Fitoquímicos.....	33
1.7 Metodologia Utilizada.....	36
1.7.1 Somatic Mutation And Recombination Test (SMART).....	37

1.7.1.1 Metodologia para o SMART.....	38
1.7.2 Ensaio Antioxidante Utilizando 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH).....	47
1.7.2.1 Metodologia para o Ensaio Antioxidante.....	49
2. Justificativa.....	50
3. Referências.....	52
Capítulo 2 – Assessment of the antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of ethanolic extracts of <i>Aiouea trinervis</i> in the wing spot test of <i>Drosophila melanogaster</i>.....	65
Capítulo 3 – Antioxidant and antimutagenic activities of ethanolic extracts of <i>Nectandra cissiflora</i> (Lauraceae).....	97
Capítulo 4 – Atividade antigenotóxica de extratos etanólicos de <i>Ocotea minarum</i> (Lauraceae) em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>.....	137
Capítulo 5 – Avaliação genotóxica dos alcalóides triptofol, ocoteína e dicentrina em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	167

ABSTRACT

The Brazilian “cerrado” (tropical American savanna) is a semi-arid region in which plants are submitted to metabolic stress that triggers defense mechanisms when confronted with unfavorable environmental conditions. The Lauraceae is an economically important family with 52 genera and approximately 2500-2750 species consisting mostly of trees or tree-like shrubs, rich in biologically active secondary metabolites, such as lignans (sesamin, methylpiperitol and polyprenol-12), γ -lactones (isobutylacetone), alkaloids, flavonoids and terpenes, which have shown different biological and pharmacological activities. Several plants from Lauraceae family are considered endangered Brazilian “cerrado” species. According to studies conducted in the area of phytochemistry at the Chemical Department of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), using the three species *Aiouea trinervis*, *Nectandra cissiflora* and *Ocotea minarum* several secondary metabolites have been already isolated, so the aim of the present study was to verify: 1] the antioxidant activity of ethanolic extracts (EE) obtained from the leaves of *Aiouea trinervis* and from the leaves or stems of *Nectandra cissiflora*; 2] the genotoxic effects (evaluated for mutagenic and recombinogenic effects) of EE obtained from the leaves or fruits of *Aiouea trinervis*, from leaves or stems of *N. cissiflora*, and γ -lactones from fruits of *A. trinervis*; 3] the antimutagenic effects of EE obtained from leaves of *A. trinervis* and from leaves or stems of *N. cissiflora*. The antioxidant activities were evaluated in vitro using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging method. The data observed with DPPH test demonstrates antiradical activity of plant extracts. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) using *Drosophila melanogaster* is a short term test suited for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. The SMART was used to evaluate the genotoxicity of EE obtained from the leaves or fruits of *A. trinervis* and EE from the leaves or stem of *N. cissiflora* as well as of γ -lactones (isobutylacetone) isolated from fruits of *A. trinervis*. The extracts and the γ -lactone fraction showed no mutagenic effects on spontaneous DNA lesions. Due to these preliminary observed results, EE from the leaves of *A. trinervis*

and EE from the leaves or stem of *N. cissiflora* were used in combination with the free radical generator doxorubicin (DXR) (used as chemotherapeutic agent) for antigenotoxic evaluation. All in all, when EE were combined with DXR, the results generally indicated a dose-related antigenotoxic (antimutagenic) effects, which depends on to different secondary metabolites found in each type of extract, which probably operate through different mechanisms of action.

Key words: Antigenotoxicity; antioxidant activity; *Drosophila melanogaster*; genotoxicity; Lauraceae.

RESUMO

O cerrado brasileiro (savana Americana tropical) é uma região semi-árida, na qual as plantas são submetidas ao estresse metabólico, que induz mecanismos de defesa quando confrontado com condições ambientais desfavoráveis. A família Lauraceae é formada por 52 gêneros e aproximadamente 2500 espécies, consistindo principalmente de árvores e arbustos ricos em metabólitos secundários, tais como lignanas (sesamina, metilpiperitol e poliprenol-12), γ -lactonas (isoobtusilactona), alcalóides, flavonóides e terpenos, os quais têm mostrado diferentes atividades biológicas e farmacológicas. Várias plantas da família Lauraceae são consideradas espécies do cerrado brasileiro, ameaçadas de extinção. Em estudos fitoquímicos realizados com as espécies *Aiouea trinervis*, *Nectandra cissiflora* e *Ocotea minarum*, conduzidos pelo Departamento de Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) foram identificados entre outros metabólitos a sesamina e flavonóides, os quais são atribuídos atividade antioxidante e antígeno-tóxica. A atividade antioxidante de extratos etanólicos (EE) foi avaliada *in vitro* usando o ensaio antioxidante 2,2-diphenyl-1-picryldrazyl (DPPH). O teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de asas (SMART) em *Drosophila melanogaster* é um teste de curta duração para a detecção de atividade genotóxica de compostos puros ou misturas complexas, assim como para estudos de antigenotoxicidade. O SMART foi usado para avaliar a genotoxicidade e /ou antigenotoxicidade dos EE, da γ -lactona (isoobtusilactona) e dos alcalóides (triptofol, ocoteína e dicentrina). O objetivo do presente estudo foi verificar: 1] a atividade antioxidante de (EE) obtidos de folhas de *Aiouea trinervis*, de folhas e caule de *Nectandra cissiflora* e folhas e frutos de *Ocotea minarum*; 2] os efeitos genotóxicos (avaliados quanto aos efeitos mutagênicos e recombinogênicos) de EE obtidos de folhas e frutos de *Aiouea trinervis*, de folhas e caule de *Nectandra cissiflora* e folhas e frutos *Ocotea minarum*, e da γ -lactona (isoobtusilactona), e dos alcalóides triptofol, ocoteína e dicentrina; 3] os efeitos antimutagênicos de EE obtidos de folhas de *Aiouea trinervis*, de folhas e caule de *Nectandra cissiflora*, de folhas e frutos de *Ocotea minarum*. Os dados

observados com o teste DPPH demonstraram a atividade anti-radical dos extratos obtidos das folhas de *Aiouea trinervis* e *Nectandra cissiflora* e dos frutos de *Ocotea minarum*. Somente os alcalóides ocoteína e dicentrina apresentaram atividade genotóxica. Devido a esses resultados os EE de folhas de *A. trinervis*, folhas e caule de *N. cissiflora* e folhas e frutos de *O. minarum* foram associados com o gerador de radicais livres doxorrubicina (DXR) para avaliação de antigenotoxicidade. De modo geral, quando os EE foram combinados com DXR, os resultados indicaram efeitos antigenotóxicos relacionados com dose específica e dependendo dos metabólitos secundários encontrados em cada tipo de extrato, os quais provavelmente operam por meio de diferentes mecanismos de ação.

Palavras chave: Lauraceae; atividade antioxidante; antigenotoxicidade; *Drosophila melanogaster*; genotoxicidade.

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

As plantas superiores contêm uma variedade de metabólitos secundários que apresentam grande diversidade estrutural. Estima-se que mais de cem mil metabólitos secundários são produzidos pelas plantas, os quais podem ser utilizados como matéria prima para a síntese de diferentes substâncias bioativas. Por isso, as perspectivas do conhecimento sobre as mesmas são altamente promissoras, sendo a identificação de metabólitos vegetais de interesse terapêutico uma área de grande importância farmacológica e econômica.

O cerrado, bioma onde ocorreu a coleta das plantas utilizadas nesta pesquisa, é um dos maiores biomas brasileiros, possuindo grande diversidade vegetal. Esta diversidade é relativa aos táxons mais elevados (gênero, família e ordem). Quanto maior for a diversidade taxonômica em níveis superiores, maior é o distanciamento filogenético entre as espécies e maior é a diferença e diversidade química entre elas. A família Lauraceae Ness é uma das várias famílias encontradas neste bioma.

Esta família é composta por mais de 52 gêneros, com aproximadamente 2.750 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, especialmente nas florestas centro e sul-americanas. Os principais gêneros são: *Aniba*, *Ocotea*, *Nectandra*, *Persea* e *Cinnamomum*.

Uma das linhas de pesquisas em andamento no Departamento de Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) é o estudo químico de plantas (Fitoquímica), com destaque para a família Lauraceae Ness, com o objetivo de isolar e caracterizar os seus metabólitos secundários. Os gêneros mais estudados são *Aniba*, *Licaria*, *Nectandra* e *Ocotea*.

A maioria das espécies desta família é rica em metabólitos secundários, pertencentes a diversas classes, como: flavonóides, alcalóides, monoterpenos e sesquiterpenos, além das neolignanas e lignanas, sendo, ainda, algumas espécies ricas em óleos essenciais; com quase duas centenas de substâncias inéditas registradas na literatura.

Considerando o grande número de substâncias inéditas isoladas desta família, é de suma importância averiguar as atividades mutagênica e/ou antimutagênica de seus extratos e metabólitos secundários. Deve-se ressaltar

que a busca de substâncias com potencial ação mutagênica e/ou antimutagênica encontra-se em expansão, porém tem sido pouco explorada no que diz respeito aos metabólitos secundários.

Este trabalho, enquanto pesquisa básica espera contribuir com informações sobre as atividades biológicas de extratos etanólicos (EE) de três plantas pertencentes à família Lauraceae (*Aiouea trinervis*, *Nectandra cissiflora* e *Ocotea minarum*), bem como dos alcalóides triptofol, ocoteína e dicentrina, e da γ -lactona. Assim sendo, os objetivos desta pesquisa foram:

- 1) Avaliar a atividade antioxidante de EE de *A. trinervis*, *N. cissiflora* e *O. minarum* *in vitro*, por meio do ensaio com 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH).
- 2) Avaliar por meio do *Somatic Mutation And Recombination Test* (SMART) de asas da *Drosophila melanogaster*:

2.1) Os efeitos mutagênicos de EE de *A. trinervis*, *N. cissiflora* e *O. minarum*,

2.2) Os efeitos mutagênicos dos metabólitos secundários triptofol, ocoteína e dicentrina (alcalóides) isolados de plantas do gênero *Ocotea*; e de γ -lactona, isolada de frutos verdes de *A. trinervis*.

2.3) Os efeitos antimutagênicos de EE de *A. trinervis*, *N. cissiflora* e *O. minarum* contra os efeitos genotóxicos do agente antineoplásico cloridrato de doxorrubicina (DXR).

Os EE e os metabólitos secundários utilizados nesta pesquisa foram fornecidos pela Prof^a Dr^a Fernanda Rodrigues Garcez, do Departamento de Química da UFMS.

As plantas foram identificadas pela Prof^a Dr^a Ubirazilda Maria Resende. Exsicatas de cada espécie estão depositadas no Herbário da UFMS.

A apresentação deste trabalho foi dividida nos seguintes capítulos:

Capítulo 1 – Fundamentação Teórica - Apresenta uma revisão geral da literatura, com informações sobre a família Lauraceae; os gêneros *Aiouea*, *Nectandra* e *Ocotea*; os metabólitos secundários e as suas aplicações; inibidores de topoisomerases; antioxidantes; e mecanismos quimiopreventivos dos fitoquímicos.

Capítulo 2 – Apresenta o manuscrito denominado “Assessment of antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of ethanolic extracts from of the plant *Aiouea trinervis* (Lauraceae) in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* “ a ser enviado para publicação na revista científica Environmental and Molecular Mutagenesis.

Capítulo 3 – Apresenta o manuscrito denominado “Efeito Antioxidante e Antigenotóxico dos Extratos Etanólicos de *Nectandra cissiflora* (Lauraceae)” a ser enviado para publicação na revista científica Environmental and Molecular Mutagenesis.

Capítulo 4 – Apresenta o manuscrito denominado “Atividade Antigenotóxica de extratos etanólicos de *Ocotea minarum* (Lauraceae) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*” a ser enviado para publicação na revista científica Life Sciences.

Capítulo 5 – Apresenta o manuscrito denominado “Investigação da Atividade Genotóxica dos Alcalóides Triptofol, Ocoteine e Dicentrine em Células Somáticas de *Drosophila melanogaster*” a ser enviado para publicação na revista científica Life Sciences.

Capítulo 1

Fundamentação Teórica

1. Fundamentação Teórica

1.1 A Família Lauraceae

A família Lauraceae Nees é considerada uma das famílias mais primitivas pertencentes à divisão Magnoliophyta. Tal fato deve-se às suas características morfológicas e anatômicas, que as aproxima de outras famílias, tais como Calycanthaceae, Idiospermaceae e Hernandiaceae (CRONQUIST, 1988). São tipicamente arbóreas, variando de arbustos a árvores de dossel. É predominantemente tropical, composta por cerca de 2.750 espécies distribuídas em 52 gêneros (ROHWER, 1993), nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (WERFF; RICHTER, 1996) (**Figura 1**).

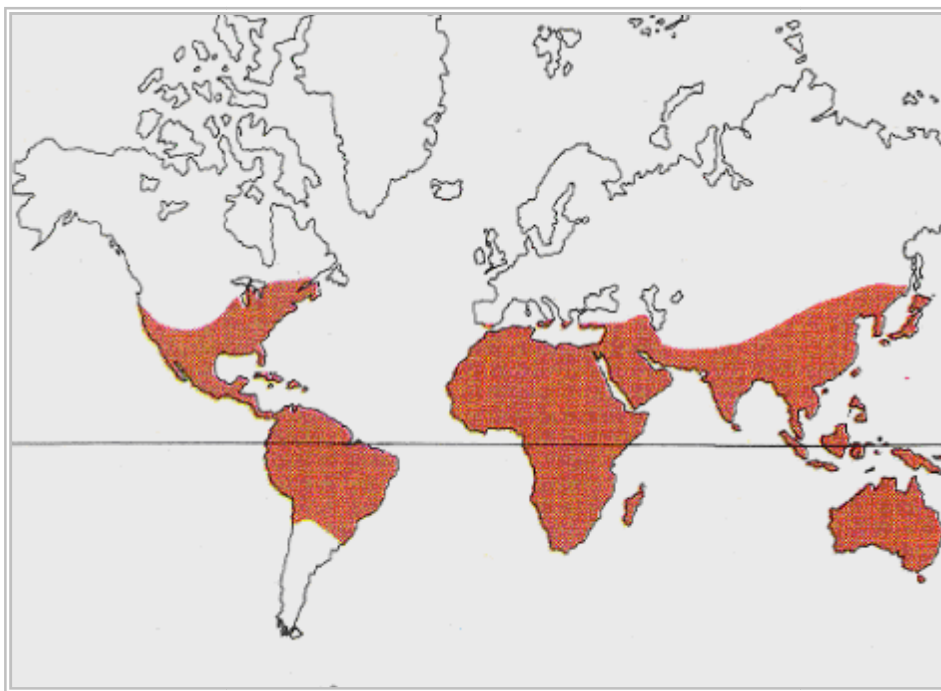


Figura 1. Mapa com apresentação da distribuição mundial das Lauraceae <http://www.ceunes.ufes.br/downloads/2/luismenezes_Lauraceae> acessado em 12 de agosto de 2008 .

A família Lauraceae Nees possui grande importância econômica em todo o mundo. As espécies mais utilizadas em larga escala são: o abacate (*Persea americana*), a canela (*Cinnamomum verum*) e o louro (*Laurus nobilis*). A casca ou o fruto de algumas espécies são usados como condimentos (*Dicypellium*

caryophyllaceum) ou para fazer chá (*Licaria puchury-major* e *Aniba canelilla*). Substâncias aromáticas para perfumaria são extraídas de algumas espécies, como a canela-sassafrás (*Ocotea odorifera*) e o pau-rosa (*Aniba rosaeodora*). Outras são utilizadas na medicina popular ou industrial, como a cânfora (*Cinnamomum camphora*). As demais têm, em geral, grande importância econômica em suas áreas de ocorrência, devido principalmente à madeira, que é amplamente explorada em diversas regiões. Porém, a maioria das espécies tem seu uso restrito às comunidades tradicionais, que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas (VICENTINI *et al.*, 1999; QUINET; ANDREATA, 2002).

No Brasil, ocorrem 22 gêneros, freqüentemente encontrados em florestas pluviais, restingas e áreas de cerrado (BARROSO, 2002). No Estado do Mato Grosso do Sul, a família está representada pelos gêneros *Aniba*, *Cassytha*, *Cinnamomum*, *Cryptocarya*, *Endlicheria*, *Mezilaurus*, *Persea*, *Aiouea*, *Nectandra* e *Ocotea* (MORAES, 2005; ¹RESENDE, Comunicação pessoal).

O gênero *Aiouea* é restrito à região neotropical, com 25 espécies, sendo que no Brasil são encontradas 16 espécies (BAITELLO, 2001). Entretanto, no Estado do Mato Grosso do Sul, o gênero é representado apenas por *Aiouea trinervis* Meisn (ALVES; ISHII, 2007) popularmente chamada de brinco-de-princesa ou louro-de-Goiás (**Figura 2**).

O gênero *Nectandra* é composto por 114 espécies, distribuídas nas Américas tropical e subtropical, das quais 43 espécies são brasileiras (ROHWER, 1993), sendo oito espécies registradas no Estado do Mato Grosso do Sul, (¹Resende, Comunicação pessoal). Várias espécies de *Nectandra* são usadas na medicina popular como curativo de feridas, anti-reumática, digestivas, diuréticas (LOPES, 1995), no tratamento do sistema bronco-pulmonar, de epilepsia, da febre, cólicas menstruais e como auxílio no parto (MORENO *et al.*, 1993).

¹Resende, U. M. Comunicação pessoal. 2008. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - Herbário CGMS – Campo Grande (MS).

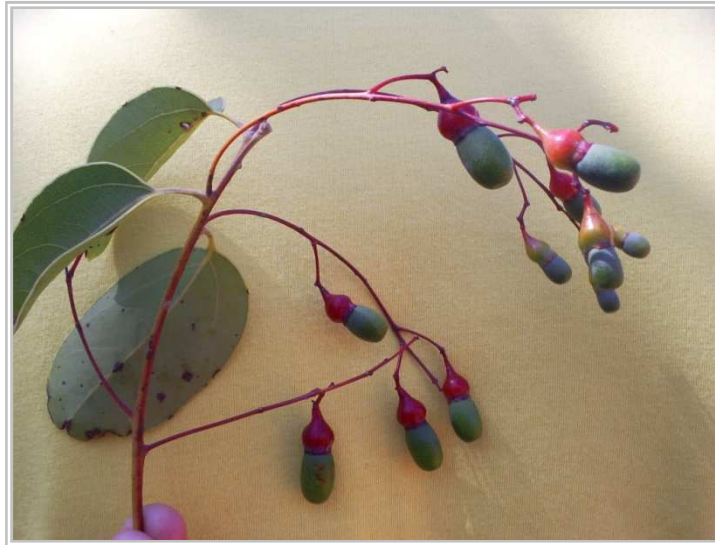


Figura 2. *Aiouea trinervis* (Cortesia da Prof^a Dr^a Lillian May Grespan Estodutto da Silva, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS).

A *Nectandra cissiflora* Nees apresenta diversos nomes populares, tais como: canela-amarela, canela-capitão-mor, canela-fedorenta, canela-trampa (MORAES, 2005).



Figura 3. *Nectandra cissiflora* (Cortesia da Prof^a Dr^a Líllian May Grespan Estodutto da Silva, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS).

Dentre os gêneros mais expressivos das Lauraceae brasileiras, tem-se o gênero *Ocotea*, amplamente distribuído no território nacional. Tem despertado o interesse dos fitoquímicos brasileiros, pois vários alcalóides aporfinóides comumente encontrados neste gênero apresentam diversas atividades biológicas (ZANIN; LORDELLO, 2007).

O gênero *Ocotea* possui o maior número de espécies medicinais, sendo usadas como anti-reumática, depurativa, tônico estomático e contra abscessos. A *Ocotea minarum* (Nees) Mez, também conhecida como canelinha ou canela-vassoura, ocorre nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Paraná (MORAES, 2005).



Figura 4. *Ocotea minarum* (Cortesia da Prof^a Dr^a Líllian May Grespan Estodutto da Silva, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS).

1.2 Metabólitos Secundários

Os vegetais produzem uma grande quantidade de compostos orgânicos, que parecem não ter função direta no seu crescimento e desenvolvimento. Tais substâncias são denominadas metabólitos secundários ou produtos secundários. A **Figura 5** mostra, de forma simplificada, as rotas envolvidas na biossíntese dos metabólitos secundários e suas inter-relações como o metabolismo primário (SIMÕES *et al.*, 2002). Estes compostos em geral não apresentam ação direta conhecida nos processos de fotossíntese, respiração, transporte de solutos, síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos, bem como assimilação de nutrientes e diferenciação dos tecidos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Embora não sejam necessariamente essenciais para o organismo produtor, apresentam funções ecológicas, tais como atração de polinizadores, proteção contra predadores, evitam a perda de água e aumento de temperatura, atuam como inibidores de germinação; garantindo vantagens para a sobrevivência e para a perpetuação da espécie em seu ecossistema (SANTOS, 2004).

A produção de metabólitos secundários é o resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação (WINK, 1990). Cada um desses processos, por sua vez, é governado por genes e, portanto, influenciado por três fatores principais: hereditariedade, ontogenia (estágio de desenvolvimento) e ambiente (ROBBERS *et al.*, 1996).

Os metabólitos secundários vegetais podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos: (i) terpenos, (ii) compostos fenólicos e (iii) compostos nitrogenados.

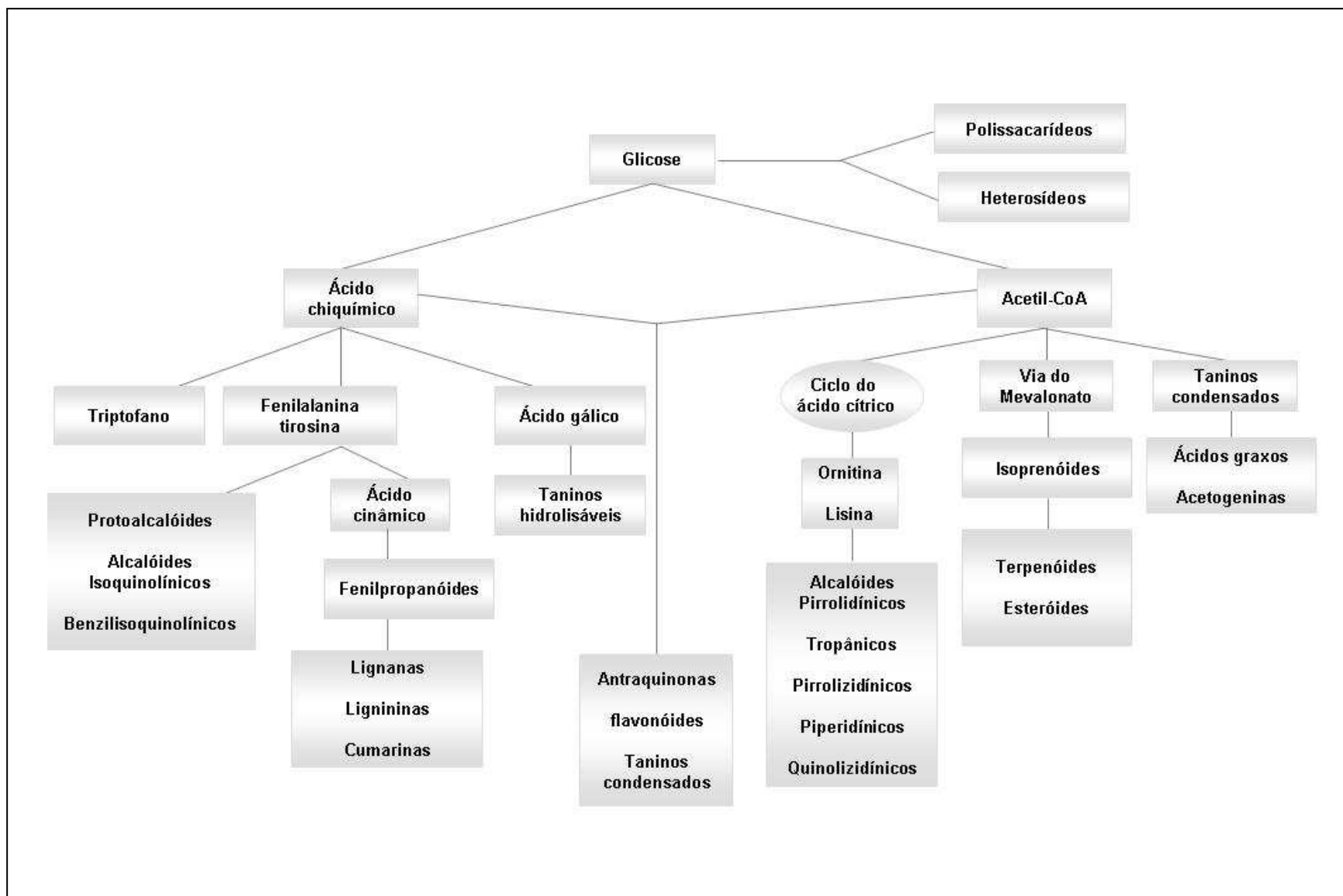


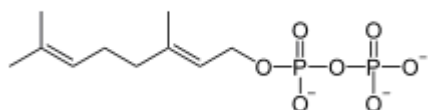
Figura 5. Esquema simplificado das principais vias de biossíntese de metabólitos secundários (SIMÕES *et.al.*, 2002, com modificações).

1.2.1 Terpenos

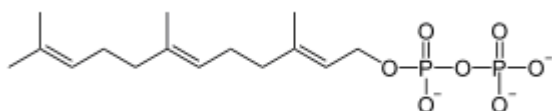
Os terpenos constituem o maior grupo de produtos secundários. As diversas substâncias desta classe são, em geral, insolúveis em água e sintetizados a partir da acetil-CoA ou de intermediários glicolíticos. Os terpenos são classificados pelo número de unidades pentacarbonadas que possuem, embora, algumas vezes, extensas modificações metabólicas possam dificultar a identificação dos resíduos de cinco carbonos. Os terpenos de 10 carbonos, que têm duas unidades C_5 , são chamados de monoterpenos; os de 15 carbonos (três unidades C_5) são os sesquiterpenos; e os terpenos de 20 carbonos (quatro unidades C_5) são os diterpenos. Os maiores terpenos incluem triterpenos (30 carbonos), tetraterpenos (40 carbonos) e politerpenóides, onde a unidades de C_5 é maior do que 8 (TAIZ; ZEIGER, 2004) (**Figura 6**).

Muitos terpenos são hidrocarbonetos, os quais contêm oxigênio na molécula, formando alcoóis, aldeídos ou cetonas. Estes derivados freqüentemente são denominados de terpenóides. Também são encontradas unidades isoprênicas dentro de estruturas de outras moléculas naturais. Assim alcalóides indólicos, várias quinonas (vitamina K, E), vitamina A obtida a partir do β -caroteno, contêm fragmentos terpênicos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

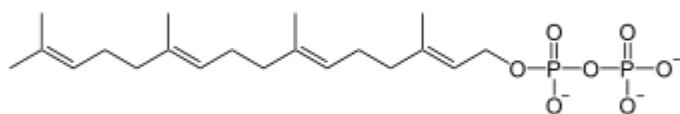
Os terpenos e seus derivados são utilizados na prevenção e terapia de diversas doenças, incluindo o câncer (LAM; ZHENG 1991).



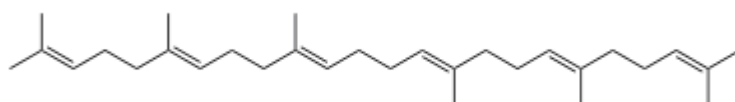
Monoterpeno



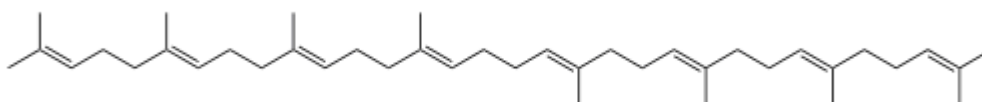
Sesquiterpeno



Diterpeno



Triterpeno



Tetraterpeno

Figura 6. Unidades básicas dos terpenos.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Terpene_Biosynthese.svg> acessado em 12 de agosto de 2008 .

1.2.2 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos constituem um dos mais numerosos grupos encontrados no Reino Vegetal, sendo biossintetizados de várias maneiras nas plantas superiores. A maioria dos fenóis é derivada, pelo menos em parte, da fenilalamina, um produto da rota do ácido chiquímico (**Figura 5**). Os compostos fenólicos podem ser divididos em dez classes. Baseados na estrutura química, mais de 8.000 diferentes compostos foram descritos (BRAVO, 1998). Devido à sua diversidade química, os compostos fenólicos apresentam uma variedade de funções nos vegetais, agindo como compostos de defesa contra insetos herbívoros e fungos, outros têm função no suporte mecânico, como atrativo de polinizadores, ou dispersores de frutos, ou reduzindo o crescimento de plantas competidoras adjacentes (MANACH *et al.*, 2005).

Atenção especial tem sido dada a fitotoxicidade de certos compostos fenólicos as furanocumarinas. Esses compostos são atóxicos até que a luz os ative. A luz solar, na faixa do ultravioleta A (UV-A) eleva algumas furanocumarinas a um estado eletrônico de alta energia. As furanocumarinas fotoativadas podem se inserir na dupla hélice do DNA e ligar-se às bases pirimídicas, citosina e timina, bloqueando a transcrição e o reparo do DNA, provocando, ocasionalmente, a morte celular (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os polifenóis de maior abundância em plantas são os ácidos fenólicos flavonóides, estilbenos e lignanas (**Figura 7**). Dos polifenóis encontrados na dieta, 60% e 30% correspondem respectivamente aos flavonóides e aos ácidos fenólicos (RAMOS, 2007).

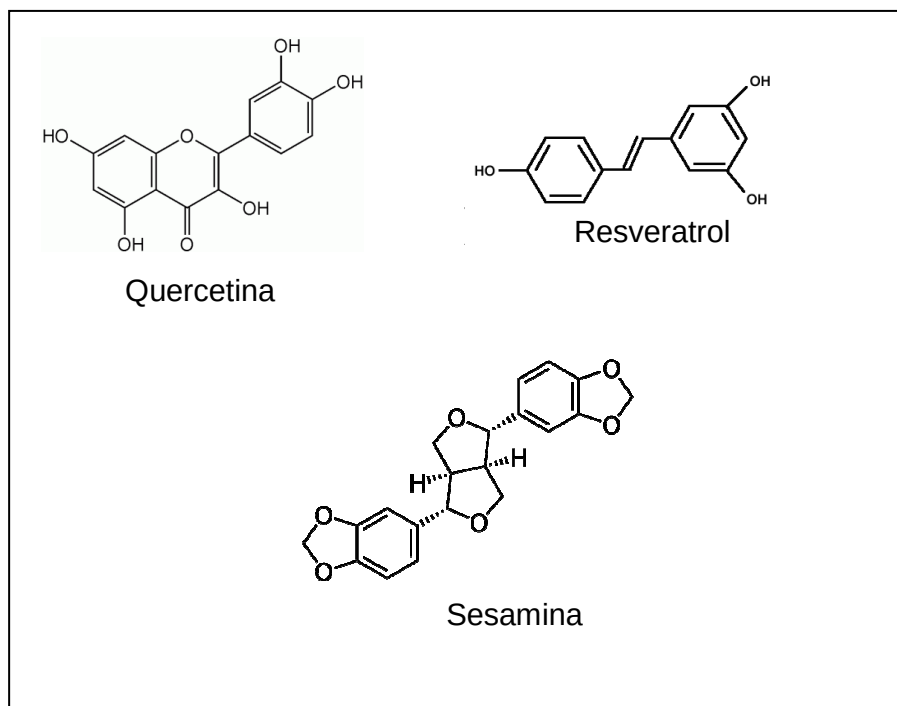


Figura 7. Estruturas químicas dos polifenóis quercetina (flavonóide); resveratrol (estilbeno) e sesamina (lignana) (Jayasinghe *et al.*, 2003; Hammer *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008).

1.2.3 Compostos Nitrogenados

Uma grande variedade de metabólitos secundários vegetais possui nitrogênio na sua estrutura. Incluem-se nesta categoria alguns compostos bem conhecidos na defesa das plantas contra a herbivoria, como os alcalóides e os glicosídeos cianogênicos, os quais são de considerável interesse, devido ao seu efeito tóxico para humanos e às suas propriedades medicinais. São exemplos de compostos nitrogenados, os alcalóides, glicosídeos cianogênicos e os aminoácidos não-protéicos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os alcalóides são, via de regra, sintetizados a partir de um ou poucos aminoácidos comuns – sobretudo lisina, tirosina e triptofano. Contudo, o esqueleto de carbono de alguns alcalóides apresenta um componente derivado da rota dos terpenos. Além dos alcalóides, as plantas contêm outros compostos nitrogenados com função de proteção, os glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos, não são tóxicos como tal, mas rapidamente decompõem-se quando a planta é lesada, produzindo venenos voláteis, tais como o ácido cianídrico (HCN) (TAIZ; ZEIGER, 2004).

1.3 Produção de Metabólitos Secundários pelas Plantas e Fatores Associados

Os efeitos medicinais benéficos oriundos das plantas resultam da produção de metabólitos secundários. Compostos, tais como alcalóides, terpenóides, quinonas, taninos, cumarinas, flavonóides, polipeptídeos e substâncias fenólicas, são sintetizados e depositados em órgãos específicos ou em todas as partes da planta (HARBONE, 1990). Estas substâncias são muito complexas e são encontradas em certos níveis, especificamente de certas famílias, gêneros e espécies (BALANDRIN *et al.*, 1985).

Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; inter e intra-específica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (LINDROTH *et al.*, 1987; HARTMANN, 1996).

A produção de metabólitos secundários é freqüentemente afetada pelas condições ambientais, pois estes metabólitos representam uma interface química entre as plantas e o ambiente (KUTCHAN, 2001). Exemplo disso são as variações sazonais encontradas nos óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, flavonóides, cumarinas, saponinas, alcalóides, taninos, graxas epiculares, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos, isolados de diversas espécies vegetais (ROCA-PÉREZ *et al.*, 2004).

Existe uma correlação bem estabelecida entre intensidade de radiação solar e produção de compostos fenólicos, tais como flavonóides, taninos e antocianinas. Isto pode ser explicado, principalmente no caso dos flavonóides e fenilpropanóides correlatos, pela proteção contra a foto-destruição proporcionada por estes metabólitos ao absorver e/ou dissipar energia solar, protegendo os tecidos mais internos contra os danos causados pela radiação UV-B (GRACE; LOGAN, 2000).

De acordo com GOTTLIEB; BORIN (1994), a variedade e o potencial de metabólitos secundários produzidos pelas espécies do Cerrado são maiores que

as da floresta Amazônica. Diferenças significativas também foram verificadas entre as espécies da Mata atlântica e as do Cerrado. As espécies da Mata Atlântica apresentaram pequeno número de metabólitos secundários, mas em grande quantidade, ao passo que as do Cerrado possuem grande número de compostos estreitamente relacionados, porém em pequena quantidade. Essas diferenças foram evidenciadas por meio da utilização do mesmo método de extração fitoquímica (KAPLAN *et al.*, 1994).

A maioria das espécies da família Lauraceae é rica em metabólitos secundários pertencentes a diversas classes, como: alcalóides do tipo aporfínico, indólico e benzilisoquilínico, monoterpenos e sesquiterpenos, além das neolignanas e lignanas (CARVALHO, 1987), sendo ainda, algumas espécies ricas em óleo essencial (SCORA; SCORA, 2001).

1.3.1 Metabólitos Secundários Isolados dos Gêneros *Aiouea*, *Nectandra* e *Ocotea* e suas Atividades Biológicas

Em estudos fitoquímicos de espécies vegetais pertencentes à família Lauraceae, coletadas no Cerrado próximo à cidade de Campo Grande (MS), como a *A. trinervis*, *N. cissiflora* e *O. minarum*, foram isolados diversas classes de metabólitos secundários.

Das folhas da *Aiouea trinervis* foram isolados as lignanas: sesamina e metilpiperitol; e as lactonas: γ -lactona (isoobtusilactone A) e poliprenol-12. Dos frutos foram isolados apenas γ -lactonas (MARTINS, 2004). A classe de substâncias lignanas é extensamente distribuída em angiospermas e gimnospermas. Apresentam uma grande variedade de estruturas e as atividades biológicas são amplas (AGRAWAL; THAKUR, 1985).

Várias lignanas são conhecidas por suas atividades antitumoral, anti-mitótica, antiviral, antibacteriana, antiestrogênica, sedativa, hipertensiva e inibidora enzimática (AGRAWAL; THAKUR 1985; CHAO *et al.*, 2002). A sesamina tem potente propriedade antioxidante, impedindo o catabolismo do γ -tocoferol a carboxicromanos, elevando, desta forma, a concentração tecidual e plasmática de γ -tocoferol (PARKER *et al.*, 2000).

As lignanas auxiliam na redução do nível do colesterol sérico (KATO *et al.*, 1998), sendo também consideradas como possíveis componentes quimiopreventivos (CHAO *et al.*, 2002), pois reduzem a incidência de câncer de mama e próstata (JIAO *et al.*, 1998). As neolignanas e γ -lactonas apresentaram atividade citotóxica nas linhagens de células cancerosas do tipo P-388 (leucemia linfocítica), KB16 (carcinoma nasofaríngeo), A549 (carcinoma de pulmão) e HT (adenocarcinoma de cólon) (TSAI *et al.*, 2000; TSAI *et al.*, 2002).

Das folhas da *N. cissiflora* foram isolados catequina, sesquiterpeno (ácido cóstico) e o β -sitosterol, como componente majoritário. Do caule apenas sesquiterpeno (MIRANDA, 2008).

O β -sitosterol é o mais abundante fitoesteróide encontrado, principalmente, em óleos vegetais, tais como: oliva, amendoim, soja e girassol (LING; JONES, 1995). Diversas evidências sugerem que os fitoesteróides inibem a indução de tumores em animais. A dieta com fitoesteróides diminui a formação de adenoma

(LING; JONES, 1995). Estudos realizados com animais submetidos a dietas controladas sugerem que os fitoesteróides protegem contra o câncer de mama, assim como outros tipos de câncer, incluindo cólon e próstata (AWADA *et al.*, 2004).

O β -sitosterol interfere no crescimento de diversos tipos de células tumorais *in vitro* e diminui o tamanho e a extensão das metástases tumorais *in vivo* (AWADA *et al.*, 2007); impede o crescimento das células PC-3 de câncer de próstata humano, e é efetivo na indução de apoptose (AWADA *et al.*, 2005).

Espécies de *Nectandra* revelaram a presença de diversos tipos de metabólitos secundários, sendo que em *Nectandra megapotamica* foram identificados os alcalóides indólicos responsáveis por atividades tóxicas e alucinógenas, além de inibirem o crescimento do tripanossomo *Crithidia fasciculada*. Da casca de *Nectandra turbacensis* foram isolados compostos terpênicos e neolignanas (MORO, 1985).

Em espécies amazônicas, pertencentes ao gênero *Nectandra* Rol, foram encontrados compostos químicos denominados neolignanas (GOTTLIEB; YOSHIDA, 1978), os autores sugerem que a atividade antitumoral dos extratos se deve à atividade das neolignanas. Da *Nectandra rigida* isolou-se a licarina A, que possui atividade antitumoral (CARVALHO, 1986).

Dos frutos da *O. minarum* foram isolados dezenove compostos, entre eles: alcalóide indólico - triptofol (**Figura 8**), flavonóides, biflavonóides, cumarina, sesquiterpeno, esteróides, alquil benzeno e bis-lignana (GARCEZ *et al.*, 2005) enquanto que nas folhas encontrou-se β -sitosterol e terpenos (sesquiterpenos e lactonas sesquiterpênicas) (NOGUEIRA, 2007).

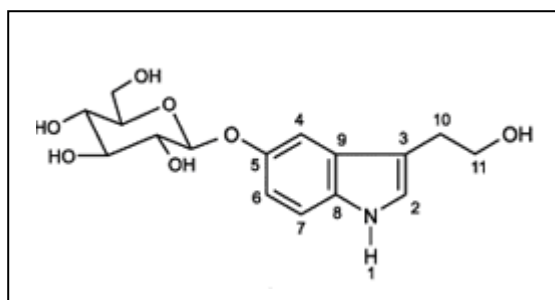


Figura 8. Estrutura química do alcalóide indólico - triptofol (Garcez *et al.*, 2005).

Os compostos fenólicos (tais como os flavonóides) podem inibir vários estágios no processo de carcinogênese, por afetar eventos moleculares nos estágios de iniciação, promoção e progressão. Eles podem aumentar a expressão dos componentes pró-apoptóticos no início da proliferação celular e, desta forma, prevenir ou atrasar o desenvolvimento do tumor (RAMOS, 2007).

Lactonas sesquiterpênicas são compostos terpenóides característicos da família Asteraceae, mas também podem ser encontradas em outras famílias de plantas angiospermas (RODRIGUEZ *et al.*, 1976). Compõem um grupo de substâncias naturais que apresentam uma diversidade de efeitos biológicos. Atuam como agentes alelopáticos e possuem atividade citotóxica e antitumorais (PICMAN, 1986).

Extratos hidroalcoólicos de *Ocotea duckei* são ricos em lignanas, monoterpenos e alcalóides (SILVA *et al.*, 2002). Supõe-se que esses compostos estejam envolvidos na mutagenicidade de extratos hidroalcoólicos de *O. duckei* detectada por meio do teste de Ames (MARQUES *et al.*, 2003). Diferentes trabalhos demonstraram o potencial mutagênico de um grande número de alcalóides em *Salmonella typhimurium* TA100 e TA98 na presença ou ausência de S9 (NOZAKA *et al.*, 1990; WANG; PENG, 1996), enquanto outros demonstraram que os alcalóides aporfínicos inibiram o crescimento de linhagens celulares de hepatoma humano HuH-7 *in vitro*, assim como a biossíntese de DNA e RNA (HUANG *et al.*, 1998).

Das folhas da *Ocotea acutifolia* foram isolados quatorze alcalóides aporfínicos do tipo isoquinolínico, entre eles a leucoxina, n-óxido ocoteína, ocoteína e a dicentrina (**Figura 9**) (²Silva, Comunicação pessoal). A ocoteína é um inibidor da topoisomerase II e a dicentrina é um agente intercalante, que também interfere com a atividade catalalítica das topoisomerasas I e II (HOET *et al.*, 2004).

²Silva, A. F. G. Comunicação pessoal. 2008. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Pós-graduação em Química – Campo Grande (MS).

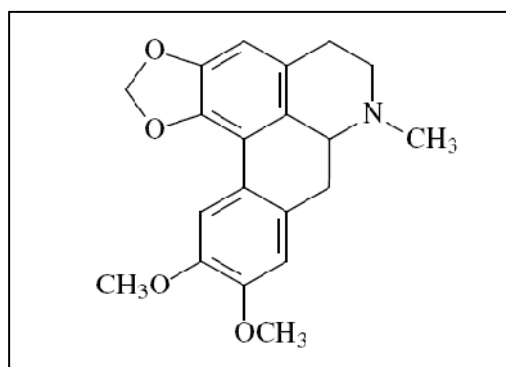


Figura 9. Estrutura química do alcalóide aporfínico dicentrina (Hoet *et al.*, 2004).

1.3.2 Alcalóides

Alcalóides são compostos orgânicos alcalinos que contêm um ou mais anéis de átomos de carbono, usualmente com o átomo de nitrogênio no anel. A posição do nitrogênio no anel de carbono varia em diferentes alcalóides e nas diferentes famílias de plantas, microrganismos e ou invertebrados. A posição do átomo de nitrogênio afeta a propriedade dos alcalóides (PELLETIER, 2001; HESSE, 2002).

Constituem-se num vasto grupo de metabólitos, com grande variedade estrutural. Mais de 18.000 alcalóides diferentes foram descobertos em 300 famílias de plantas, microrganismos, fungos, invertebrados marinhos, insetos, anfíbios e outros organismos (DALY, 1998).

Os alcalóides podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal. Contudo, em um ou mais órgãos haverá um acúmulo preferencial dessas substâncias. São sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se em seguida nos vacúolos. Posteriormente, acumulam-se em: (i) tecidos em crescimento ativo; (ii) células epidérmicas; (iii) bainhas vasculares e (iv) vasos lactíferos (EVANS, 1996).

Diversas funções são atribuídas aos alcalóides nos vegetais, tais como: reserva de nitrogênio, hormônios reguladores de crescimento, defesa contra a invasão de microrganismos e vírus, proteção contra a radiação UV (HENRIQUES *et al.*, 2004). Praticamente, todos os alcalóides são tóxicos para humanos, quando ingeridos em quantidades suficientes. Por exemplo, a estricnina, a atropina e a coniína são alcalóides clássicos utilizados como venenos. Entretanto, em baixas doses, muitos são farmacologicamente úteis. A morfina, a codeína e a escopolamina são utilizados na medicina. Outros, como a cocaína, a nicotina e a cafeína desfrutam de um uso não medicinal bastante difundido, como estimulantes ou sedativos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

No nível celular, o modo de ação dos alcalóides em animais é bastante variado. Muitos alcalóides interagem com os componentes do sistema nervoso, em especial os transmissores químicos; outros afetam o transporte de membrana, a síntese protéica ou a atividade enzimática (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O uso de extratos vegetais contendo alcalóides como medicamentos, venenos, e em poções mágicas, pode ser traçado desde os primórdios da civilização. A presença de alcalóides pode ser assinalada em ampla gama de atividades biológicas investigadas. Assim, pode-se citar emetina (amebicida), atropina (anticolinérgico), reserpina (anti-hipertensivo), quinina (antimalárico), camptotecina, vimblastina e vincristina (antitumorais), codeína (antitussígeno), morfina (hipnoanalgésico), quinidina (depressor cardíaco), cafeína (estimulante do sistema nervoso central - SNC), teobramina (diurético), colchicina (tratamento da gota), tubocurarina (miorrelaxante), castanospermina (antiviral), galantamina (tratamento do mal de Alzheimer) (CORDELL *et al.*, 2001; COYLE *et al.*, 2001).

Os alcalóides podem ser subdivididos em diversos grupos, incluindo: acridínico, aporfínico, quinolínico, indólico, isoquinolínico, entre outros (DEMBITSKY, 2005).

Os alcalóides indólicos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas (SOMEI; YAMADA, 2005). Muitos deles são utilizados com propósito medicinal, servindo de protótipo para o desenvolvimento de novas drogas sintéticas (DEMBITSKY, 2002; 2005). Possuem grande importância econômica, devido às suas atividades farmacológicas. Entre eles podemos citar a vincristina e a vimblastina, que são antineoplásicos importantes; a ergotamina que é um importante fármaco contra a enxaqueca; a ajmalicina e a ioimbina, fármacos usados em distúrbios do fluxo sangüíneo; e a reserpina, utilizada como antidepressivo. Mais recentemente, a ibogaína vem atraindo atenção por apresentar resultados promissores, em animais, no tratamento da dependência de drogas (SCHRIPSEMA *et al.*, 2004).

Dentre os alcalóides isoquinolínicos, os aporfinóides representam um grupo grande e ainda em expansão, com cerca de 500 alcalóides isolados de mais de 90 gêneros de plantas. Formam um importante grupo de metabólitos secundários. Alguns desses compostos têm sido usados, na medicina tradicional, para o tratamento de várias doenças. Muitos destes exibem potente atividade citotóxica, podendo ser utilizados para o design de agentes antineoplásicos (STEVIGNY *et al.*, 2005).

Os alcalóides aporfinóides (actinodafinina, *cassythine* e dicentrina) foram isolados da *Cassytha filiformis* (Lauraceae), planta parasita amplamente

distribuída, a qual é utilizada na medicina popular africana para o tratamento do câncer, de tripanossomos e de outras doenças. Os alcalóides aporfínicos ligam-se ao DNA e comportam-se como típicos agentes intercalantes. Experimentos bioquímicos mostraram que actinodafinina, *cassythine* e dicentrina também interferem com a atividade catalítica da topoisomerase, em contraste com outros alcalóides aporfínicos. Essas interações com o DNA podem explicar, em parte, os efeitos observados em células do câncer e nos tripanossomos (HOET *et al.*, 2004).

Os alcalóides isoquinolínicos constituem um grupo de substâncias bastante freqüentes em espécies do gênero *Ocotea*. Vários alcalóides aporfinóides comumente encontrados neste gênero apresentam pronunciada bioatividade, como coclaurina - anti-HIV (KASHIWADA *et al.*, 2005); glaucina – citotóxica (HOET *et al.*, 2004); derivados halogenados da predicentrina - aumento da afinidade aos receptores dopaminérgicos D₁ (ASENCIO *et al.*, 2005); dicentrina - inibição da topoisomerase II, agente intercalante do DNA, atividade antineoplásica (HOET *et al.*, 2004); dicentrinona - inibição da topoisomerase I (ZHOU *et al.*, 2000); ocoteína - inibição da topoisomerase II. Vários destes alcalóides têm gerado patentes, acarretando grande interesse nessa classe de compostos (ZANIN; LORDELLO, 2007).

1.4 Inibidores de Topoisomerase

As DNA topoisomerasas são enzimas que catalisam quebras transitórias na molécula do DNA. As DNA topoisomerasas podem ser do tipo I (DNA topoisomerase I – topo I), que produzem quebras unifilamentares temporárias; ou do tipo II (DNA topoisomerase II - topo II), que produzem quebras bifilamentares transitórias (CHO *et al.*, 2000) (**Figura 10**). Após a ocorrência deste evento, ambas as enzimas catalisam a re-ligação das ligações fosfodiéster do DNA (CHO *et al.*, 2000).

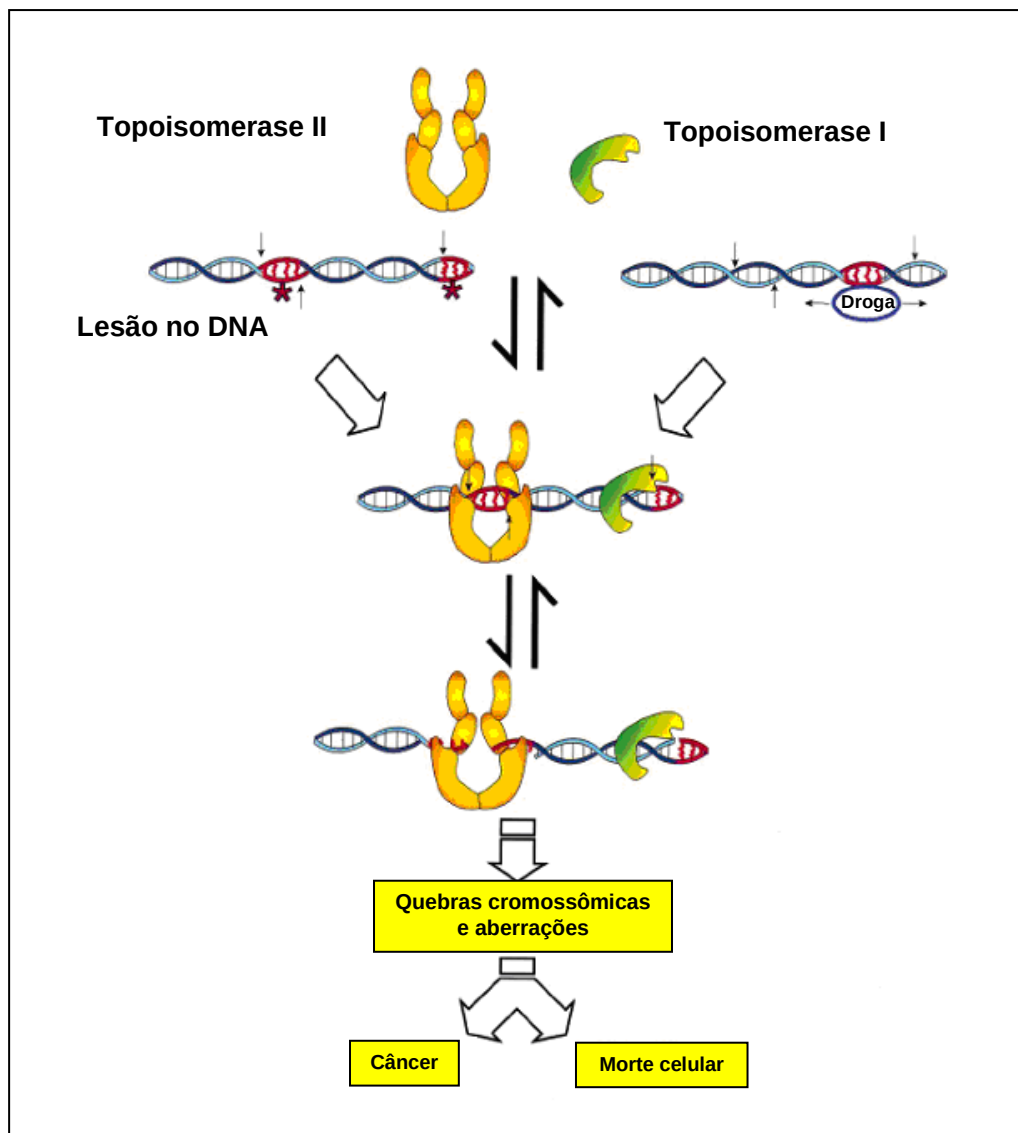


Figura 10. Mecanismos de ação das topoisomerasas I e II (KINGMA; OSHEROFF, 1998, com modificações).

A topo I é uma enzima essencial, que controla a superelícoidização e o eixo de torção do DNA durante os processos de replicação, transcrição, recombinação, reparação e estruturação da cromatina, modificando o seu estado topológico, por meio da quebra e posterior religação de suas fitas (STEWART *et al.*, 1998).

A topo II atua na mitose, estando envolvida na condensação dos cromossomos, na segregação da dupla hélice do DNA, assim como na manutenção da estrutura da cromatina. Destaca-se também sua função sobre os mecanismos envolvidos tanto no processo recombinacional, quanto no reparo que envolve recombinação (LARSEN *et al.*, 1998).

Em condições normais, as quebras introduzidas nas fitas de DNA pelas topos I e II são toleradas pelas células em função não apenas de seu caráter intermediário, mas também devido aos baixos níveis em que são produzidas. Entretanto, a manutenção de tais quebras, e o conseqüente incremento nas suas freqüências, promove a ocorrência de recombinação mitótica, com rearranjos estruturais expressos como inserções, deleções e translocações, podendo ainda induzir uma série de eventos relacionados com apoptose. Conseqüentemente, substâncias capazes de favorecer a manutenção das quebras mediadas por estas enzimas podem ser consideradas como agentes quimioterápicos, já que os múltiplos efeitos acima citados podem ser citotóxicos, levando as células tumorais à morte (KINGMA; OSHEROFF, 1998).

Os compostos denominados genericamente de inibidores de topo, foram divididos em venenos e inibidores catalíticos, de acordo com seus mecanismos de ação. Os venenos de topo atuam como estabilizadores dos complexos DNA-topo, impedindo a religação das fitas de DNA clivadas pela ação catalítica da topo. Desta forma, transformam esta enzima em uma potente toxina celular. Os inibidores catalíticos de topo interferem com a atividade catalítica da enzima, sem promover a estabilização dos complexos clivados, formados pelas topos e o DNA (FORTUNE; OSHEROFF, 2000).

Alguns dos inibidores e venenos de topo conhecidos são compostos naturais, produzidos por plantas ou microorganismos. Estes compostos são altamente tóxicos para outros organismos, o que sugere que sua função está relacionada com a auto defesa da espécie produtora (CAPRANICO *et al.*, 2007). As topo eucarióticas são o alvo da maioria das drogas antitumorais que interagem

com a atividade da enzima por estabilizar os complexos DNA-topo, impedindo a religação das fitas de DNA clivadas pela ação catalítica da topo, mantendo as quebras simples e duplas geradas (TOPCU, 2001).

Uma das drogas antitumorais que tem sido utilizada há mais de 30 anos para o tratamento de diferentes tipos de neoplasias humanas, tais como câncer de mama, leucemias, linfomas e sarcomas, é a adriamicina (cloridrato de doxorubicina - DXR). Esta substância é um antibiotico antraciclínico, obtido do fungo *Streptomyces peucetius* (QUILES *et al.*, 2002) (**Figura 11**).

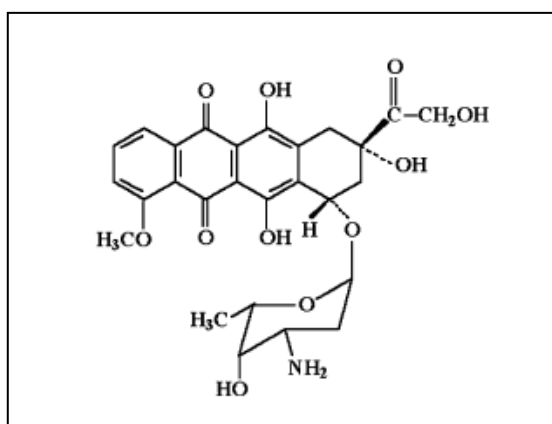


Figura 11. Estrutura química da doxorubicina (Trevisan e Poppi, 2003).

A DXR pode induzir a complexação da topo II com a hélice do DNA, ocasionando numerosas quebras de fita dupla (FILYAK *et al.*, 2007), além de atuar como agente intercalante (CAPRANICO *et al.*, 1997), acarretando a formação de aductos no DNA, levando à troca de cromátides-irmãs e aberrações cromossômicas (GÜLKAÇ *et al.*, 2004). Acarreta, ainda, estresse oxidativo e a produção de radicais livres (SINGAL *et al.*, 2000). Assim, o efeito biológico da DXR pode não ser baseado somente na atividade da topo II (SWIFT *et al.*, 2006).

Portanto, todos estes mecanismos de ação tornam a DXR um potente agente tóxico/genotóxico. Conseqüentemente, este quimioterápico ocasiona uma série de eventos adversos nos pacientes, com destaque para a cardiotoxicidade. Este efeito é atribuído à geração de radicais livres, os quais podem causar a lipoperoxidação, ocasionando alterações na integridade da membrana celular, além de alterar a função mitocondrial, favorecendo a síntese de radicais livres

(ZHOU *et al.*, 2000). Esforços significativos têm sido feitos, com o propósito de desenvolver uma terapia conjunta para diminuir a cardiotoxicidade induzida pela DXR e aumentar a eficácia terapêutica anticâncer (BEG; BALTIMORE, 1996). Entre eles, a utilização de compostos fenólicos e outros, os quais seqüestram os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila, os quais podem ser candidatos em potencial para reduzir a toxicidade (LEE *et al.*, 1991; LIU; TAN, 2000).

Muitos pesquisadores têm avaliado a ação de antioxidantes sintéticos ou naturais associados à DXR (ANTUNES; TAKAHASHI, 1998; COSTA; NEPOMUCENO, 2006; ZHANG *et al.*, 2005; ANTUNES *et al.*, 2007; VALADARES *et al.*, 2007; FRAGIORGE *et al.*, 2007), com o propósito de reduzir o estresse oxidativo (LAMSON; BRIGNAL, 1999; QUILES *et al.*, 2002), e minimizar a toxicidade deste quimioterápico.

1.5 Atividade Antioxidante

O oxigênio é vital para todos os animais. Entretanto, diversos processos fisiológicos e bioquímicos podem produzir como subproduto, radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio. A redução univalente do oxigênio molecular resulta em espécies reativas de oxigênio (EROs). EROs incluem radicais livres, tais como ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radicais hidroxilas ($\bullet OH$) e hidroperoxila ($ROO\bullet$), bem como espécies de não radicais livres, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ARUOMA, 1999). A produção de tais radicais livres pode causar danos ao DNA e RNA, oxidar lipídios e proteínas. As EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno *bis*-alílico, iniciando, assim, o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares (VALKO *et al.*, 2004).

O estresse oxidativo danifica os sistemas biológicos, promovendo o desenvolvimento de várias doenças, tais como câncer, doenças coronarianas e mal de Alzheimer, além de acelerar o processo de envelhecimento (SMITH *et al.*, 1996; TABATA *et al.*, 2008).

Acredita-se que o estresse oxidativo apresenta, no mínimo, dois mecanismos de ação no desenvolvimento da carcinogênese. O primeiro mecanismo seria epigenético, no qual genes responsáveis pelos sinais de crescimento e de proliferação celular teriam a sua expressão modulada (VALKO *et al.*, 2004). As EROs também podem estimular as proteínas quinases e as vias de poli ADP-ribosilação de proteínas cromossômicas, afetando, desta forma, as vias de transdução de sinal. Isto pode levar à modulação da expressão de genes essenciais para a proliferação e promoção de tumor (CERUTTI; TRUMP, 1991).

O segundo mecanismo, pelo qual os radicais livres induzem alterações genéticas, são as mutações e rearranjos cromossômicos, que podem desempenhar papel importante na iniciação da carcinogênese (GUYTON; KENSLER, 1993). Os rearranjos cromossômicos são resultados de quebras de fitas mal reparadas, contribuindo para a amplificação gênica e perda de heterozigose, alterando, assim, a expressão gênica, o que pode promover a progressão neoplásica (MARNETT, 2000). Os danos oxidativos no DNA também

podem contribuir com alterações nas bases do DNA em certos oncogenes ou genes supressores de tumor. Tem sido demonstrado que radicais hidroxilas ($\bullet\text{OH}$) podem ativar oncogenes, tais como *K-ras* e *C-Raf-1*, induzir mutações de ponto nos pares de bases GC e deleções N-terminal nestes genes (JACKSON, 1994).

Mutações em dinucleotídeos CpG são freqüentemente encontradas em certos genes supressores de tumor, tais como p53 e retinoblastoma, levando à sua inativação (NIGRO *et al.*, 1989; YANDELL *et al.*, 1989). Os radicais livres também podem induzir citotoxicidade, que pode contribuir no processo de carcinogênese pela depleção da população normal de células e promoção da expansão clonal de células mais resistentes, aumentando assim a probabilidade de mutação (VALKO *et al.*, 2004).

Entretanto, a produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por ex., superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas, destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenóides (HASLAM, 1996; VALKO *et al.*, 2004). Quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes, podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (ATOUI *et al.*, 2005).

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que, presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis, ou podem ser reciclados por outro antioxidante (ATOUI *et al.*, 2005).

Todos os organismos aeróbicos, inclusive os humanos, possuem defesas antioxidantes e antigenotóxicas que os protegem de danos oxidativos e genotóxicos. As enzimas de reparo estão presentes para remover ou reparar moléculas danificadas. O mecanismo de defesa enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD) que catalisa radicais superóxido em peróxido de hidrogênio, a catalase (CAT), que converte H_2O_2 em oxigênio e água, a glutathiona peroxidase

dependente de selênio (GPX), que catalisa a degradação da H_2O_2 (HAYDER *et al.*, 2008).

Dados de numerosos experimentos sugerem que os danos oxidativos no DNA são de grande relevância no envelhecimento, bem como na etiologia de muitas doenças humanas, incluindo aterosclerose, doenças neurodegenerativas e até mesmo o câncer (MARNETT, 2000; OLINSKI *et al.*, 2002). O potencial genotóxico é diretamente proporcional ao número de lesões oxidativas do DNA que escapam do mecanismo de reparo. É conhecido que o mecanismo de reparo decai com a idade e, desta forma, as lesões no DNA acumulam-se com o envelhecimento (VALKO *et al.*, 2004). A Figura 12 mostra esquema representativo de defesas celulares contra estresse oxidativo.

Os antioxidantes naturais contidos em plantas aromáticas e medicinais, frutos e vegetais podem ser usados na prevenção dos conseqüentes danos oxidativos deletérios e, portanto, são considerados agentes quimiopreventivos (KITTS, 1994; VERHAGEN *et al.*, 1997; KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002).

Atualmente há um grande interesse em encontrar fontes naturais de antioxidantes, para minimizar os danos oxidativos celulares (ANIYA, 2002). Os antioxidantes podem interferir com enzimas de metabolização de xenobióticos, bloqueando a atividade mutagênica/carcinogênica e modulando o reparo do DNA (CRAIG, 1999; HEO *et al.*, 2001; KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002). Todos esses mecanismos podem ser importantes para as propriedades antimutagênicas ou anticarcinogênicas (DE FLORA; FERGUSON, 2005).

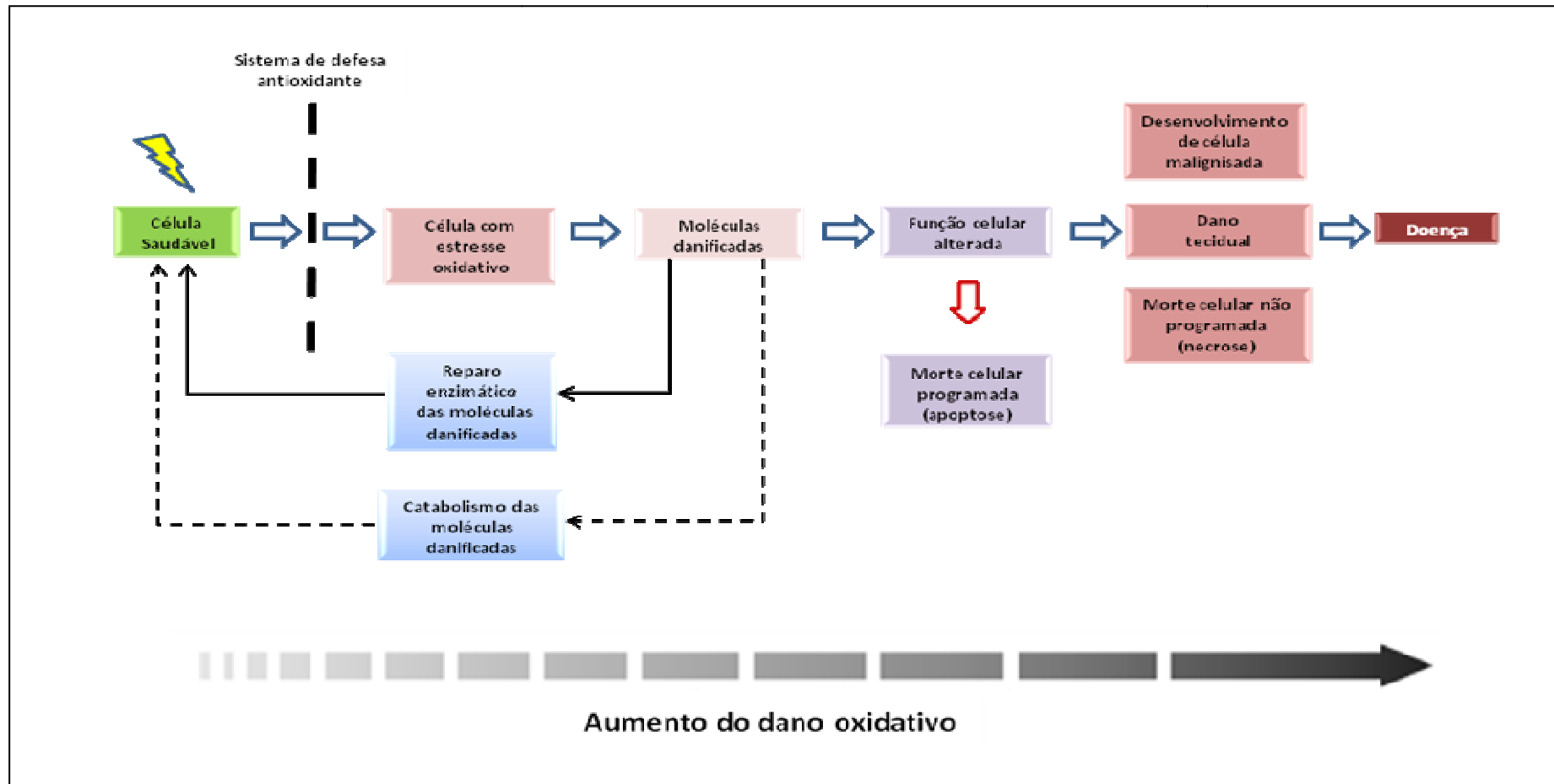


Figura 12. Esquema representativo de defesas celulares contra estresse oxidativo (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007).

1.6 Mecanismos Quimiopreventivos dos Fitoquímicos

Diversos extratos obtidos de plantas, e alguns de seus metabólitos secundários, exercem atividades antioxidantes (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002; MOREIRA, 2005); inibem a peroxidação lipídica (García-Alonso *et al.*, 2004), impedem a atividade das topoisomerasas (WOO *et al.*, 1999), estimulam as enzimas de detoxificação (KONG *et al.*, 2001) e induzem a apoptose (GALATI; O'BRIEN, 2004), demonstrando, assim, atividade quimiopreventiva do câncer.

A quimioprevenção do câncer pode ser determinada pelo uso de compostos naturais ou sintéticos, para prevenir, suprimir, atrasar ou reverter o desenvolvimento invasivo do câncer (PATEL *et al.*, 2007). Os mecanismos pelos quais os agentes quimiopreventivos exercem seu efeito protetor têm sido focado nos mecanismos intracelulares, incluindo aumento na produção de enzimas envolvidas na detoxificação dos carcinógenos (enzimas de fase II) e na inibição da ativação metabólica dos carcinógenos (enzimas de fase I), resultando em baixa produção de metabólitos eletrofílicos capazes de se ligar ao DNA (STAVRIC, 1994). Entretanto, a suscetibilidade dos sistemas biológicos aos carcinógenos químicos é, em parte, controlada pelo balanço entre enzimas de fase I, o sistema citocromo P-450 (CYP450s), dependente de mono-oxigenases e enzimas de fase II, ex.: glutathione-S-transferase (GST); quinona redutase (QR) e uridina difosfoglucoronato glucoroniltransferase (UDP-UGT) (TALALAY, 1989).

Uma das atividades quimiopreventivas conhecidas dos fitoquímicos é a indução das enzimas de metabolização de fase II, tais como a glutathione-S-transferase (GST). As enzimas de fase II catalizam as reações de conjugação entre glutathione e os intermediários eletrofílicos reativos de fase I para facilitar sua eliminação do corpo (WILKINSON; CLAPPER, 1997). A quimioprevenção obtida através dos fitoquímicos é encontrada em representantes dos três grupos químicos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, com destaque para os compostos fenólicos, tais como os flavonóides.

Numerosos estudos têm atribuído aos compostos fenólicos atividades quimiopreventivas. Estes compostos podem prevenir o desenvolvimento do

câncer por meio de ação antioxidante e/ou da modulação da função das diversas proteínas, tais como: da secreção das proteínas quinase na proliferação celular em tumor; e induzir a expressão de enzimas anticarcinogênicas ou inibir a indução de enzimas promotoras do câncer (OWEN *et al.*, 2000; SAKAKIBARA *et al.*, 2003).

Diversas substâncias fenólicas encontradas na dieta apresentam efeito anticarcinogênico e antimutagênico (FERGUSON, 1994; STAVRIC, 1994), principalmente algumas espécies de ervas que contêm substâncias fenólicas bioativas, com potente atividade antioxidante. Muitos dos agentes quimiopreventivos modulam a expressão de genes incluindo a indução das enzimas de detoxificação de fase II, tais como as GST e UDP-UGT (KONG *et al.*, 2001).

Desta forma, os compostos fenólicos podem inibir a carcinogênese por afetar eventos moleculares nos estágios de iniciação, promoção e progressão (YANG *et al.*, 2001). Eles podem aumentar a expressão dos componentes pró-apoptóticos no início da proliferação celular e, desta forma, prevenir ou atrasar o desenvolvimento do tumor (RAMOS, 2007).

Os flavonóides também inibem a promoção dos estágios da carcinogênese por impedir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs); a formação de enzimas que contribuem com a síntese de DNA ou a ação do ATP; e a inibição das proteínas quinases que contribuem para o sinal de transdução proliferativo. Finalmente, eles podem prevenir o desenvolvimento de tumor por induzir apoptose nas células tumorais por inibição da topo II; diminuição da atividade da p53; ou por causar toxicidade mitocondrial, o que inicia a apoptose mitocondrial (GALATI; O'BRIEN, 2004).

Compostos fenólicos isolados de plantas têm sido alvo de grande interesse devido à sua capacidade antioxidante, bem como devido a possíveis implicações benéficas na saúde humana, especialmente no tratamento e prevenção do câncer (BRAVO, 1998). O efeito anticarcinogênico dos vegetais pode ser devido à presença de muitos compostos com diferentes propriedades (TEPSUWAN *et al.*, 1999).

Na presente pesquisa foi avaliada *in vitro*, a atividade antioxidante de EE obtidos de *A. trinervis*, *N. cissiflora* e *O. minarum*, por meio do ensaio com 2,2-

difenil-1-picrilidrazila (DPPH). A atividade genotóxica dos EE de *A. trinervis*, *N. cissiflora* e *O. minarum* e de três alcalóides, ocoteína e dicentrina, isolados de folhas de *Ocotea acutifolia*, e o triptofol obtido de frutos de *Ocotea minarum*; e γ -lactona, isolada de frutos verdes de *A. trinervis* foi investigada, por meio do *Somatic Mutation And Recombination Test (SMART)* de asas da *Drosophila melanogaster*. Os efeitos antigenotóxicos de EE de *A. trinervis*, *N. cissiflora* e *O. minarum* contra os efeitos genotóxicos do agente antineoplásico cloridrato de doxorrubicina (DXR) também foram avaliados com o *SMART*.

1.7 Metodologia Utilizada

1.7.1 Somatic Mutation And Recombination Test (SMART)

O Somatic Mutation And Recombination Test – SMART (Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática), que utiliza como biomonitor a *Drosophila melanogaster*, foi empregado para avaliar a atividade mutagênica dos EE de *A. trinervis*, *N. cissiflora* e *O. minarum*; os efeitos genotóxicos de três alcalóides, ocoteína e dicentrina, isolados de folhas de *Ocotea acutifolia*, do triptofol, obtido de frutos de *Ocotea minarum*; e de γ -lactona, isolada de frutos verdes de *A. trinervis*; assim como os efeitos antimutagênicos de EE de *A. trinervis*, *N. cissiflora* e *O. minarum* contra os efeitos genotóxicos do agente antineoplásico cloridrato de doxorubicina (DXR).

Esse sistema apresenta a vantagem de utilizar um organismo eucarioto que possui curto período de geração (aproximadamente 10 dias a 25° C); caracteres morfológicos bem definidos; sistema enzimático semelhante aos dos mamíferos, que permite o metabolismo de agentes xenobióticos; e grande número de linhagens mutantes, muito bem caracterizadas geneticamente (Graf *et al.*, 1996). É um teste barato, que produz resultados confiáveis, inequívocos e reproduzíveis.

O seqüenciamento do genoma da *D. melanogaster* revelou uma alta conservação evolutiva, quando comparado ao genoma humano, não apenas em nível de seqüência de DNA, mas principalmente em relação às funções gênicas. São também relevantes os dados obtidos a partir de análises do proteoma, uma vez que 60% dos 289 genes relacionados a doenças humanas apresentam homólogos em *Drosophila*, dos quais 75% portam seqüências protéicas similares nestes dois organismos (TICKOO; RUSSELL, 2002). Portanto, existe uma alta conservação entre rotas bioquímicas e funções regulatórias entre as duas espécies (ST. JOHN; XU, 1997).

Tais descobertas, somadas aos mais de 90 anos de contribuição deste organismo à pesquisa genética, colocam a *Drosophila* como um modelo promissor não apenas para o estudo de doenças humanas, mas também para a

obtenção de drogas que possam ser efetivamente utilizadas no seu combate (LEHMANN *et al.*, 2004).

VOGEL *et al.* (1999), registraram cerca de 300 compostos químicos avaliados no teste SMART de asa de *D. melanogaster*, documentados em aproximadamente 100 publicações. Entre os compostos avaliados, incluem-se drogas antineoplásicas, agentes intercalantes, compostos indutores de pontes de DNA-DNA e DNA-proteína, inibidores de topoisomerasas e inibidores da síntese de DNA.

Nos últimos anos diversos pesquisadores têm avaliado o efeito genotóxico e ou antigenotóxico de diversos extratos de plantas, utilizando o SMART (IDAOMAR *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003; ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2005; LAOHAVECHVANICH *et al.*, 2006).

O SMART de asa em *D. melanogaster* fundamenta-se na premissa de que durante o desenvolvimento embrionário, grupos de células (os discos imaginais das asas) proliferam mitoticamente até o ponto em que se diferenciam, durante a metamorfose, em estruturas que originam as asas das moscas adultas. Este bioensaio faz uso de dois genes marcadores para a forma dos pêlos das asas: pêlos múltiplos (*mwh*, 3-0.3) e pêlos cujo formato lembram uma “chama de vela”, do inglês flare (*flr*³, 3-38.8), baseando-se na indução de alterações genéticas que originam a perda de heterozigose em células larvais, que são heterozigotas para estes dois genes recessivos (Graf *et al.*, 1984).

Portanto, este teste detecta a perda da heterozigose, que pode ocorrer espontaneamente ou ser induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos, em células somáticas de *D. melanogaster*.

1.7.1.1 Metodologia para o SMART

Para o SMART, foram utilizados dois diferentes cruzamentos portando os marcadores para a forma dos pêlos das asas: 1] Cruzamento padrão (*Standard cross* - ST), em que fêmeas virgens da linhagem *flare* (*flr*), com genótipo *flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* (abreviado como *flr³/TM3, Bd^S*) foram cruzadas com machos da linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*), com genótipo *mwh/mwh*; 2] Cruzamento de alta bioativação metabólica (*High bioactivation cross* - HB), em que fêmeas virgens da linhagem *ORR/flare* (*ORR/flr*), com genótipo *ORR/ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* (abreviado como *ORR; flr³/TM3, Bd^S*) foram cruzadas com machos *mwh/mwh*. A linhagem *ORR/flare* possui os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem *Oregon R* (*R*), resistente ao DDT, contendo genes responsáveis por alto nível de enzimas de metabolização do tipo citocromo P(CYP)6 A2 (GRAF; VAN SCHAIK, 1992).

Para a realização dos cruzamentos ST e HB, fêmeas virgens *flr³/TM3, Bd^S* e *ORR; flr³/TM3, Bd^S* foram cruzadas com machos *mwh*. De ambos os cruzamentos foram coletados ovos por um período de 8 horas, em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% em água) e uma camada de fermento de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) suplementado com açúcar. Após 72 horas $\pm$ 4 horas, larvas de 3º estágio foram lavadas com água corrente e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina. Grupos de larvas foram transferidos para frascos de vidros contendo 1,5g de meio de cultura alternativo (purê instantâneo de batata Yoki®) hidratado com concentrações equivalentes a 0,625 mg.mL⁻¹; 1,25 mg.mL⁻¹ ou 2,5 mg.mL⁻¹ de EE de *A. trinervis* isoladamente e em associação com DXR (0,125 mg.mL⁻¹; 0,625 mg.mL⁻¹; 1,25 mg.mL⁻¹ ou 2,5 mg.mL⁻¹ de EE de *N. cissiflora* isoladamente e em associação com DXR (0,125 mg.mL⁻¹; 0,625 mg.mL⁻¹; 1,25 mg.mL⁻¹ ou 2,5 mg.mL⁻¹ de EE de *O. minarum* isoladamente e em associação com DXR (0,125 mg.mL⁻¹); e com 0,4 mg.mL⁻¹; 0,8 mg.mL⁻¹ ou 1,6 mg.mL⁻¹ do alcalóide ocoteína isolado de folhas de *Ocotea acutifolia*; 0,4 mg.mL⁻¹; 0,8 mg.mL⁻¹ ou 1,6 mg.mL⁻¹ do alcalóide dicentrina isolado de folhas de *Ocotea acutifolia*; 0,4 mg.mL⁻¹; 0,8 mg.mL⁻¹ ou 1,6 mg.mL⁻¹ do alcalóide triptofol obtido de frutos de *Ocotea minarum*; 0,7 mg.mL⁻¹; 1,4 mg.mL⁻¹ ou 2,8 mg.mL⁻¹ de γ -lactona, isolada de frutos verdes de *A. trinervis*. Como controle positivo foi utilizado o

cloridrato de doxorrubicina (DXR) na concentração de 0,125 mg.mL⁻¹ e como controle negativo, o solvente constituído por água ultra pura (obtida de sistema Milli-Q), 1% de Tween-80 e 3% etanol.

Adultos emergentes portadores dos dois tipos de genótipos: *mwh* + / + *flr*³ (trans-heterozigoto marcado - MH) e *mwh* + / + *TM3, Bd*^S (heterozigoto balanceado – BH) foram coletados e fixados em etanol 70%. As asas foram destacadas e montadas entre lâminas e lamínulas com solução de Faure e analisadas quanto a ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópios ópticos com magnificação de 400x.

A análise dos indivíduos MH permite detectar a ocorrência de mutações de ponto, pequenas aberrações cromossômicas e recombinações mitóticas proximais e distais. A análise dos indivíduos BH permite detectar a ocorrência de mutações de ponto e pequenas aberrações cromossômicas. No entanto, devido à presença de inversões múltiplas no cromossomo balanceador, as células resultantes de recombinação mitótica são inviáveis. A célula que sofreu perda do alelo selvagem irá desenvolver o fenótipo mutante, durante a metamorfose no estágio de pupa, e pode ser diferenciada facilmente das demais (GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995).

A análise da superfície dorsal e ventral das asas considera o número de manchas que fornece dados quantitativos e o tipo de mancha que permite identificar o evento genotóxico induzido. Manchas simples que expressam apenas um dos genes mutantes, *flr*³ ou *mwh*, indicam a ocorrência de mutações gênica e/ou cromossômica, bem como recombinação. Entretanto, manchas gêmeas formadas por células adjacentes expressando os fenótipos *flr*³ e *mwh* originam-se exclusivamente de eventos recombinacionais (GRAF *et al.*, 1984). A **Figura 13** apresenta fotomicrografias de segmentos de asas de *D. melanogaster* MH com manchas simples do tipo *multiple wing hairs*, manchas simples do tipo *flare* e manchas gêmeas (*mwh* e *flr* adjacentes) obtidas em microscópio óptico de luz, aumento de 400X.

É também importante distinguir entre manchas simples pequenas (1-2 células mutantes) e manchas grandes (3 ou mais células mutantes) porque as primeiras são formadas durante o último e/ou penúltimo ciclos de divisão mitótica que estão ocorrendo na pupa, enquanto que as grandes são produzidas mais

cedo, durante o desenvolvimento da larva. As manchas simples pequenas são originadas por mutações cromossômicas (aneuploidia) e/ou grandes deleções, independente do tempo em que elas foram induzidas, já que essas células apresentam uma baixa taxa de divisão celular (GRAF *et al.*, 1984).

A **Figura 14** mostra esquema de cromossomos de células primordiais dos discos imaginais de asas, presentes na fase de larva de *D. melanogaster*, em divisão mitótica normal (adaptado de GRAF *et al.*, 1984).

As **Figuras** de números **15** a **17** mostram os diferentes mecanismos genéticos (mutação de ponto, deleção, e recombinação) responsáveis pelo aparecimento de manchas mutantes simples e gêmeas (adaptado de Graf *et al.*, 1984).

Os resultados observados com os EEs e com os alcalóides foram avaliados estatisticamente por meio do teste Binomial Condicional (KASTEMBAUN; BOWMAN, 1970), com nível de significância $\alpha=\beta=0,05$. As freqüências de cada tipo de mancha mutante por mosca foram comparadas com os respectivos controles negativos, possibilitando a caracterização dos resultados como positivos, fraco-positivos, negativos ou inconclusivos (FREI; WÜRGLER, 1988). Na aplicação prática do método de decisão, além da hipótese nula, elabora-se uma hipótese alternativa específica, que requer uma freqüência de mutação ***m*** vezes maior no tratado, do que a obtida no controle negativo.

A hipótese nula postula que não há diferença na freqüência de mutações entre o controle negativo e o indivíduo tratado, enquanto que a hipótese alternativa postula *a priori*, que os resultados no tratamento têm um aumento nas freqüências de mutações que é ***m*** vezes maior que a freqüência espontânea observada no controle. Além disso, podem acontecer casos em que ambas as hipóteses deverão ser rejeitadas. Isto significa que o tratamento induziu uma resposta genotóxica fraca, com uma freqüência de danos que é significativamente menor que ***m*** vezes a freqüência obtida no controle negativo (FREI; WÜRGLER, 1995).

Para a análise dos efeitos antimutagênicos dos EEs sobre a genotoxicidade induzida pela DXR, os dados foram avaliados de acordo com o teste não paramétrico de Mann-Whitney (FREI; WÜRGLER, 1995).

Com base na frequência de indução de manchas por 10^5 células, a atividade recombinogênica foi calculada como: frequência de recombinação (F_R) = 1 - frequência de mutação (F_M). F_M = frequência de manchas observadas nas moscas BH / frequências de manchas observadas nas moscas MH. A frequência total de manchas (F_T) = total de manchas nas moscas MH (considerando as manchas *mwh* e *flr³*) / N° de moscas; mutação = $F_T \times F_M$; recombinação = $F_T \times F_R$ [Santos *et al.*, 1999; Sinigaglia *et al.*, 2006]. Com base na frequência de manchas corrigida pelo controle por 10^5 célula, as porcentagens de inibição induzida pelos EEs foram calculadas como: (DXR sozinha – EEs mais DXR / DXR sozinha) x 100 (Abraham, 1994).

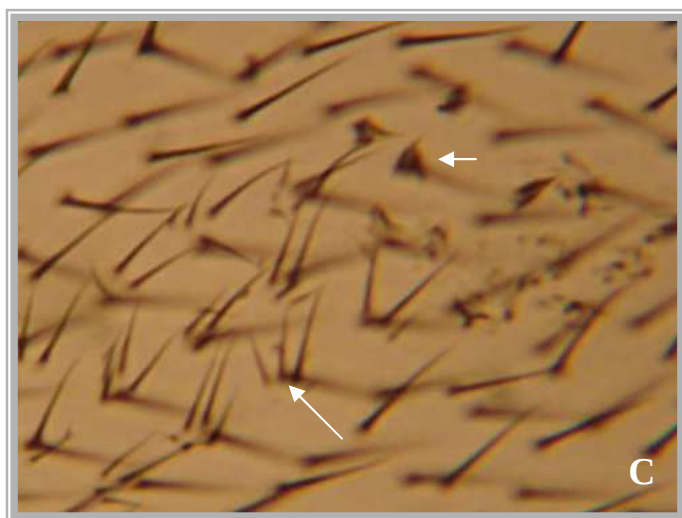
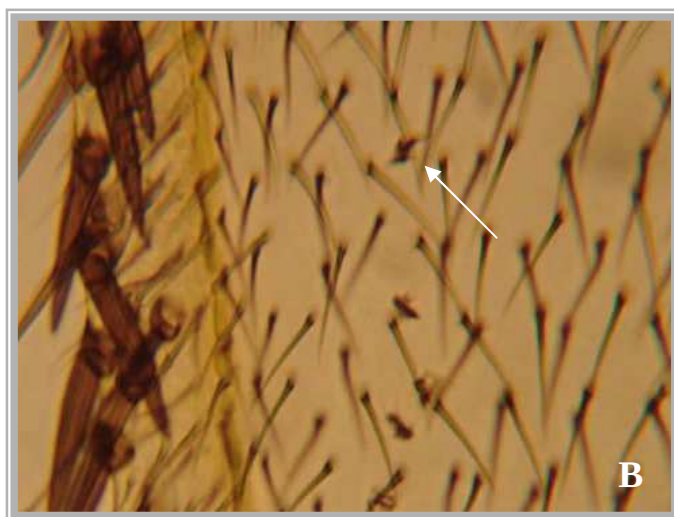
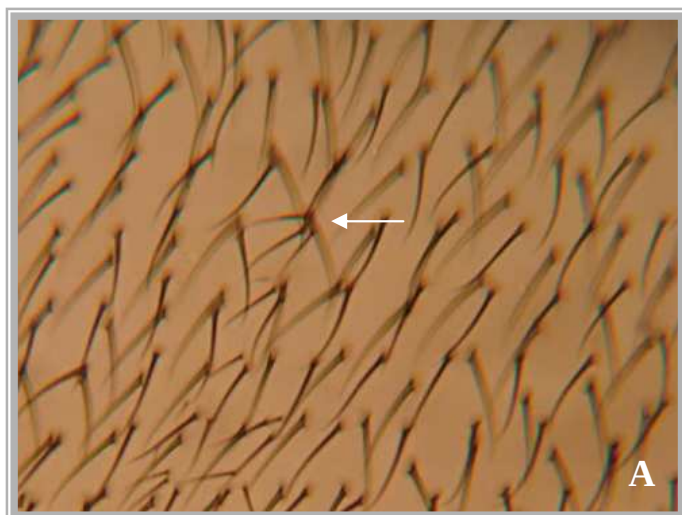


Figura 13. Fotomicrografia mostrando mancha simples com pêlos múltiplos (A); mancha simples com pêlos *flare* (B); e mancha gêmea (C) com pêlos múltiplos (seta maior) e pêlos *flare* (seta menor) adjacentes.

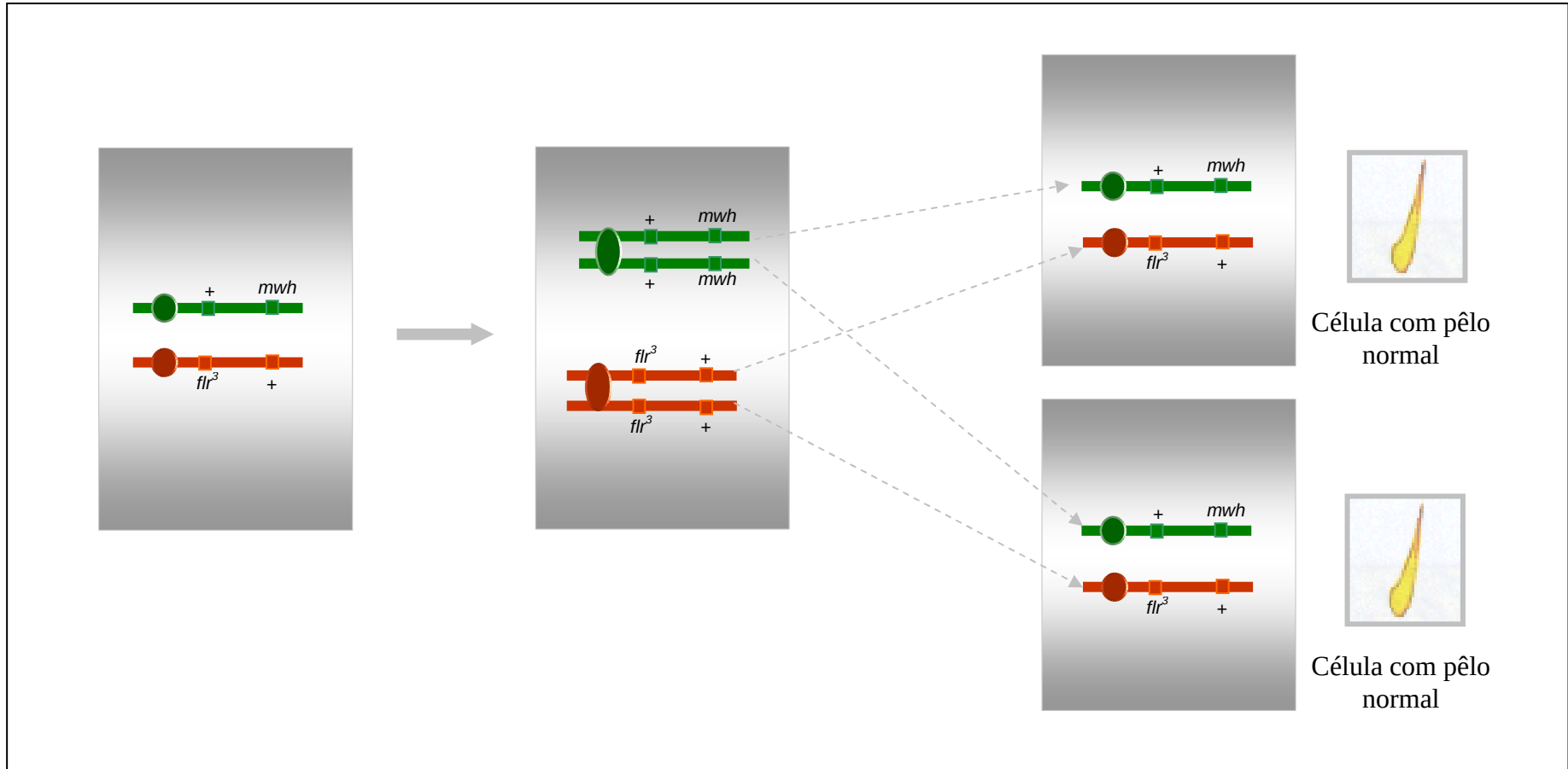


Figura 14. Esquema representativo de divisão mitótica normal em células primordiais dos discos imaginais de asas de *D. melanogaster* (adaptado de GRAF *et al.*, 1984).

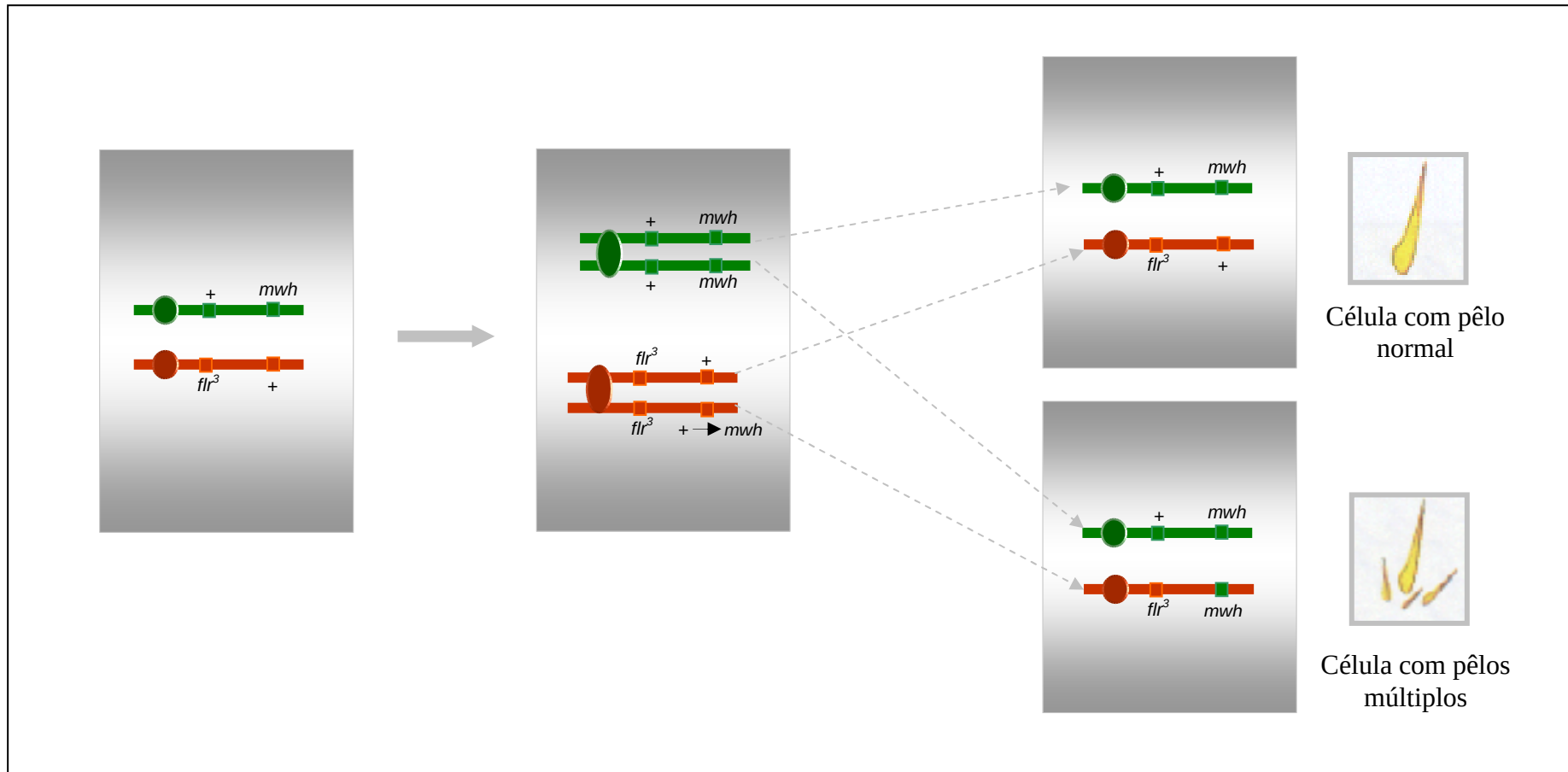


Figura 15. Esquema representativo de divisão mitótica com ocorrência de mutação em células primordiais dos discos imaginais de asas de *D. melanogaster* (adaptado de GRAF *et al.*, 1984).

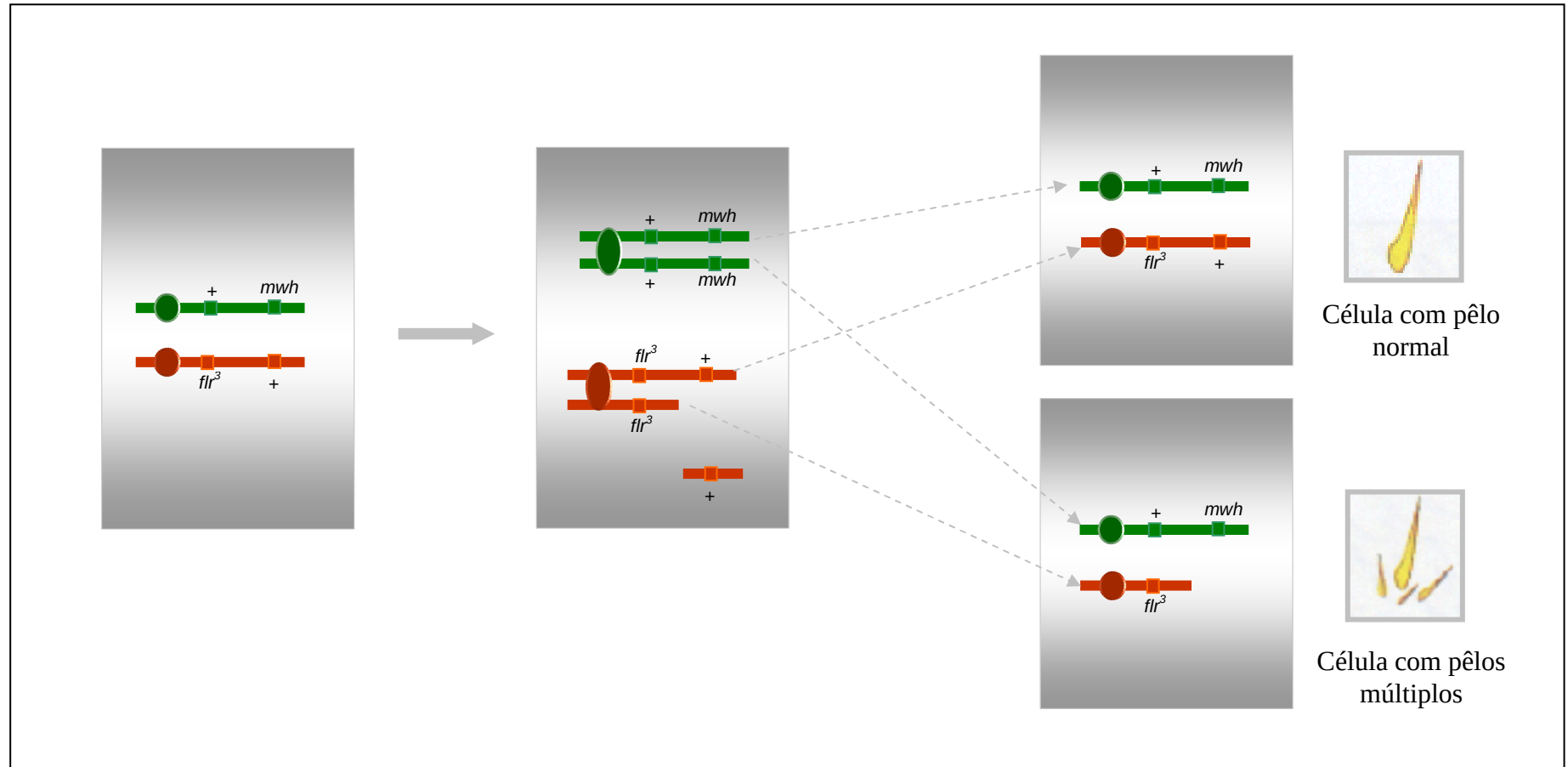


Figura 16. Esquema representativo de divisão mitótica com ocorrência de deleção em células primordiais dos discos imaginais de asas de *D. melanogaster* (adaptado de GRAF *et al.*, 1984).

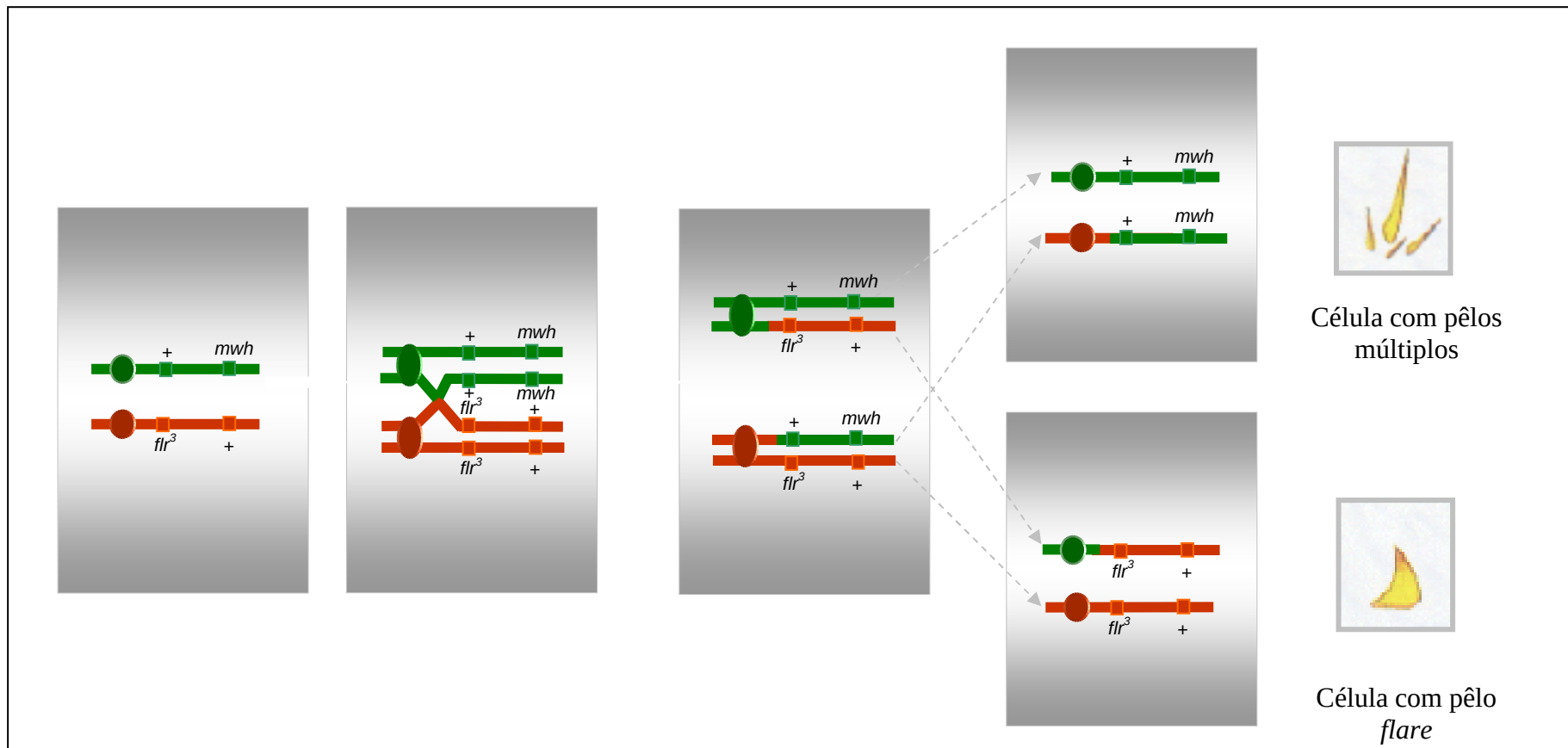


Figura 17. Esquema representativo de divisão mitótica com ocorrência de recombinação entre o centrômero e o locus *flare* em células primordiais dos discos imaginais de asas de *D. melanogaster* (adaptado de GRAF *et al.*, 1984).

1.7.2 Ensaio Antioxidante Utilizando 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH)

O radical sintético DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) não é relevante biologicamente. Porém, o ensaio DPPH é utilizado freqüentemente para avaliar a habilidade dos antioxidantes em seqüestrar os radicais livres, os quais são conhecidos por serem o maior fator de danos biológicos causados pelo estresse oxidativo. Este ensaio é conhecido por fornecer informações confiáveis acerca da habilidade antioxidante dos compostos testados (HUANG *et al.*, 2005).

O ensaio para determinar a presença de atividade antioxidante foi efetuado com os EE das folhas da *A. trinervis*, *N. cissiflora* e *O. minarum*, utilizando-se o teste *in vitro* com 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), através do ensaio espectrofotométrico, com resposta quantitativa.

A capacidade antioxidante de substâncias naturais pode ser avaliada espectrofotometricamente através da facilidade com que o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) recebe um átomo de hidrogênio de uma substância potencialmente antioxidante (**Figura 18**).

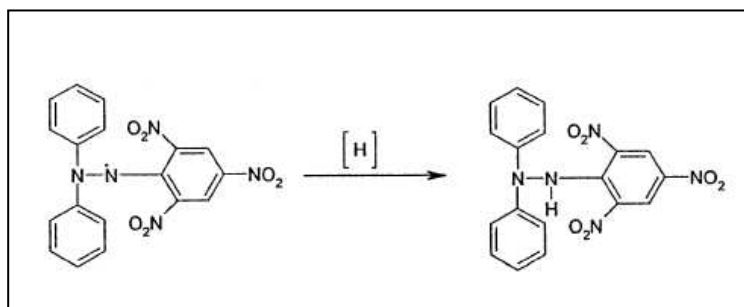


Figura 18. Esquema representativo da adição de um átomo de hidrogênio no radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (JAGETIA *et al.*, 2003).

Em solução, o radical DPPH apresenta uma cor violeta muito intensa, que é conseqüência do elétron desemparelhado. O radical DPPH absorve em 517 nm e um decréscimo neste comprimento de onda ocorre pela estabilização do radical através do recebimento de um hidrogênio radicalar da espécie antioxidante, que é indicada pela mudança da cor da solução (SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2003) (**Figura 19**).

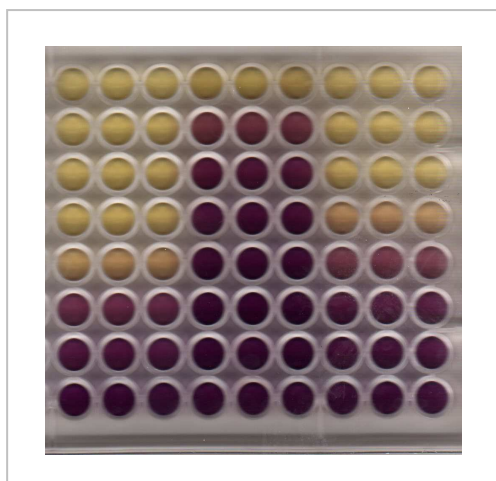


Figura 19. Fotografia de placa de ELISA, demonstrando reação de óxido-redução entre extratos etanólicos e a substância 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). A cor violeta intensa indica a presença de elétrons desemparelhados no radical DPPH. A mudança da cor da solução indica a estabilização do radical, por meio do recebimento de um hidrogênio radicalar da espécie antioxidante (Cortesia da Prof^a Dr^a Lidilhone Harsman, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS).

1.7.2.1 Metodologia para o Ensaio Antioxidante

O ensaio para averiguação da atividade redutora utilizando o teste *in vitro* com DPPH é um procedimento bastante simples. Para tanto, uma solução de DPPH (0,02 mM), utilizada como fonte de radicais livres, foi adicionada com soluções da amostra teste em diferentes concentrações (3,125; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). As medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata, após 30 minutos. Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro, no comprimento de onda 517 nm, tendo como controle positivo o hidroxil tolueno butilado (BHT).

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita seguindo metodologia descrita na literatura, com pequenas modificações, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações.

O decréscimo na absorvidade molar expressa o potencial antioxidante da amostra teste, que é representada por uma curva da concentração pela porcentagem da variação da absorvidade molar (ΔA) (YAMAGUSHI *et al.*, 1998).

A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorbância no tempo de 30 minutos, para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes (% DPPHREM), conforme a equação: $\% \text{DPPHREM} = [\text{DPPH}]_{T=t} / [\text{DPPH}]_{T=0} \times 100$ onde $[\text{DPPH}]_{T=t}$ corresponde à concentração de DPPH no meio, após a reação com o extrato. $[\text{DPPH}]_{T=0}$ é a concentração inicial de DPPH, ou seja, 0,02mM. A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE50), foi determinada usando o programa Microcal Origin 7.5, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando-se na abscissa as concentrações da amostra ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) ou do controle positivo; e na ordenada, a porcentagem de DPPH remanescente (% DPPHREM) (MOREIRA *et al.*, 2005).

2. JUSTIFICATIVA

Neste trabalho foram utilizados EE e metabólitos secundários de plantas da Família Lauraceae, devido a estudos institucionais conduzidos no Departamento de Química e no Departamento de Botânica da UFMS.

Considerando o potencial da família Lauraceae na produção de metabólitos secundários, com ampla atividade biológica citada na literatura, justifica-se uma investigação do efeito mutagênico de EE obtidos das folhas da *A. trinervis*, *N. cissiflora* e da *O. minarum* (Lauraceae) e de três alcalóides, ocoteína e dicentrina, isolados das folhas da *Ocotea acutifolia*, e o triptofol obtido dos frutos da *Ocotea minarum*; e de γ -lactona, isolada de frutos verdes de *A. trinervis*.

A ocoteína é um inibidor de topo II, enquanto a dicentrina é um agente intercalante do DNA, com atividade anti-topo I e anti-topo II. Atualmente, os inibidores de topos são utilizados no tratamento de diferentes tipos de câncer. Considerando que cerca de 60% dos agentes usados como quimioterápicos no tratamento do câncer são substâncias de origem natural (NEWMAN *et al.*, 2003), a investigação da atividade genotóxica desses alcalóides é importante não só como pesquisa básica, mas para as diferentes áreas do conhecimento científico, que poderão utilizar esses resultados como subsídios na busca de outros metabólitos secundários importantes para a produção ou design de novos agentes para o tratamento de diversas doenças, inclusive o câncer.

Neste trabalho também foram investigadas a atividade antioxidante e as potencialidades antimutagênicas dos EE, considerando que, desses extratos, foram isolados, entre outros, metabólitos secundários tais como sesamina, flavonóides, biflavonóides, sesquiterpenos. De acordo com dados da literatura, estes compostos apresentam atividade antioxidante e antigenotóxica. Isto é, reduzem as freqüências de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente do mecanismo de ação. Portanto, é possível que, após serem submetidos a testes apropriados, sejam utilizados como agentes de prevenção de efeitos adversos causados por agentes biológicos, químicos ou físicos que danificam o DNA.

A detecção de substâncias de origem vegetal que modulam os efeitos genotóxicos é de grande importância, podendo auxiliar no entendimento dos mecanismos celulares de mutagênese/carcinogênese, assim como fornecendo informações para a prevenção das alterações gênicas, as quais podem resultar no aparecimento de diversas doenças.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P. K., THAKUR, R. S. 1985. ^{13}C NMR Spectroscopy of Lignan and Neolignan Derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 23, p.389-418.
- ALVES, F. M., ISHII, I. H. 2007. Lauraceae no Município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, 58 (1) p.179-192.
- ANIYA, Y. 2002. **Antioxidants in traditional foods and medicinal plants from Okinawa**. In D. Itokazu, H. Sho, & Y. Nakahara (Eds.), Okinawa international conference on longevity proceedings, 50 p.
- ANTUNES, L. M. G., TAKAHASHI C. S. 1998. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research**, 419, p.137-143.
- ANTUNES, L. M. G., BUENO, R. B. L., DIAS, F. L., BIANCHI, M. L. P. 2007. Acetylsalicylic acid exhibits anti-clastogenic effects on cultured human lymphocytes exposed to doxorubicin. **Mutation Research**, 626, p.155-16.
- ARUOMA, O.I. 1999. Antioxidant action of plant foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. **Free Radical Research**, 30, p.419-427.
- ASENCIO, M., GUZMÁN, C. H., LÓPEZ, J. J., CASSELS. B. K., PROTAIS, P., CHAGRAOUI, A. 2005. Structure–affinity relationships of halogenated predicentrine and glaucine derivatives at D_1 and D_2 dopaminergic receptors: halogenation and D_1 receptor selectivity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 13, p.3699-3704.
- ATOUI, A. K., MANSOURI, A., BOSKOU, G., KEFALAS, P. 2005. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, 89, p.27-31.
- AWADA, A. B., CHINNAM, M., FINK, C. S., BRADFORD, P. G. 2004. Targeting ceramide by dietary means to stimulate apoptosis in tumor cells. **Current Topics Nutrition Research**, 2, p.93-100.
- AWADA, A. B., BURR, A. T., FINK, C. S. 2005. Effect of resveratrol and beta-sitosterol in combination on reactive oxygen species and prostaglandin release by PC-3 cells. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, 72, p.219-226.
- AWADA, A. B., CHINNAMA, M., FINKA, C. S. BRADFORD, P. G. 2007. Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. **Phytomedicine**, 14, p.747-754.
- BAITELLO, J. B. 2001. Novas espécies de Lauraceae para a flora brasileira. **Acta Botânica Brasileira**, 15, p.445-450.

BALANDRIN, M. F. J., KJOCKE, A., WURTELE, E. 1985. Natural plant chemical: source of industrial and medicinal materials. **Science**, 228, p.1154-1169.

BARROSO, G.M., GUIMARÃES, E.F., ICHASO, C.L.F., COSTA, C.G., PEIXOTO, A.L., 2002. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. 2.ed. Viçosa: Editora UFV.

BEG, A. A., BALTIMORE, D., 1996. An essential role for NF-kappa B in preventing TNF-alpha-induced cell death. **Science**, 274, p.782-784.

BRAVO, L. 1998. Polyphenols: chemistry dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, 56, p.317-333.

CARVALHO, M. G. **Lignóides de *Nectandra turbacensis* e *Ocotea porosa***. 1986. 124f. Tese de Doutorado. Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 1986.

CAPRANICO, G., BINASCHI, M., BORGNETTO, M. E., ZUNINO, F., PALUMBO, M. 1997. A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons. **Trends in Pharmacological Sciences**, 18, p.303-346.

CAPRANICO, G., FERRI, F., FOGLI, M. V., RUSSO, A., LOTITO, L., BARANELLO, L. 2007. The effects of camptothecin on RNA polymerase II transcription: Roles of DNA topoisomerase. **Biochimie**, 89, p.482-489.

CARVALHO, M. G., YOSHIDA, M., GOTTLIEB, O. R., GOTTLIEB, H. E. 1986. Lignans from *Nectandra turbacensis*. **Phytochemistry**, 26, p. 256-267.

CERUTTI, P. A., TRUMP, B. F. 1991. Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. **Cancer Cells**, 3, p.1-7.

CHAO, Y. Y., CHEN, I. S., YEH, J. L., CHEN, J. J., KO, Y. C., CHENG, J. S., LIU, C. P., LO, Y. K., SU, W. CHOU, K. J. CHEN, W. C., JAN, C. R. 2002. Novel action of lignans isolated from *Hernandia nymphaeifolia* on Ca^{2+} signaling renal tubular cells. **European Journal of Pharmacology**, 443, p.31-38.

CHO, K. H., PEZZUTO, J. M., BOLTON, J. L., STEELE, V. E., KELLOFF, G. J., LEE, S. K., CONSTANTINOU, A. 2000. Selection of cancer chemopreventive agents based on inhibition of topoisomerase II activity. **European Journal of Cancer**, 36, p.2146-2156.

CORDELL, G. A., QUINN-BEATTIE, M. L., FARNSWORTH, N. R. 2001. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytoterapy Research**, 15, p.183-205.

COSTA, W. F., NEPOMUCENO, J. C. 2006. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic

cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 47, p.18-24.

COYLE, J., KERSHAM, P., GALANTAMINE, A. 2001. Cholinesterase inhibitor that allosterically modulates nicotinic receptors: effects on the course of Alzheimer's disease. **Biology and Psychiatry**, 49, p.289-299.

CRAIG, W. J. 1999. Health-promoting properties of common herbs. **American Journal of Clinical Nutrition**, 70, p.491-499.

CRONQUIST, A. **The Evolution and classification of flowering plants**. 2nd ed. New York, New York Botanical Garden, 1988. 517p.

DALY, J. W. 1998. Thirty years of discovering arthropod alkaloids in amphibian skin, **Journal of Natural Products**, 61, p.162-172.

DE FLORA, S., FERGUSON, R. L. 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, 591, p.8-15.

DEMBITSKY, V. M. 2002. Bromo- and iodo-containing alkaloids from marine microorganisms and sponges. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, 28, p.196-208.

DEMBITSKY, V., M. 2005. Astonishing diversity of natural surfactants: Biologically active marine and terrestrial alkaloid glycosides. **Lipids**, 40, p.11-16.

EVANS, W. C. 1996. **Trease and Evan's. Pharmacognosy**. 14 ed. London: WB Saunders, 612p.

FERGUSON, L. R. 1994. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutation Research**, 307, p.395-410.

FILYAK, Y., FILYAK, O., STOIKA, R. 2007. Transforming growth factor beta-1 enhances cytotoxic effect of doxorubicin in human lung adenocarcinoma cells of A549 line. **Cell Biology International**, 31, p.851-855.

FRAGIORGE, E. J., SPANÓ, M. A., ANTUNES, L. M. G. 2007. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Biology**, 2, p.449-455.

FREI, H., WÜRGLER, F. E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result, **Mutation Research**, 203, p.297-308.

FREI, H., WÜRGLER, F. E. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*, **Mutation Research**, 334, p.247-258.

FORTUNE, J. M., OSHEROFF, N. 2000. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, 64, p.221-253.

GALATI, G., O'BRIEN, P. J. 2004. Potential toxicity of flavonoids other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology & Medicine**, 37, p.287-303.

GARCEZ, W. S., GARCEZ, F. R., SILVA, L. M. G. E., SHIMABUKURO, A. A. 2005. Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. **Journal Braziliam Chemical Society**, 16, p.1382-1386.

GARCÍA-ALONSO, M., PASCUAL-TERESA, S., SANTOS-Buelga, C., RIVAS-GONZALO, J. C., 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chemistry**, 84, p. 13–18

GRACE, S. C., LOGAN, B. A. 2000. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. **Philosophical Transactions Royal Society**, 355, p.1499-1506.

GRAF, U., SPANÓ, M. A., RINCÓN, J. G., ABRAHAM, S. K., ANDRADE, H. H., 1996. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. **African Newsletter on Occupational Health and Safety**, 6(1), p.9-13.

GRAF, U., VAN SCHAİK. N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, **Mutation Research**, 271, p.59-67.

GRAF, U., WÜRGLER, F. E., KATZ, A. J., FREI, H., JUON, H., HALL, C. B., KALE, P.G. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Mutagenesis**, 6, p.153-188.

GOTTLIEB, O. R., YOSHIDA, M. 1978. Neolignanas antitumorais. **Ciência e Cultura**, 32, p.93-100.

GOTTLIEB, O. R., BORIN, M. R. M. B. 1994. The diversity of plants. Where is it? Why is it there? What will it become? **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 66 (Supl. 1 - Parte I) p.205-210.

GÜLKAÇ, M. D., AKPINAR, G. USTUN, H. OZON KANLI A. 2004. Effects of Vitamin A on doxorubicin-induced chromosomal aberrations in bone marrow cells of rats, **Mutagenesis**, 19, p.231-236.

GUZMÁN-RINCÓN, J., GRAF, U. ***Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor**. In: F.M. Butterworth, L.D. Corkum and J. Guzmán-Rincón (Eds.), *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Plenum Press, New York, 1995, p.169-181.

GUYTON, K. Z., KENSLER, T. W. 1993. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. **British Medical Bulletin**, 49, p.523-544.

HAMMER, K. D. P., HILLWIG, M. L., JEFFREY, D. N., SIM, Y. J., KOHUT, M. L., WIEMER, D. F., WURTELE, E.S., BIRT, D. F. 2008. Pseudohypericin is necessary for the light-activated inhibition of prostaglandin E2 pathways by a 4 component system mimicking an *Hypericum perforatum* fraction. **Phytochemistry**, *In Press*.

HARBONE, J. B. 1990. Role of secondary metabolites in chemical defense mechanisms in plants. Bioactive compounds from plants. **Ciba Foundation Symposium**, 154, p.126-139.

HARTMANN, T. 1996. Diversity and variability secondary metabolism of plant: a mechanistic view. **International Experiment Applied**, 80, p.177-181.

HASLAM, E. 1996. Natural polyphenol (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal Natural Products**, 59, p.205-215.

HAYDER, N., BOUHLEL, I., SKANDRANI I., MALIKA KADRI, M., STEIMAN, R., GUIRAUD, P., MARIOTTE, A. M., KAMEL, GHEDIRA, K., MARIE-GENEVIEVE, DIJOUX-FRANCA, M. G., CHEKIR-GHEDIRA, L. 2008. In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis*: Modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. **Toxicology in Vitro**, 22, p. 567-581.

HENRIQUES, A. T., LIMBERGER, R. P., KERBER, V. A., MORENO, P. R. H. (2004). Alcalóides: Generalidades e Aspectos Básicos. In: Simões, C. M. Q, Schenkel, E.P., Goamann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. (Eds) (2004). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5ª Ed. Editora Universidade/ UFRGS. Porto Alegre.

HESSE, M. 2002. **Alkaloids: Nature's Curse or Blessing?** Wiley-VCH Press, Weinheim. 400 p.

HEO, M. Y., SOHN, S. J., AU, W. W. 2001. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. **Mutation Research**, 448, p.135-150.

HOET, S., STÉVIGNY, C., BLOCK, S., OPPERDOES, F., COLSON, P., BALDEYROU, B., LANSIAUX, A., BAILLY, C., QUETIN-LECLERCQ, J. 2004. Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: Antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. **Planta Medica**, 70, p.407-413.

HUANG, R. L., CHEN, C. C., HUANG, Y. L., OU, J. C., HU, C. P., CHEN, C. F., CHANG, C. 1998. Anti-tumor effects of d-dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. **Planta Medica**, 64, p.212-215.

HUANG, D., OU, B., PRIOR, R. L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 53, p.1841-1856.

IDAOMAR, M., EL HAMSS, R., BAKKALI, F., MEZZOUG, N., ZHIRI, A., BAUDOUX, D., MUÑOZ-SERRANO, A., LIEMANS, V., ALONSO-MORAGA, A. 2002. Genotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, 513, p.61-68.

JACKSON, J. H. 1994. Potential molecular mechanisms of oxidant-induced carcinogenesis. **Environmental Health Perspective**, 102, p.155-158.

JAGETIA, G. C., VENKATESHA, V. A., REDDY, T. K. 2003. Naringin, a citrus flavonone, protects against radiation induced chromosome damage in mouse bone marrow. *Mutagenesis*, 18, p.337-343.

JAYASINGHE, L., KUMARIHAMY, M. B. M., JAYARATHNA, N. K. H. R., UDISHANI, G. N. W. M., BANDARA, R. B. M., HARA, N., FUJIMOTO, Y. 2003. Antifungal constituents of the stem bark of *Bridelia retusa*. **Phytochemistry**, 62, p.637-641.

JIAO, Y., DAVIN, L. B., LEWIS, N. G. 1998. Furanofuran lignan metabolism as a function of seed maturation in *Sesamum indicum*: methylenedioxy bridge formation. **Phytochemistry**, 49, p.387-394.

KAPLAN, M. A. C., FIGUEIREDO, M. R., GOTTLIEB, O. R. 1994. Chemical diversity of plants from Brazilian cerrados. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 66 (Supl. 1 - parte I) p.50-55.

KASHIWADA, Y., AOSHIMA, A., IKESHIRO, Y., CHEN, Y. P., FURUKAWA, H., ITOIGAWA, M., FUJIOKA, Y. 2005. Anti- HIV benzyloquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera* and structure – activity correlations with related alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 13, p. 443-438.

KASTENBAUM, M. A., BOWMAN, K. O. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, **Mutation Research**, 9, p.527-549.

KATO, M. J., CHU, A., DAVIN, L. B., LEWIS, N. G. 1998. Biosynthesis of antioxidant lignans in *Sesamum indicum* seeds. **Phytochemistry**, 47, p.583-591.

KINGMA, P. S., OSHEROFF, N. 1998. The response of eukaryotic topoisomerases to DNA damage. **Biochemical Biophysical Acta**, 1400, p.223-232.

KITTS, D. D. 1994. Bioactive substances in food: identification and potential uses. **Canadian Journal Physiology Pharmacology**, 76, p.423-424.

KONG, A. N., YU, R., HEBBAR, V., CHEN, C., OWUOR, E., HU, R., CHEN, R., MANDLEKAR, S. 2001. Signal transduction events elicited by cancer prevention compounds. **Mutation Research**, 480, p.231-241.

KRIS-ETHERTON, P. M., HECKER, K. D., BONANOME, A., COVAL, S. M., BINKOSKI, A. E., HILPERT, K. F., GRIEL, A. E., ETHERTON, T. D. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **American Journal Medicine**, 113, p.71-88.

KUTCHAN, T. M. 2001. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. **Plant Physiology**, 125, p.58-63.

LAM, L. K. T., ZHENG, B. L. 1991. Effects of essential oils on glutathione S-transferase activity in mice. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 39, p.660-667.

LAMSON, D. W., BRIGNALL, M. S. 1999. Antioxidants in cancer therapy: their actions and interactions with oncology therapies. **Alternative Medicine Review**, 4, p.304-329.

LAOHAVECHVANICH, P., KANGSADALAMPAI K., TIRAWANCHAI N., KETTERMAN, A. J. 2006. Effect of different Thai traditional processing of various hot chili peppers on urethane-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*: Assessment of the role of glutathione transferase activity. **Food and Chemical Toxicology**, 44, p.1348-1354

LARSEN, A. T., GOBERT, C., GILBERT, C., MARKOVITS, J., BOJANOWSKI, K., SKALADANOWSKI, A. 1998. DNA topoisomerases as repair enzymes: Mechanism(s) of action and regulation by p53. **Acta Biochimica Polonica**, 45, 535-544.

LEE, V., RANDHAWA, A. K., SINGAL, P. K. 1999. Adriamycin-induced myocardial dysfunction in vitro is mediated by free radicals. **American Journal of Physiology**, 261, p.989-995.

LEMANN, M., VILAR, K. S. P., FRANCO, A., REGULY, M. L., ANDRADE, H. H. R. 2004. Activity of topoisomerase inhibitors daunorubicin, idarubicin, and aclarubicin in the *Drosophila* somatic mutation and recombination test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 43, p.250-257.

LINDROTH, R. L., HSIA, M. T. S., SCRIBER, J. M. 1987. Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, 15, p.681-685.

LING, W.H., JONES, P. J. H. 1995. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits, and side effects. **Life Sciences**, 57, p.195-206.

LIU, Q. Y., TAN, B. K., 2000. Effects of cis-unsaturated fatty acids on doxorubicin sensitivity in P388/DOX resistant and P388 parental cell lines. **Life Sciences**, 67, p.1207-1218.

LYKKESFELDT, J., SVENDSEN, O., 2007. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. **The Veterinary Journal**, 173, p.502-511.

MANACH, C., WILLIAMSON, G., MORAND, C., RÉMÉSY, C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans: I Review of 97 bioavailability studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, 81 (Suppl), p. 230-242.

MARNETT, L. J. 2000. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, 21, p.361-370.

MARQUES, R. C., MEDEIROS, S. R. B., DIAS, C. S., BARBOSA-FILHO, J. M., AGNES-LIMA, L. F. 2003. Evalution of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. **Mutation Research**, 536, p.117-120.

MARTINS, M. 2004. **Estudo químico da raiz, caule e folhas de *Aiouea trinervis* (Lauraceae)**. Dissertação de Mestrado. UFMS, Departamento de Química. Campo Grande – MS.

MORAES, P. L. R. 2005. Sinopse das Lauraceas nos Estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Biota Neotropica**, 5, p.1-18.

MORENO, P. R. H., VON POSER, G. L., RATES, S. M. K., YOSHIDA, M. 1993. "Chemical constituents and antitumor acitivity of *Nectandra grandiflora*". **International Journal Pharmacology**, 31, p.189-192.

MORO, J. C. 1985. **Estudo fitoquímico de *Nectandra purela* (schott) Mess.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. Departamento de Química, Campinas – SP.

MIRANDA, A. C. M. 2008. **Estudo químico das folhas e caule da *Nectandra cissiflora* (Lauraceae)**. Dissertação de Mestrado. UFMS, Departamento de Química, Campo Grande – MS.

MOREIRA, D. L., 2005. Antioxidant and Antiviral properties of *Pseudopiptadenia contorta* (Leguminosae) and of quebracho (*Schinopsis* sp.) EXTRACTS. **Química Nova**, 28, p.421-425.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M., SNADER, K. M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, 66, p.1022-1037.

NIGRO, J. M., BAKER, S. J., PREISINGER, A. C., JESSUP, J. M., HOSTETTER, R., CLEARY, K., BIGNER, S. H., DAVIDSON, N., BAYLIN, S., DEVILEE, P. 1989. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. **Nature**, 342, p.705-708.

NOGUEIRA, C. R. 2007. **Sesquiterpenos das Folhas de *Ocotea minarum* (Meissn) Mez. (Lauraceae)**. Monografia. UFMS, Departamento de Química, Campo Grande – MS.

NOZAKA T., WATANABE, F., TAAKI, S., ISHINO, M., MORIMOTO, I., KUNITOMO, J., ISHII, H., NATORI, H. 1990. Mutagenicity of isoquinoline alkaloids, especially of the aporphine type. **Mutation Research**, 240, p.267-279.

OLINSKI, R., GACKOWSKI, D., FOKSINSKI, M., ROZALSKI, R., ROSZKOWSKI, K., JARUGA, P. 2002. Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. **Free Radical Biology Medicine**, 33, p.192-200.

OWEN, R. W., GIACOSA, A., HULL, W. E., HAUBNER, R., SPIEGELHALDER, B., BARTSCH, H. 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **European Journal of Cancer**, 36, p.1235-1247.

PARKER, R. S., SONTAG, T. J., SWANSON, J. E. 2000. Cytochrome P-450 dependent metabolism of tocopherols and inhibition by sesamin. **Biochemical Biophysical Research Communications**, 277, p.531-534.

PATEL, R., GARG, R., ERANDE, S., MARU, G. B. 2007. Chemopreventive herbal anti-oxidants: current status and future perspectives. **Journal Clinical Biochemistry and Nutrition**, 40, p.82-91.

PELLETIER, S. W. 2001. (ed.), **Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives**, Vol. 15, Pergamon, London, 442p.

PICMAN, A. K. 1986. Biological activities of sesquiterpenes lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, 14, p.255-281.

QUILES, J. L., HUERTAS, J. R., BATTINO, M., MATAIX, J., RAMIREZ-TORTOSA, M. C. 2002. Antioxidant nutrients and andriamycin toxicity. **Toxicology**, 180, p.79-95.

QUINET, A., ANDREATA, R. H. P. 2002. Lauraceae na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, 53, p.59-121.

RAMOS, S. 2007. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 18, p.427-442.

ROBBERS, J. E., SPEEDIE, M. K., TYLER, V. E. 1996. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 325p.

ROCA-PÉREZ, L., BOLUDA, R., GAVIDIA, I., PÉREZ-BERMÚDEZ, P. 2004. Seasonal cardenolide production and *Dop5βr* gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. **Phytochemistry**, 65, p.1869-1872.

RODRIGUEZ, E., TOWERS, G. H. N., MITCHELL, J. C. 1976. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Phytochemistry**, 15, p.1573-1580.

ROHWER, J. G. 1993. **Lauraceae. In The families and genera of vascular plants**. v.2. Flowering plants. Dicotyledons (K. Kubitzki, J.G. Rohwer & V. Bittrich, eds.). Springer-Verlag, Berlin, 366 p.

ROMERO-JIMÉNEZ, M., CAMPOS-SÁNCHEZ, J., ANALLA, M., MUÑOZ-SERRANO, A., ALONSO-MORAGA, A. 2005. Genotoxicity and anti-genotoxicity of same traditional medicinal herbs. **Mutation Research**, 585, p.147-155.

SAKAKIBARA, H., HONDA, Y., NAKAGAWA, S., ASHIDA, H., KANAZAWA, K. 2003. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, p.571-581.

SANTOS, J. H., GRAF, U., REGULI, M. L., ANDRADE, H. H. R. 1999. The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, 444, 355-365.

SANTOS, I. R. 2004. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: C.M. Simões et al. (eds). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5^o ed. Porto Alegre, Editora da Universidade do Rio Grande do Sul, 404p.

SCHRIPSEMA, J., DAGNINO, D., GOSMANN, G. 2004. Alcalóides indólicos. In: Simões, C.M.Q.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (eds) 2004. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^a ed. Editora Universidade/ UFRGS, Porto Alegre.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G., RODRIGUEZ, J. A., THEODULOZ, C., ASTUDILLO, S. L., FERESIN, G. E., TAPIA, A. 2003. Free radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). **Free Radical Research**, 37, p.447-452.

SCORA, R. W., SCORA, P. E. 2001. "Essential leaf oil of *Persea subgenus* Eriodaphe and closely related Perseoid genera". **Journal of essential oil Research**, 13, p.37-42.

SILVA, I. G., BARBOSA-FILHO, J. M., SILVA, M. S., LACERDA, C. D. G., CUNHA, E. V. L. 2002. Coclaurine from *Ocotea duckei*, **Biochemical Systematics and Ecology**, 30, p.881-883.

SIMÕES, C. M. Q., SCHENKEL, E. P., GOAMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (Eds) (2004). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5^a Ed. Editora Universidade/ UFRGS. Porto Alegre.

SINGAL, P. K., LI, T., KUMAR, D., DANIELSEN, I., ILISKOVIC, N. 2000. Adriamycin-induced heart-failure: mechanism and modulation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 20, p.77-85.

SINIGAGLIA, M., LEHAMANN, M., BAUMGARDT, P., AMARAL, V. S., DIHL, R. R., REGULY, M. L., ANDRADE, H. H. R. 2006. Vanillin as a modulator agent in SMART test: Inhibition in the steps that precede N-methyl-N-nitrosourea-, N-ethyl-N-nitrosourea-, ethylmethanesulphonate- and bleomycin-genotoxicity. **Mutation Research**, 607, p.225-230.

SMITH, M. A., PERRY, G., RICHEY, P. L., SAYRE, L. M., ANDERSON, V. E., BEAL, M. F. 1996. Oxidative damage in Alzheimer's. **Nature**, 382, p.120-121.

SOMEI, M., YAMADA, F. 2005. Alkaloids and those with a non-rearranged monoterpenoid. **Natural Products Reports**, 22, p.73-103.

SOUZA, N. C., CARVALHO, S., SPANÓ, M. A., GRAF, U. 2003. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 41, p.293-299.

STAVRIC, B. 1994. Antimutagens and anticarcinogens in foods, **Food Chemical Toxicology**, 32, p.79-90.

STEIGNY, C., BAILLY, C., QUETIN-LECLERCQ, J. 2005. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids, **Current Medicinal Chemistry Anti-Cancer Agents**, 5, p.173-182.

STEWART, L., REDINBO, M. R., QUI, X.; HOL, W. G. J., CHAMPOUX, J. 1998. A model for the mechanism of human topoisomerase. **Journal of Science**, 279, p.1534-1539.

ST. JOHN, M. A. R., XU, T. 1997. Insights from model systems. Understanding human cancer in a fly? **American Journal Human Genetics**, 61, p.1006-1010.

SWIFT, L. P., REPHAELI, A., NUDELMAN, A., PHILLIPS, D. R., CUTTS, S. M. 2006. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II mediated form of cell death. **Cancer Research**, 66, p.4863-4871.

TABATA, H., KATSUBE, T., TSUMA, T., OHTA, Y., IMAWAKA, N., UTSUMI, T. 2008. Isolation and evaluation of the radical-scavenging activity of the antioxidants in the leaves of an edible plant, *Mallotus japonicas*. **Food Chemistry**, 109, p.64-71.

TALALAY, P. 1989. Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis, **Advances Enzyme Regulation**, 28, p.237-250.

TAIZ, L., ZEIGER, E. 2004. trad. Eliane Romanato Santarém... [et al.].- **Fisiologia Vegetal**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 719p.

TEPSUWAN, A., KUPRADINUN, P., WANNEE, R., KUSAMRAN, E. 1999. Effect of *Siamese cassia* leaves on the activities of chemical carcinogen metabolizing enzymes and on mammary gland carcinogenesis in the rat. **Mutation Research**, 428, p.363-373.

TINCKOO, S., RUSSEL, S. 2002. *Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery and pathway screening. **Current Opinion Pharmacology**, 2, p.555-560.

TOPCU, Z., 2001. DNA topoisomerases as targets for anticancer drugs. **Journal Clinical Pharmacology Therapeutics**, 26, p.405-416.

TREVISAN, M. G., POPPI, R. J., 2003. Determination of doxorubicin in plasma by excitation-emission matrix fluorescence and multi-way analysis. **Analytica Chimica acta**, 493, p.69-81.

TSAI, I. L., CHEN, J. K., DUH, C. Y., CHEN, I. S. 2000. Cytotoxic neolignans from the stem wood of *Machilus obovatifolia*. **Planta Medica**, 66, p.403-407.

TSAI, I. L., HUNG, C. H., DUH, C. Y., CHEN, I. S. 2002. Cytotoxic butanolides and secobutanolides from the stem wood of Formosan *Lindera communis*. **Planta Medica**, 68, p.142-145.

VALADARES, B. L. B., GRAF, U., SPANÓ, M. A. 2008. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Food Chemical Toxicology**, 46, p.1103-1110.

VALKO, M., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., RHODES, C. J., TELSER, J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence **Molecular and Cellular Biochemistry** 266, p.37-56.

VERHAGEN, H., ROMPELBERG, C. J. M., STRUBE, M., van POPPEL, G., van BLADEREN, P. J., 1997. Cancer prevention by dietary constituents in toxicological perspective. **Journal Environmental Pathology Toxicology Oncology**, 16, p.343-360.

VICENTINI, A., H. V. D. WERFF, S. NICOLAU. 1999. **Lauraceae**. In **Flora da Reserva Ducke – Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**, edited by J. E. L., Ribeiro, M. J. G., HOPKINS, A., VICENTINI, C. A. SOTHERS, M. A. DA S. COSTA, J. M. DE BRITO, M. A. D. DE SOUZA, L. H. P. MARTINS, L. G. LOHMANN, P.A.C.L. ASSUNÇÃO, E. DA C. PEREIRA, C. F. DA SILVA, M. R. MESQUITA, and L.C. PROCÓPIO. Vol. 1, 150-179. Manaus: INPA-DFID.

VOGEL, W., GRAF, U., FREI, H., NIVARD, M. M. 1999. **The results of assay in Drosophila as indicators of exposure to carcinogens**. In: The Use of Short- and Medium- Term Tests for Carcinogenic Hazard Evaluation (McGregor, D.B., Rice, J.M.)

ZANIN, S. M. W., LORDELLO, A. L. L. 2007. Aporphine alkaloids in *Ocotea* species (Lauraceae) **Química Nova**, 30, 92-98.

ZHANG, X. Y., LI, W. G., WU, Y.J., ZHENG, T. Z., LI, W., QU, S. Y., LIU, N. F. 2005. Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism. **International Immunopharmacol**, 5, p.1247-1257.

ZHOU, B. N., JOHNSON, R. K., MATTERN, M. R., WANG, X., HECHT, S. M., BECK, H. T., ORTIZ, A., KINGSTON, D. G. J. 2000. Isolation and Biochemical characterization of a new topoisomerase I inhibitor from *Ocotea leucoxyloides* **Journal Natural Products**, 63, p.217-220.

WANG, C. K., PENG, C. H. 1996. The mutagenicities of alkaloids and N-nitrosoguvacoline from etel quid. **Mutation Research**, 360, p.165-171.

WERFF, H. WAN DER & RICHTER, H. G. 1996. **Toward and improved classification of Lauraceae**. Annals of the Missouri Botanical Garden, v. 8, p. 419-432.

WILKINSON, I. V. J., CLAPPER, M. L. 1997. Detoxication enzymes and chemoprevention. **Proceedings Society Experimental Biology and Medicine**, 216, p.192-200.

WINK, M. 1990. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B. V., RHODES, M. J. C. (Ed). **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon, 245 p.

WOO, S. H., SUN, N. J., CASSADY J. M., SNAPKA, R. M. 1999. Topoisomerase II Inhibition by aporphine alkaloids. **Biochemical Pharmacology**, 57, p.1141-1145.

YAMAGUCHI, T., TAKAMURA, H., MATOBA, T., TERAOKA, J. 1998. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 62, p.1201-1204.

YANDELL, D. W., CAMPBELL, T. A., DAYTON, S. H., PETERSEN, R., WALTON, D., LITTLE, J. B., MCCONKIE-ROSELL, A., BUCKLE, E. G., DRYJA, T. P. 1989. Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: Their application to genetic counseling. **New England Journal of Medicine**, 321, p.1689-1695.

YANG, C. S., LANDAU, J. M., HUANG, M. T., NEWMARK, H. L. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review Nutrition**, 21, p.381-406.

YU, C. K. Y., SHIH, C. H., CHU, I. K., LO, C. 2008. Accumulation of trans-piceid in sorghum seedlings infected with *Colletotrichum sublineolum*. **Phytochemistry**, 69, p.700-706.

Capítulo 2

Assessment of the antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of ethanolic extracts of *Aiouea trinervis* in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*

Manuscript for Environmental and Molecular Mutagenesis

Assessment of the antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of ethanolic extracts of *Aiouea trinervis* in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*

Zaira da Rosa Guterres^{1, 2}, Alexandre Azenha Alves de Rezende², Lidilhone Harsman³, Lillian May Grespan Estodutto da Silva³, Fernanda Rodrigues Garcez³, Neila Coelho de Souza², Mário Antônio Spanó^{2*}

¹Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Mundo Novo (Estado do Mato Grosso do Sul – MS), Brazil

²Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Uberlândia (Estado de Minas Gerais – MG), Brazil

³Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Departamento de Química, Campo Grande (Estado do Mato Grosso do Sul – MS), Brazil

Running title: Antioxidant and Antimutagenic activities of *Aiouea trinervis*

*Corresponding author address: Mário Antônio Spanó, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Mutagênese. Av. Pará 1720, Umuarama, Uberlândia, MG, 38400-902, Brazil. Tel.: +55 34 32182505.

E-mail address: maspano@ufu.br

ABSTRACT

Aiouea trinervis Meisn. is a shrub that grows in the “cerrados” (a savanna ecosystem) of Brazil. In the present study, fractionation of ethanolic extracts (EE) from the leaves of *A. trinervis* led to the isolation of the butanolide (γ -lactone) namely isoobtusilactone A, as well as the lignans namely sesamin, methylpiperitol and polyprenol-12. Their structures were determined by spectroscopic analyses. The anti-oxidant effects of the EE obtained from leaves of *A. trinervis* were examined using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay. The data obtained revealed antioxidant activity. The lack of information related to the genotoxic and antigenotoxic properties of EE from the leaves of *A. trinervis* prompt us to study this EE alone and in association with the chemotherapeutic free-radical generator doxorubicin (DXR), used as reference mutagen. The genotoxic properties were evaluated for mutagenic and recombinagenic effects using the wing spot test of *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART). The standard and the high bioactivation crosses were used. The latter cross is characterized by a high sensitivity to promutagens and procarcinogens. The results observed in both crosses were similar and indicated that EE from the leaves of *A. trinervis* did not show genotoxicity at the doses used and suppressed the DNA damage induced by DXR in a dose-dependent manner. The combined treatments demonstrated that EE have anti-mutagenic activity. Besides, the genotoxic properties of crude EE from fruits of *A. trinervis* and of the γ -lactone fraction were also evaluated with the *D. melanogaster* standard cross. No statistically significant differences in spot frequencies between controls and treated series were observed. The results indicate that, under these experimental conditions, EE from the leaves or fruits of *A. trinervis* as so as the γ -lactone fraction are not genotoxic, and that EE from the leaves of *A. trinervis* protects against the genotoxic effects of the DXR, probably due to the *A. trinervis* anti-oxidant activity.

Keywords: Somatic Mutation And Recombination Test; SMART; γ -lactone; lignans; wing spot test.

INTRODUCTION

The anti-tumour screening of Brazilian plants led to the isolation and identification the active phytochemicals and confirmed the continuing importance of natural product screening models, alongside targeted drug development, in the discovery of new anti-neoplastic pharmacophores [Monks et al., 2002]. The isolation of natural compounds from medicinal plants has been of increasing interest [Cai et al., 2004]. These compounds have been also the target of interest on antimutagenesis [Calomme et al., 1996] and antioxidant activities [Yagi et al., 2002].

The Lauraceae is an economically important family, with 52 genera and approximately 2500–2750 species, consisting mostly of trees or tree-like shrubs, rich in biologically active secondary metabolites, such as neolignins, γ -lactones, alkaloids, flavonoids and terpenes, which have shown different biological properties [Gottlieb, 1972; Henriques et al., 2000; Tsai et al., 2000; Garcez et al., 2005; Chang et al., 2008; Wang et al., 2008].

The *Aiouea trinervis* Meisn., 1864. (Laurales, Lauraceae) is a shrub that grows in the "cerrados" (a savanna ecosystem) of Mato Grosso do Sul, Brazil, and is considered an endangered Brazilian species [Garcez et al., 2005]. As previously demonstrated the fractionation of the ethanolic extracts from the roots, the underground trunk and the leaves of *A. trinervis* led to the isolation of four butanolides (γ -lactones), namely (-)-epilitsenolides C-2 and C-1, isobtusilactone A and obtusilactone A; and the lignans (+)-sesamin, (+)-methylpiperitol and polyprenol-12 [Garcez et al., 2005].

The γ -lactones (-)-epilitsenolides C-2 and C-1 induced cytotoxic activities in Hep(2) human cancer cells [Garcez et al., 2005]. Isoobtusilactone A displayed cytotoxic activity in Hep(2) human cancer cells and DNA damage on CHO K1 and HTC mammalian cells assayed with single-cell gel electrophoresis (comet assay) [Garcez et al., 2005]. When isolated from the stem wood of Formosan *Lindera communi* showed cytotoxic effects against P-388 cancer cell lines [Tsai et al., 2002]; isolated from the leaves of *Cinnamomum kotoense* demonstrated to be an agent capable of inducing anticancer effects in two human breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231 [Kuo et al., 2007] and on human non-small cell lung

cancer (NSCLC) A549 cells [Chen et al., 2008]; as so as apoptotic cell death of Hep G2 cells mediated via both caspase-dependent and -independent pathways [Liu et al., 2008]. The lignans (+)-sesamin and (+)-methylnorpiperitol were shown to possess moderate cytotoxic effects in Hep(2) human cancer cells and genotoxic properties on CHO K1 and HTC mammalian cells with comet assay [Garcez et al., 2005]. Labaj et al. [2003] described the protective effects of several lignin polymers against the genotoxic effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) tested in hamster lung V79 cells and human colon Caco-2 cells. The ethanolic extracts from the roots, the underground trunk and the leaves of *A. trinervis* showed genotoxic properties on CHO K1 and HTC mammalian cells with comet assay [Garcez et al., 2005].

The DPPH molecule is characterized as a stable-free radical by virtue of the delocalization that gives rise to a deep violet color, characterized by an absorption band in ethanol solution centered at 517 nm. When a solution of DPPH is mixed with a substance that can donate a hydrogen atom, this gives rise to the reduced form (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine), with the loss of the violet color [Bouhlef et al., 2007].

Free radicals generated by exogenous chemicals or endogenous metabolic processes in food systems may cause oxidative damage by oxidizing biomolecules and result in cell death and tissue damage [Kehrer, 1993]. Antioxidants can protect the human body from free radicals and retard the progress of many chronic diseases [GöktürkBaydar et al., 2007].

The genotoxic agent doxorubicin (DXR), also named adriamycin, is an anthracycline antibiotic obtained from *Streptomyces peucetius* that has been used for the treatment of a wide variety of cancers [Quiles et al., 2002]. It is widely accepted that oxidative stress and the production of free radicals is involved in DXR action [Singal et al., 2000]. Thus, it has been reported that DXR leads to direct oxidative injury to DNA [Feinstein et al., 1993], generates lipid peroxidation [Quiles et al., 1999a] and also targets DNA topoisomerase II [Horenstein et al., 2000]. The decrease of DXR genotoxicity in non-tumour cells is the aim that has been achieved experimentally by combined treatments of DXR with free radical scavengers and antioxidants [Antunes and Takahashi, 1998; Costa and

Nepomuceno, 2006; Tavares et al., 2006; Antunes et al., 2007; Fragiorge et al., 2007; Valadares et al., 2008].

The wing somatic mutation and recombination test (SMART) using *Drosophila melanogaster* has shown to be a sensitive, rapid and inexpensive tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity [Graf et al. 1996]. The SMART in *D. melanogaster* has been successfully used to demonstrate the protective effects of different free radical scavengers on the genotoxicity of DXR [Costa and Nepomuceno, 2006; Fragiorge et al., 2007; Valadares et al., 2008].

Considering the lack of information related to the antioxidant activity of ethanolic extracts (EE) of the leaves of *Aiouea trinervis*, the aim of the present study was to investigate its antioxidant properties using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay as the marker for antioxidant activity. The lack of information related to the genotoxic and antigenotoxic properties of EE from the leaves of *A. trinervis* prompt us to study this EE alone and in association with the chemotherapeutic free-radical generator doxorubicin (DXR). The genotoxic and antigenotoxic properties were evaluated using the SMART. Besides, the genotoxic properties of crude EE from fruits of *A. trinervis* and of the γ -lactone fraction were also evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Doxorubicin (DXR) (Doxolen® - Eurofarma Laboratórios Ltda., São Paulo - SP, Brazil (CAS 23214-92-8) was obtained from the Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia - MG, Brazil. The ethanolic extracts (EE) were produced and supplied by the Chemical Department of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande - MS, Brazil. The EE were always freshly prepared immediately before use and dissolved in 1% tween-80 (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema – SP, Brazil) and 3% ethanol (Proquímios, Rio de Janeiro – RJ, Brazil) and distilled water. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (CAS 1898-66-4) and butylated hydroxyl toluene (BHT) (CAS 128-38-0) were obtained from Sigma–Aldrich Brasil Ltda., São Paulo – SP, Brazil).

Extraction and isolation

Air-dried and powdered leaves (100g) were extracted at room temperature with EtOH. After concentration under vacuum, the residue (17g) was subjected to column chromatography over silica gel (70-230 mesh, 150g) eluted with a hexane-EtOAc gradient system (9.5:0.5, 9:1, 8:1.5, 1:1, 3:7, 0:1, 750 mL each) to give fractions I–IX. Separation of fraction IV (hexane-EtOAc, 8.5:1.5, 800mg) by repeated column chromatography over silica gel (230–400 mesh, 50g) eluted with a hexane-EtOAc gradient (1:0, 700mL; 9.8:0.2, 500mL; 9.5:0.5, 400 mL) yielded **polyprenol-12** (hexane-EtOAc, 9.5:0.5, 49.0 mg). Separation of fraction VII (hexane-EtOAc, 1:1, 946.0 mg) by gel filtration (Sephadex LH-20, 30g, CHCl₃-MeOH, 3:2, 240 mL) resulted in twenty fractions (Frs.1–20). **Compound (+)-sesamin** (28.0 mg) was obtained from Frs. 17 and 18 whereas Frs. 14 – 16 were re-chromatographed over a silica gel column (230 – 400 mesh, 50g) eluted with a hexane – EtOAc gradient system (9.5:0.5, 360 mL; 9:1, 420 mL; 8:2, 300mL) to yield **isoobtusilactone A** (hexane- EtOAc, 9 :1, 15.0 mg) and **(+)-sesamin** (hexane-EtOAc, 8:2, 25.0 mg) Garcez et al. [2005].

Radical-scavenging activity (DPPH)

The free radical scavenging capacity of EE from the leaves of *A. trinervis* was tested against the stable DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl-hydrate) free-radical according to the modified method reported by Mensor et al. [2001]. The ability to scavenge DPPH radical was measured in these experiments by the discoloration of the solution. BHT commonly used as antioxidant, was used as standard. A 100 µL aliquot of ethanol solution containing different amounts of EE was added to 100 µL of daily prepared ethanolic DPPH solution (0.02mM). The concentrations of extract employed were (3.125; 6.25; 12.50; 25.0; 50.0; 100.0 and 200.0 µg/mL). The absorbance was measured at 517 nm with a UV - visible spectrophotometer. All measurements were done in triplicate.

The Somatic Mutation and Recombination Test (SMART)

The markers multiple wing hairs (*mwh*, 3-0.3) and flare-3 (*flr*³, 3-38.8) are at the tip and roughly in the middle of the left arm of chromosome 3, respectively. Two crosses were carried out to produce the experimental larval progeny: 1] Standard (ST) cross, *flr*³/ *ln*(3LR)TM3, *ri p^p sep l*(3)89Aa *bx*^{34e} *e Bd*^S females crossed with *mwh* males; 2] High bioactivation (HB) cross, *ORR/ORR*; *flr*³/*ln*(3LR)TM3, *ri p^p sep l*(3)89Aa *bx*^{34e} *e Bd*^S females crossed with *mwh* males [Graf et al., 1984, 1989; Graf and van Schaik, 1992].

From the two crosses eggs were collected for 8 h in culture bottles with an agar-agar base (4% w/v) topped with a thick layer of live baker's yeast supplemented with sucrose. The larvae were washed out of the bottles 72 ± 4 h later with tap water and collected in a stainless steel strainer. For chronic feeding, a series of vials were prepared with 1.5 g mashed potato flakes (Yoki® Alimentos S.A., Brazil) and 5 mL of a solution containing a final concentration of 0.625; 1.25 and 2.5 mg.mL⁻¹ of EE from leaves of *A. trinervis* alone or in association with DXR (0.125mg.mL⁻¹). Negative (1% Tween-80 and 3% ethanol in distilled water) and positive (DXR 0.125 mg.mL⁻¹) controls were included in both experiments. Each treatment was conducted in duplicate. Each cross produced two types of progeny, i.e. marker-heterozygous (MH) (*mwh*+/*flr*³) and balancer-heterozygous (BH)

(*mwh*+/*TM3*,*Bd*^S) flies. The dominant *Bd*^S marker allows the wings of these two genotypes to be distinguished. The hatched flies were stored in 70% (v/v) ethanol. The wings were removed and mounted on slides with Faure's solution and analyzed under a compound microscope at 400x magnification [Graf et al., 1984]. Frequency and size of single and twin spots were recorded.

Statistical analysis

DPPH

The scavenging activity was measured as the decrease of samples absorbance versus the DPPH standard [Yagi et al., 2002]. Results were expressed as percentage inhibition (%). The mean inhibiting concentration (IC₅₀)% was defined by the formula:

$$(\%) = \frac{[\text{OD control} - \text{OD sample}]}{[\text{OD control}]} \times 100$$

Where OD_{control} was the initial absorbance and OD_{sample} was the value for added sample concentration [Lee et al. 2003].

SMART

For evaluation of the effects induced, the frequencies of spots per wing were analyzed with a computer program based on the two alternative hypotheses method proposed by Frei and Würgler [1988, 1995]. This method tests two alternative hypotheses: (i) the mutation frequency in the treated group is no higher than the mutation frequency in the control group; (ii) the frequency in the treated group is no less than *m* times as high as the observed spontaneous mutation frequency in the control. For the statistical calculations, the Kastenbaum-Bowman test [Kastenbaum and Bowman, 1970] was used, with significance levels $\alpha = \beta = 0.05$. Based on the control-corrected frequencies of clone formation per 10⁵ cells, the percentages of interference by EE were calculated as follows: (genotoxin alone – genotoxin plus EE/ genotoxin alone) x 100 [Abraham, 1994].

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study the EE from the leaves and fruits of *A. trinervis* and the γ -lactone fraction were chosen to be investigated based on institutional studies conducted in the area of phytochemistry.

The antioxidant activities of the EE from the leaves of *A. trinervis* were tested by DPPH free radical scavenging method. The synthetic nitrogen-centered DPPH radical is not biologically relevant, but the DPPH assay is often used to evaluate the ability of the antioxidant to scavenge free radicals, which are known to be a major factor in biological damage caused by oxidative stress. This assay is known to give reliable information concerning the antioxidant ability of the tested compounds [Huang et al., 2005].

The antioxidant capacity of the plant extract was confirmed by its capacity to reduce the radical compound 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), into 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine. This showed the efficiency of scavenging DPPH radicals with a IC₅₀ value of 218.82 $\pm$ 0.24 μ g/mL as compared to the reference compound BHT (value 63.15 $\pm$ 0.34 μ g/mL). **Table 1** shows the dose-response for DPPH radical scavenging for a range of concentration for each test extract (12.5-200 μ g/mL) compared to BHT at the same dose range.

The data obtained from the DPPH antioxidant assay revealed that EE from the leaves of *A. trinervis* has the capacity to scavenge free radicals. It is likely that the antioxidant activity found in the extract is due to lignan action (sesamin), in agreement with findings by Parker et al. [2000] that this substance has potent antioxidant properties.

It has been demonstrated that this sesamin preparation exhibits various physiological activities including that of antioxidant [Yamashita et al., 2000]. Lignans have been shown to scavenge reactive oxygen species *in vitro* [Lu and Liu, 1991]. Lignan antioxidant activity may therefore both inactivate lipid and reactive oxygen species and have an indirect effect on *in vivo* endogenous antioxidant systems i.e. glutathione (GSH) and GSH metabolizing enzymes [Lu and Liu, 1991].

This has driven the search by researchers for antioxidants. The development of antioxidants that scavenge ROS would support biological resistance to free

radicals, retard the process of ageing and decrease the risk of age associated degenerative diseases, such as cancer, cardiovascular diseases, immune system decline and brain dysfunction [Finkel and Holbrook, 2000].

In recent years there has been increasing interest in antimutagenesis [Calomme et al., 1996] and antioxidant activity [Yagi et al., 2002]. Such compounds may be useful in preventing cancer and other mutation-related diseases, by fortifying physiological defense mechanisms, or by promoting the intake of protective factors [De Flora, 1998].

To evaluate the genotoxicity of the EE from the leaves or fruits of *A. trinervis*, each treatment was done in duplicate. The doses used were determined through a pilot experiment. The data obtained in the MH progeny were pooled after verifying that the two independent experiments were in agreement and are summarized in **Tables 2, 3 and 4**, where the frequencies of spots observed were classified as small single, large single, twin and total spots.

The data obtained from the treatment with EE from the leaves or fruits of *A. trinervis* were compared to the negative control. EE from the leaves at concentrations of 0.625, 1.25 and 2.50 mg.mL⁻¹ and EE from the fruits at concentrations of 1.25, 2.50 and 10.0 mg.mL⁻¹ did not produce statistically significant increases in the spontaneous mutation rate observed in the negative control and the results observed were inconclusive or negative for all spot categories. Similar effects were found in MH progeny of both the ST and HB crosses.

Although in the present study no genotoxic activity of this plant's leaf extract was detected at the evaluated concentrations, which was assessed by means of SMART, cytotoxic effects at 2.0×10^4 µg/mL were found for organic extracts from different parts of *Aiouea trinervis* in CHO cells (data not shown). According to Tsai et al. [2000] and Tsai et al. [2002], this is provided from the γ -lactones fraction (isoobtusilactone A).

Previous studies have shown that isoobtusilactone A exhibited cytotoxic and genotoxic effects on a variety of cell types, including human laryngeal carcinoma Hep-2, Chinese hamster ovarian cell CHO-K1, rat hepatoma cell HTC [Garcez et al., 2005], and mouse lymphoid leukemia P-388 [Tsai et al., 2002]. Tsan-Zon et al. [2008] suggested that isoobtusilactone A induced apoptotic cell death was

mediated via both caspase dependent and independent pathways. Numerous plants and plant constituents have already demonstrated cytotoxic activity [Ali-Shtayeh et al., 2000; Balan et al., 2007].

The absence of genotoxicity observed in our studies indicates that the lowest effective concentration of possible active genotoxic compound (isoobtusilactone A) in the EE was not reached. Another possible hypothesis for explaining the negative results in the SMART assay is the existence of different effect levels for different genetic endpoints measured in SMART.

However, the genotoxic evaluation of a fraction containing γ -lactone (isoobtusilactone A), obtained from the immature fruits of *Aiouea trinervis* (**Table 5**) showed that the concentration of 2.8 mg.mL⁻¹ was lethal for *D. melanogaster* larvae, while the concentrations of 0.7 and 1.4 mg.mL⁻¹ did not show signals of toxicity neither genotoxicity.

Previous studies have shown that γ -lactona [isoobtusilactone A) was cytotoxic in Hep(2 human cancer cells in vitro and induced DNA damage on CHO K1 and HTC mammalian cells assayed with the comet assay [Garcez et al., 2005].

Prior studies have shown that DXR produces free radicals, in addition to interfering with the activity of topoisomerase II, resulting in damage to DNA [Horenstein et al., 2000]. Considering that in the present study the data obtained from the DPPH antioxidant assay revealed that EE from the leaves of *A. trinervis* has the capacity to scavenger free radicals, but did not show genotoxicity at the doses used in the SMART assay, these data prompt us to evaluate the capacity of EE from leaves of *A. trinervis* to scavenger the free radicals generated by DXR using the SMART co-treatment protocol. The results observed are summarized in **Tables 2** and **3**. DXR treatment induced positive results for all categories of spots when compared to the negative control ($p \leq 0.05$). The statistically significant increases in twin spots indicate the recombinagenic activity of DXR. **Tables 2** and **3** also show the high frequency of recombination induced by DXR, 88.64% and 91.69% respectively, for ST cross and HB cross. DXR promotes recombination events by inhibiting the activity of topoisomerase II.

Prior studies have demonstrated that the wing spot test in *Drosophila* is most suited to the detection of recombinogenic activity of genotoxic chemicals [Spanó et

al., 2001]. The data obtained in the present study with DXR are in agreement with those found by Fragiorgio et al. [2007].

DXR is widely used as a positive control in genotoxicity experiments. This drug presents a broad spectrum of action including oxidative stress and the production of free radicals [Singal et al., 2000], which promote oxidative injury in DNA [Feinstein et al., 1993].

Compared to the data observed with DXR alone, the results obtained for the *mwh/flr*³ progeny co-treated with EE and DXR showed a statistically significant lower frequency of all types of spots, except for small single spots at the concentration of 0.625 mg.mL⁻¹. The percentage of inhibition obtained varied from 22.30% to 65.48% in the cross ST and from 16.00% to 69.40% in the HB cross.

However, when the BH progeny were analyzed, inhibition was found to vary from 59.39% to 79.28 % in the ST cross and from 32.08% to 69.15% in the HB cross. In this way EE presents antigenotoxic activity, since it reduced the genotoxic activity of DXR in both MH and BH progeny.

The results showed a dose-effect relationship, in both crosses, presenting a significant reduction in the level of mutation, though not for recombination induced by DXR.

The antigenotoxic effect detected with the SMART can be attributed to the antioxidant activity of EE, which contains sesamin, a potent antioxidant. Recent studies have shown that lignans produce a preventive effect against hormone-dependent cancers such as breast, prostate, and colon cancers [Adlercreutz, 2002]. Several mechanisms have been suggested to explain the anticarcinogenic effect of lignans *in vivo* including antiestrogenic, anticarcinogenic [Adlercreutz, 1997] and antioxidant activities [Kamal-Eldin 1995].

The data obtained from the DPPH assay corroborate the results found in the SMART test, where EE reduced mutations, probably through oxidative stress and/or the production of free radicals from the action by DXR [Singal et al., 2000]. It has been suggested that active oxygen scavengers reduce mutation induced by various mutagens [Kim et al., 1991].

Similar results were found by Antunes and Takahashi [1999] who treated lymphocytes cultures with vitamin C (VC) and E (VE), a potent antioxidant, before, simultaneously or after DXR treatment. Presumably, in this study the antioxidant

activity of VC and VE is a major factor in their ability to counteract the clastogenic effect of DXR. Other mechanisms that could explain these data would be the protective effect of vitamins as a result of their antioxidant activity.

Another hypothesis that could explain the antigenotoxic activity of EE is the nature of the injury produced in the DNA and consequent activation of enzymes involved in the repair and expression process of p53. Antioxidants can interfere with xenobiotic metabolizing enzymes, block activated mutagens/carcinogens, modulate DNA repair and even regulate gene expression [Heo et al., 2001; Kris-Etherton et al., 2002; Nikolic' et al., 2004].

While phytochemicals present in these extracts of EE have a different structure and thus activity, a possible additive and synergistic effect caused by different phytochemicals may also play a role.

Plants produce a great diversity of substances that could be of therapeutic significance in many areas of medicine. These therapeutic benefits of medicinal plants are often attributed to their antioxidant properties [Dakwar et al., 2006]. A variety of intracellular and extracellular antioxidants are known to play an important role in controlling oxidative stress [Jayaprakasha et al., 2006].

Another factor to be considered is the mechanism by which the anticarcinogens/antimutagens operate, such as the direct inactivation of carcinogens/mutagens [Kohlmeier et al., 1995].

All these mechanisms may be important for their antimutagenic and anticarcinogenic properties [De Flora and Ferguson, 2005]. Other studies have also established that antioxidant activity alone does not account for the antigenotoxicity of plant extracts [Lee and Jang, 2004; Lambert and Chang, 2003; Galati and O'Brien, 2004].

The absence of genotoxicity of EE and the promising antigenotoxic and antioxidant activities of EE from the leaves of *A. trinervis* suggested that secondary metabolites such as the neolignins and sesamin are phytopharmaceutical molecules of interest. Antimutagenic properties elicited by plant species have a full range of prospective applications in human healthcare [Hayder et al., 2008].

Further studies applying different test systems, experimental protocols and other end-points are required to better characterize and understand the properties

of γ - isoobtusilactone A and lignin (sesamin) and contribute to new discoveries with therapeutic ends.

In conclusion, under the described experimental conditions, EE from the leaves of *A. trinervis* has antioxidative and protective effect against the genotoxicity induced by DXR. Further studies designed to isolate, identify, and characterize their active antioxidant constituents should provide a greater understanding of the mechanisms underlying the antioxidant effects of this EE.

Acknowledgements

The authors thank the Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS) and the Brazilian agencies CAPES, CNPq and FAPEMIG.

REFERENCES

- Adlercreutz H. 2002. Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet* 3:364-372.
- Adlercreutz H. 1997. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 29:95-120.
- Abraham SK. 1994. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination tests (SMART). *Mutagenesis* 9:383-386.
- Ali-Shtayeh MS, Yaniv Z, Mahajna J. 2000. Ethnobotanical survey in the Palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. *J Ethnopharmacology* 73: 221-232.
- Antunes LMG, Bueno RBL, Dias FL, Bianchi MLP. 2007. Acetylsalicylic acid exhibits anticlastogenic effects on cultured human lymphocytes exposed to doxorubicin. *Mutat Res* 626:155-161.
- Antunes LMG, Takahashi CS. 1999. Protection and induction of chromosomal damage by vitamin C in human lymphocytes cultures. *Terat Carcinog Mutag* 19:53–59.
- Antunes LMG, Takahashi CS. 1998. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. *Mutat Res* 419:137-143.
- Balan KV, Prince J, Han Z, Dimas K, Cladaras M, Wyche JH, Sitaras NM, Pantazis P. 2007. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus*. *Phytomedicine* 14:263-272.
- Bouhlef I, Mansour HB, Limem I, Sghaier, MB, Mahmoud A, Chibani JB, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. 2007. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in different extracts from the leaves of *Acacia salicina* from the center of Tunisia. *Environ Toxicol Pharmacol* 23:56-63.

- Cai Y, Luo Q, Sun M, Cork H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74: 2157–2184.
- Calomme M, Pieters L, Vlietink A, Berghe DV. 1996. Inhibition of bacterial mutagenesis flavonoids. *Planta Med* 92:222–226.
- Chang SY, Cheng MJ, Kuo YH, Lee SJ, Chang HS, Chen IS. 2008. Secondary metabolites from the stem bark of *Litsea akoensis* and their cytotoxic activity. *Helv Chim Acta* 91: 1156-1165.
- Chen CY, Chen CH, Lo YC, Wu BN, Wang HM, Lo WL, Yen CM, Lin RJ. 2008. Anticancer Activity of Isoobtusilactone A from *Cinnamomum kotoense*: Involvement of Apoptosis, Cell-Cycle Dysregulation, Mitochondria Regulation, and Reactive Oxygen Species. *J Nat Prod* 71: 933–940.
- Costa W, Nepomuceno JC. 2006. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 47:18-24.
- Dakwar PLS, Portnaya I, Cogan U. 2006. Aqueous extracts of *Teucrium polium* possess remarkable antioxidant activity in vitro. Evidence based. *Complem Altern Med* 3:329–338.
- De Flora S. 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 402:151-158.
- De Flora S, Ferguson RL. 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat Res* 591:8–15.
- Feinstein E, Canaani E, Weiner LM. 1993. Dependence of nucleic acid degradation on in situ free-radical production by adriamycin. *Biochemistry* 32:13156-13161.
- Finkel T, Holbrook NJ. 2000. Oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239–247.

- Fragiorgis EJ, Spanó MA, Antunes LMG. 2007. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Biol* 2:449-455.
- Frei H and Würigler FE. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result, *Mutat Res* 203, p.297-308.
- Frei H and Würigler FE. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat Res* 334:247-258.
- Galati G, O'Brien PJ. 2004. Serial review: flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radical Biol Med* 27:287–303.
- Garcez FR, Garcez WS, Martins M, Matos MF, Guterres ZR, Mantovani MS, Misu CK, Nakashita ST. 2005. Cytotoxic and Genotoxic and Lignans from *Aiouea trinervis*. *Planta Med* 71:923-927.
- GöktürkBaydar N, Özkan G, Yasar S. 2007. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control* 18:1131–1136
- Gottlieb OR. 1972. Chemosystematics of Lauraceae. *Phytochemistry* 11:1537-1570.
- Graf U, Spanó MA, Guzmán-Rincón J, Abraham SK, Andrade HHR. 1996. The wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *Afr Newsl Occup Health Saf* 6:9-13.
- Graf U, van Schaik N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Mutat Res* 271:59-67.

- Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ Mutagen 6: 153-188.
- Hayder N, Bouhlef I, Skandrani I, Kadri M, Steiman R, Guiraud P, Mariotte AM, Ghedira K, Dijoux-Franca MG, Chekir-Ghedira L. 2008. In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis*: Modulation of expression of gene involved in cell defence system using cDNA microarray. Toxicol in Vitro 22:567–581
- Henriques AM, Kerber VA, Moreno PRH. 2000. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: CM Simões et al. (eds) Farmacognosia da planta ao medicamento. 2º ed. Porto Alegre, Editora da Universidade do Rio Grande do Sul p. 641-656.
- Heo MY, Sohn SJ, Au WW. 2001. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. Mutat Res 448:135–150.
- Horenstein MS, Heide VRS, L'Ecuyer, TJ. 2000. Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. Mol Genet Metab 71:436-444.
- Huang D, Ou B, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J Agric Food Chem 53:1841–1856.
- Jayaprakasha GK, Negi PS, Jena BS. 2006. Antioxidative and antimutagenic activities of the extracts from the rinds of *Garcinia pedunculata*. Inn Food Sci Emerg Technol 7:246–250.
- Kamal-Eldin A, Pettersson D, Appelqvist LA. 1995. Sesamin (a compound from sesame oil) increases tocopherol levels in rats. Lipids 30:499-505.
- Kastenbaum MA, Bowman KO. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutat Res 9:527-549.
- Kehrer JP. 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Crit Rev Toxicol 23:21–48.

- Kim SB, Kim IS, Yeum DM, Park YH. 1991. Mutagenicity of Maillard reaction products from d-glucose-amino acid mixtures and possible roles of active oxygens in mutagenicity. *Mutat Res* 254:65–69.
- Kohlmeier L, Simonsen M, Mottus K. 1995. Dietary modifiers of carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 102: 177-184.
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 113: 71S–88S.
- Kuo PL, Chen CY, Hsu YL . 2007. Isoobtusilactone a induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/apoptosis signal-regulating kinase 1 signaling pathway in human breast cancer cells. *Cancer Res* 67: 7406-7420.
- Labaj J, Slamenova D, Kosikova B. 2003. Reduction of Genotoxic Effects of the Carcinogen N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine by Dietary Lignin in Mammalian Cells Cultured In Vitro. *Nutr Cancer* 47:95-103.
- Lambert JD, Chang CS. 2003. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutat Res* 524:201–208.
- Lee SE, Shin, HT, Hwang, HJ. 2003. Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumador* seed. *Phytother Res* 17:1041-1047.
- Lee E, Jang, H. 2004. Antioxidant activity and protective effect on DNA strand scission of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*). *Biofactors* 21:285–292.
- Liu TZ, Cheng JT, Yiin SJ, Chen CY, Chen CH, Wu MJ, Chern CL. 2008. Isoobtusilactone A induces both caspase-dependent and -independent apoptosis in Hep G2 cells. *Food Chem Toxicol* 46: 321-327.
- Lu H, Liu GT. 1991. Effect of dibenzolu, c]cyclooctene lignans isolated from *Fructus schkandme* on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activity. *Chem Biol Interactions* 78:77-84.

- Mensor LL, Menezes F S, Leitão GG, Reis AS, Santos TC, Coube CS, Leitão SG. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res* 15: 127-130.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. 2004. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56:185-229.
- Monks NR, Bordinon SAL, Ferraz A, Machado KR, Faria DH, Lopes RM, Mondin CA, de Souza ICC, Lima MFS, da Rocha AB, Schwartzmann G. 2002. Anti-tumor screening of Brazilian plants. *Pharm Biol* 40:603–616.
- Nikolic´ B, Stanojevic´ J, Mitic´ D, Vukovic´-Gac´ic´ B, Knez´evic´ - Vukc´evic´ J, Simic´ D. 2004. Comparative study of the antimutagenic potential of vitamin E in different E. coli strains. *Mutat Res* 564:31–38.
- Parker RS, Sontag TJ, Swanson JE. 2000. Cytochrome P-450 dependent metabolism of tocopherols and inhibition by sesamin. *Biochem Biophys Res Comm* 277:531-534.
- Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Huertas JR, Ibanez S, Gomez JA, Battino M, Mataix J. 1999a. Olive oil supplemented with vitamin E affects mitochondrial coenzyme Q levels in liver of rats after an oxidative stress induced by adriamycin. *Biofactors* 9:331-336.
- Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J, Ramírez-Tortosa MC. 2002. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 180 (2002) 7982 - 7995.
- Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. 2000. Adriamycin-induced heart-failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem* 207:77-85.
- Spanó MA, Frei H, Würgler FE, Graf U. 2001. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* 16:385-394.

- Tsai IL, Chen JH, Duh CY. 2000. Cytotoxic neolignans from the stem wood of *Machilus obovatifolia*. *Plant Med.* 66:403-407.
- Tsai IL, Hung CH, Duh CY, Chen IS. 2002. Cytotoxic butanolides and secobutanolides from the stem wood of Formosan *Lindera communis*. *Planta Med* 68:142–145.
- Tsan-Zon L, Jiin-Tsuey C, Shuenn-Jiun Y, Chung-Yi C, Ching-Hsein C, Wu MJ, Chern CL. 2008. Isoobtusilactone A induces both caspase-dependent and-independent apoptosis in Hep G2 cells. *Food Chem Toxic* 46:321–327.
- Valadares BLB, Graf U, Spanó MA. 2008. Inhibitory effects of water extract of própolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol* 46:1103-1110.
- Wang TA, Cheng MJ, Lee SJ, Yang CW, Chang HS, Chen IS. 2008. Secondary metabolites from the leaves of *Litsea lili* var. *nunkao-tahangensis*. *Helv Chim Acta* 91:1036-1044.
- Willför SM, Ahotupa MO, Hemming, JE, Reunanen MHT, Eklund PC, Sjöholm, RE, Eckerman CSE, Pohjamo SP, Holmbom BR. 2003. Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. *J Agric Food Chem* 51:7600-7608.
- Yagi A, Kabash A, Okamura NO, Haraguchi H, Moustafa SM, Khalifa TI. 2002. Antioxydant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of alosein derivatives in *Aloe vera*. *Planta Med* 68:957–960.
- Yamashita K, Kagaya M, Higuti N, Kiso Y. 2000. Sesamin and alphatocopherol synergistically suppress lipid-peroxide in rats fed a higt docosaheaxaenoic aid diet. *Biofactors* 11:11-13.

Table 1. Anti-oxidant activities of the ethanolic extracts (EE) from the leaves of *A. trinervis* on DPPH free radical

Compounds and Concentration (µg/mL)	Inhibition (%) ^a	IC ₅₀ (µg/mL)
Butylated hydroxyl toluene (BHT) ^b		
12.5	8.55	63.15 ± 0.34
25	20.40	
50	38.42*	
100	62.96*	
200	86.31*	
EE from the leaves of <i>A. trinervis</i>		
12.5	7.62	218.82 ± 0.24
25	11.61	
50	20.35	
100	32.40*	
200	59.19*	

^a Inhibition of absorbance at 517 nm relative to that of standard DPPH solution.

^b Positive control of anti-oxidant effect.

* P < 0,05 (Dunett test)

TABLE 2. Summary of results obtained with the *Drosophila* wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) and balancer-heterozygous (BH) progeny of the standard (ST) cross after chronic treatment of larvae with ethanolic extracts (EE) from the leaves of *A. trinervis* and doxorubicin (DXR)

Genotypes and treatments		Nº of flies	Spots per fly (number of spots) statistical diagnosis ^a				Spots with mwh clone ^c	Frequency of clone formation/10 ⁵ cells per cell division ^d		Recombination (%)	Inhibition ^e (%)
DXR (mg/mL)	EE (mg/mL)		Small single spots (1-2 cells) ^b	Large single spots (>2 cells) ^b	Twin spots	Total spots		Observed	Control corrected		
<i>mwh/flr³</i>											
0	0	60	0.17 (10)	0.05 (03)	0.02 (01)	0.23 (14)	14	0.47			
0	0.625	60	0.22 (13)i	0.02 (01)i	0.02 (01)i	0.25 (15)i	15	0.51	0.04		
0	1.250	60	0.23 (14)i	0.02 (01)i	0.02 (01)i	0.27 (16)i	16	0.54	0.07		
0	2.500	60	0.27 (16)i	0.02 (01)i	0.02 (01)i	0.30 (18)-	18	0.61	0.14		
<i>mwh/TM3</i>											
0.125	0	60	3.70 (222)+	5.35 (312)+	7.23 (434)+	16.28 (977)+	947	32.34	31.87	88.64	
0.125	0.625	60	5.33 (320)*	3.23 (194)*	3.93 (236)*	12.50 (750)*	739	25.23	24.76	94.06	22.30
0.125	1.250	60	3.27 (196)	2.08 (125)*	2.45 (147)*	7.80 (468)*	461	15.74	15.27	93.05	52.08
0.125	2.500	60	3.33 (200)	1.23 (74)*	1.10 (66)*	5.67 (340)*	336	11.47	11.00	93.18	65.48
<i>mwh/flr³</i>											
0.125	0	60	1.35 (81)+	0.55 (33)+	†	1.90 (114)+	114	3.89	3.62		
0.125	0.625	60	0.70 (42)*	0.15 (09)*	†	0.85 (51)*	51	1.74	1.47		59.39
0.125	1.250	60	0.60 (36)*	0.05 (03)*	†	0.65 (39)*	39	1.33	1.06		70.72
0.125	2.500	60	0.48 (29)*	0.02 (01)*	†	0.50 (30)*	30	1.02	0.75		79.28

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würzler [1988; 1995]. *U*-test, two-sided; probability levels: -, negative; +, positive; i, inconclusive; P≤0.05 vs. untreated control; *, P ≤ 0.05 vs. DXR only.

^bIncluding rare *flr³* single spots.

^cConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^dFrequency of clone formation: clones/flies/48,800 cells (without size correction).

^eCalculated as [DXR alone – DXR + EE] / DXR alone} X 100, according to Abraham [1994].

^fBalancer chromosome *TM3* does not carry the *flr³* mutation and recombination is suppressed, due to the multiply inverted region in these chromosome.

TABLE 3. Summary of results obtained with the *Drosophila* wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) and balancer-heterozygous (BH) progeny of the high bioactivation (HB) cross after chronic treatment of larvae with ethanolic extracts (EE) from the leaves of *A. trinervis* and doxorubicin (DXR)

Genotypes and treatments		N° of flies	Spots per fly (number of spots) statistical diagnosis ^a				Spots with mwh clone ^c	Frequency of clone formation/10 ⁵ cells per cell division ^d		Recombination (%)	Inhibition ^e (%)
DXR (mg/mL)	EE (mg/mL)		Small single spots (1-2 cells) ^b	Large single spots (>2 cells) ^b	Twin spots	Total spots		Observed	Control corrected		
<i>mwh/flr³</i>											
0	0	60	0.28 (17)	0.02 (01)	0.02 (01)	0.32 (19)	19	0.64			
0	0.625	60	0.28 (17)-	0.03 (02)i	0.02(01)i	0.33 (20)-	20	0.68	-0.04		
0	1.250	60	0.35 (21)i	0.05 (03)i	0.00 (00)i	0.40 (24)i	24	0.81	0.17		
0	2.500	60	0.25 (15)-	0.07 (04)i	0.02 (01)i	0.33 (20)-	20	0.68	-0.04		
0.125	0	60	2.20 (132)+	7.18 (431)+	10.27 (616)+	19.65 (1179)+	1150	39.27	38.63	91.69	
0.125	0.625	60	3.35 (201)*	4.73 (284)*	8.20 (492)*	16.28 (977)*	969	33.09	32.45	93.28	16.00
0.125	1.250	60	3.15 (189)*	2.32 (139)*	4.73 (284)*	10.20 (612)*	608	20.76	20.12	90.50	47.91
0.125	2.500	60	3.48 (209)*	1.07 (64)*	1.58 (95)*	6.13 (368)*	365	12.46	11.82	91.62	69.40
<i>mwh/TM3</i>											
0	0	60	0.08 (05)	0.00 (0)	†	0.08 (05)	05	0.17			
0.125	0	60	1.27 (76)+	0.38 (23)+	†	1.65 (99)+	99	3.38	3.21		
0.125	0.625	60	1.00 (60)*	0.15 (09)*	†	1.15 (69)*	69	2.35	2.18		32.08
0.125	1.250	60	0.57 (34)*	0.45 (27)*	†	1.02 (61)*	61	2.08	1.91		40.49
0.125	2.500	60	0.57 (34)*	0.00 (00)*	†	0.57 (34)*	34	1.16	0.99		69.15

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würzler [1988; 1995]. *U*-test, two-sided; probability levels: -, negative; +, positive; i, inconclusive; $P \leq 0.05$ vs. untreated control; *, $P \leq 0.05$ vs. DXR only.

^bIncluding rare *flr³* single spots.

^cConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^dFrequency of clone formation: clones/flies/48,800 cells (without size correction).

^eCalculated as [DXR alone – DXR + EE] / DXR alone} X 100, according to Abraham [1994].

^fBalancer chromosome *TM3* does not carry the *flr³* mutation and recombination is suppressed, due to the multiply inverted region in these chromosome.

TABLE 4. Summary of results obtained with the *Drosophila* wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) progeny of the standard (ST) cross after chronic treatment of larvae with ethanolic extracts from the fruits (EEF) of *A. trinervis*

Treatments (mg.mL ⁻¹)	Nº of flies	Spots per fly (number of spots) statistical diagnosis ^a			Total spots m=2	Spots with <i>mwh</i> clone ^c
		Small single spots (1-2 cells) ^b m=2	Large single spots (>2 cells) ^b m=5	Twin spots m=5		
EEF						
0	40	0.50 (20)	0.02 (01)	0.02 (01)	0.55 (22)	0.55 (22)
1.25	40	0.30 (12)-	0.00 (00)i	0.00 (00)i	0.30 (12)-	0.30 (12)
2.50	40	0.37 (15)-	0.05 (02)i	0.02 (01)i	0.45 (18)-	0.45 (18)
10.0	40	0.47 (19)-	0.02 (01)i	0.05 (02)i	0.55 (22)-	0.55 (22)
DXR (0.125)	40	2.00 (80)+	2.63 (105)+	3.40 (136)+	8.03 (321)+	7.73 (309)

Only marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr*³) were evaluated.

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würgler [1988]. *U*-test, two-sided; probability levels: -, negative; +, positive; i, inconclusive; m = multiplication factor; P≤0.05 vs. untreated control.

^bIncluding rare *flr*³ single spots.

^cConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

TABLE 5. Summary of results obtained with the *Drosophila* wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) progeny of the standard (ST) cross after chronic treatment of larvae with γ -lactone

Treatments (mg.mL ⁻¹)	N° of flies	Spots per fly (number of spots) statistical diagnosis ^a				Spots with <i>mwh</i> clone ^c
		Small single spots (1-2 cells) ^b	Large single spots (>2 cells) ^b	Twin spots	Total spots	
γ -lactone						
0	40	0.50 (20)	0.02 (01)	0.02 (01)	0.55 (22)	0.55 (22)
0.7	40	0.50 (15)-	0.03 (01)i	0.00 (00)i	0.53 (16)-	0.40 (16)
1.4	40	0.76 (23)-	0.06 (02)i	0.00 (00)i	0.82 (25)-	0.63 (25)
2.8	00	-	-	-	-	-
DXR (0.125)	40	2.00 (80)+	2.63 (105)+	3.40 (136)+	8.03 (321)+	7.73 (309)

Only marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr*³) were evaluated.

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würgler [1988]. *U*-test, two-sided; probability levels: -, negative; +, positive; i, inconclusive; m = multiplication factor; $P \leq 0.05$ vs. untreated control.

^bIncluding rare *flr*³ single spots.

^cConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

APÊNDICE A

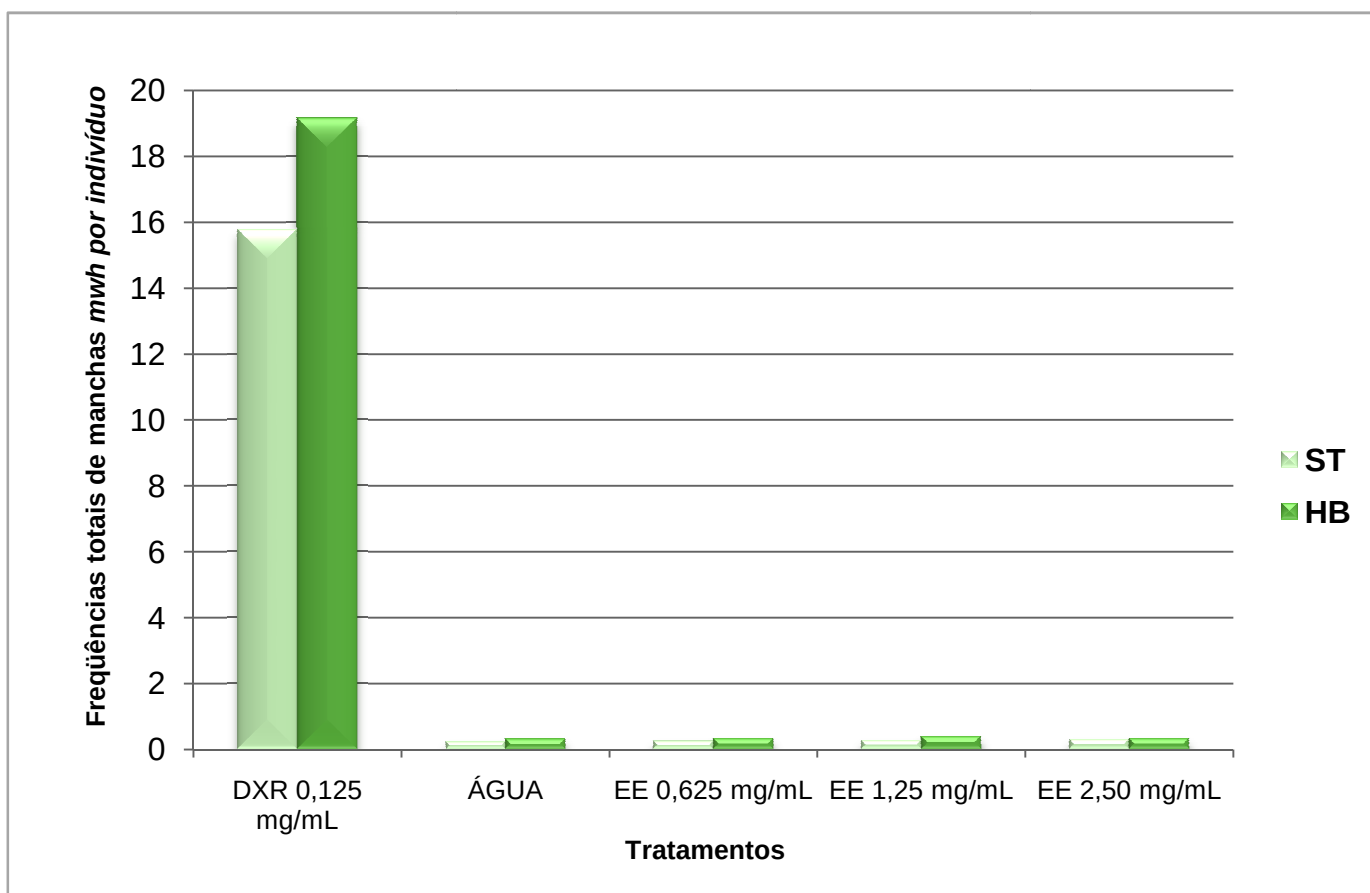


Gráfico 1: Frequências totais de manchas *mwh* por indivíduos após tratamento crônico com EE obtidos de folhas de *A. trinervis* nos cruzamentos ST e HB.

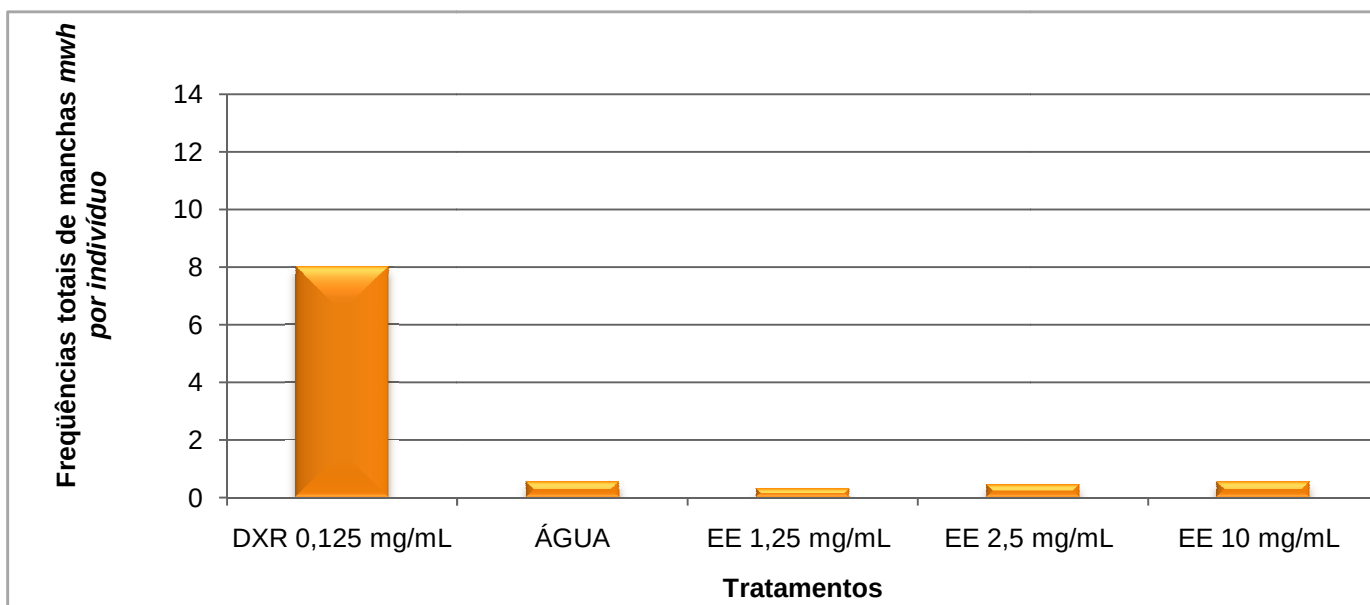


Gráfico 2: Frequências totais de manchas *mwh* por indivíduos após tratamento crônico com EE obtidos de frutos de *A. trinervis* no cruzamento ST.

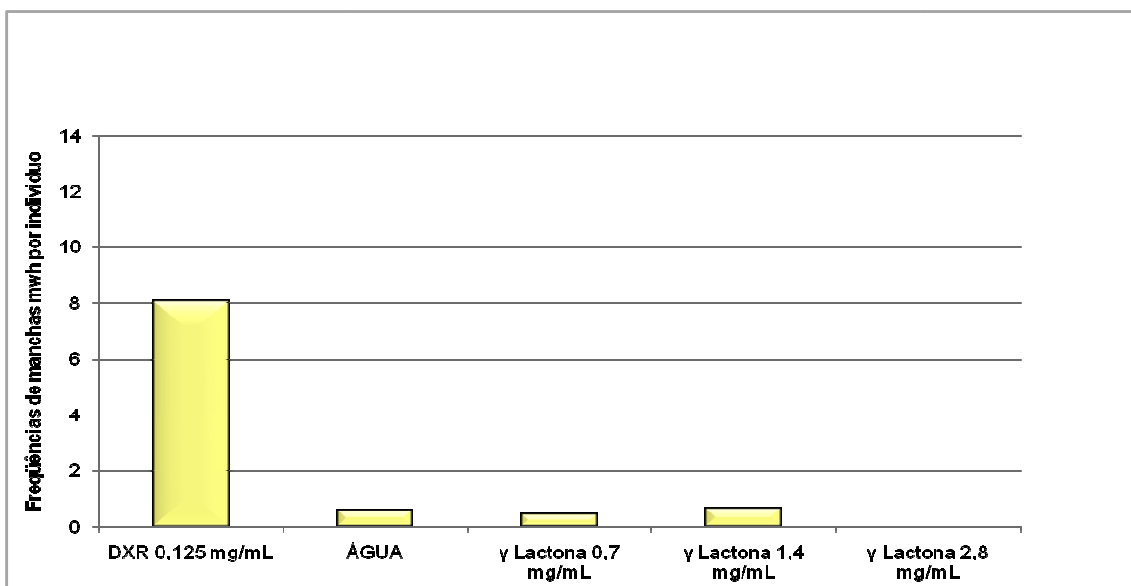


Gráfico 3: Frequências totais de manchas *mwh* por indivíduos após tratamento crônico com γ - lactona obtida de frutos de *A. trinervis* nos cruzamentos ST e HB.

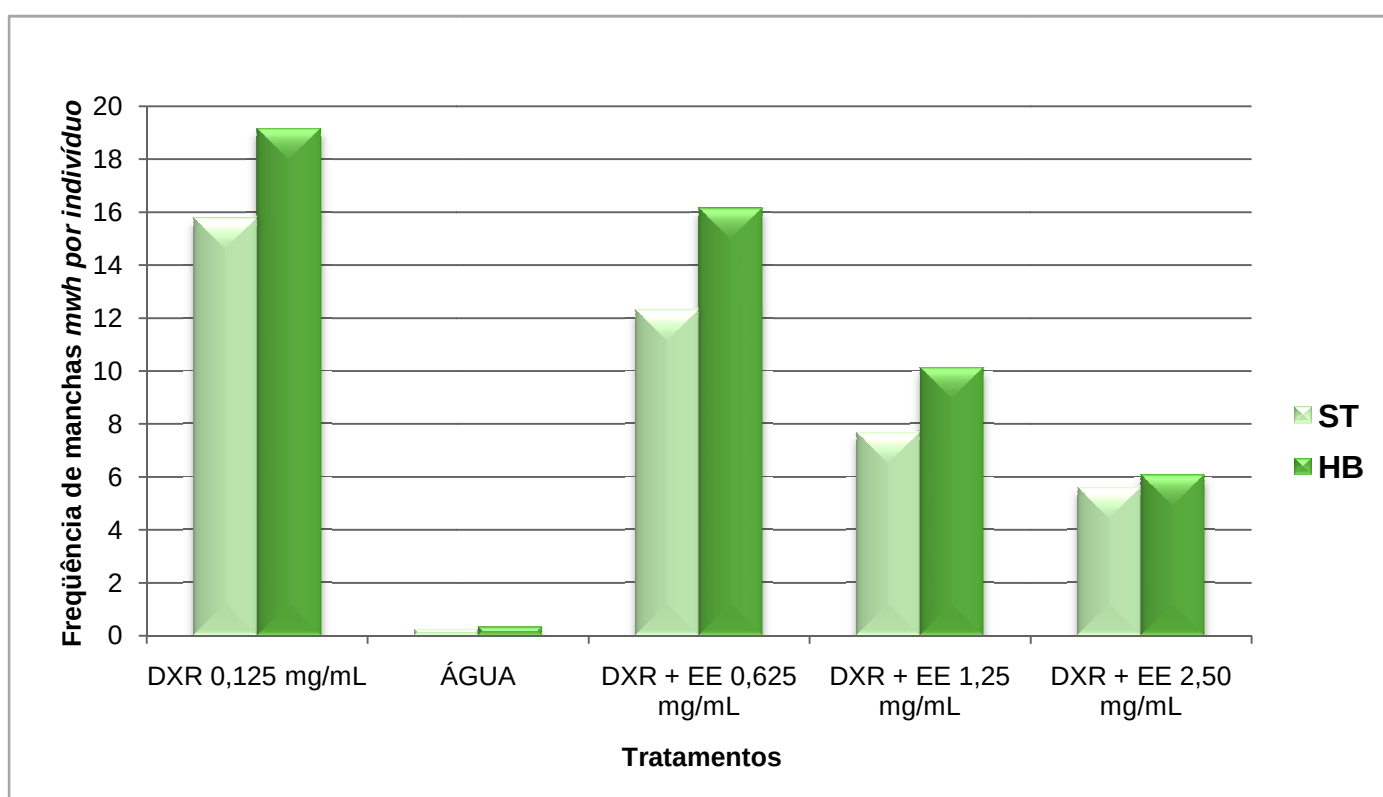


Gráfico 4: Frequências totais de manchas *mwh* por indivíduos após tratamento crônico com EE obtidos de folhas de *A. trinervis* associados com DXR nos cruzamentos ST e HB.

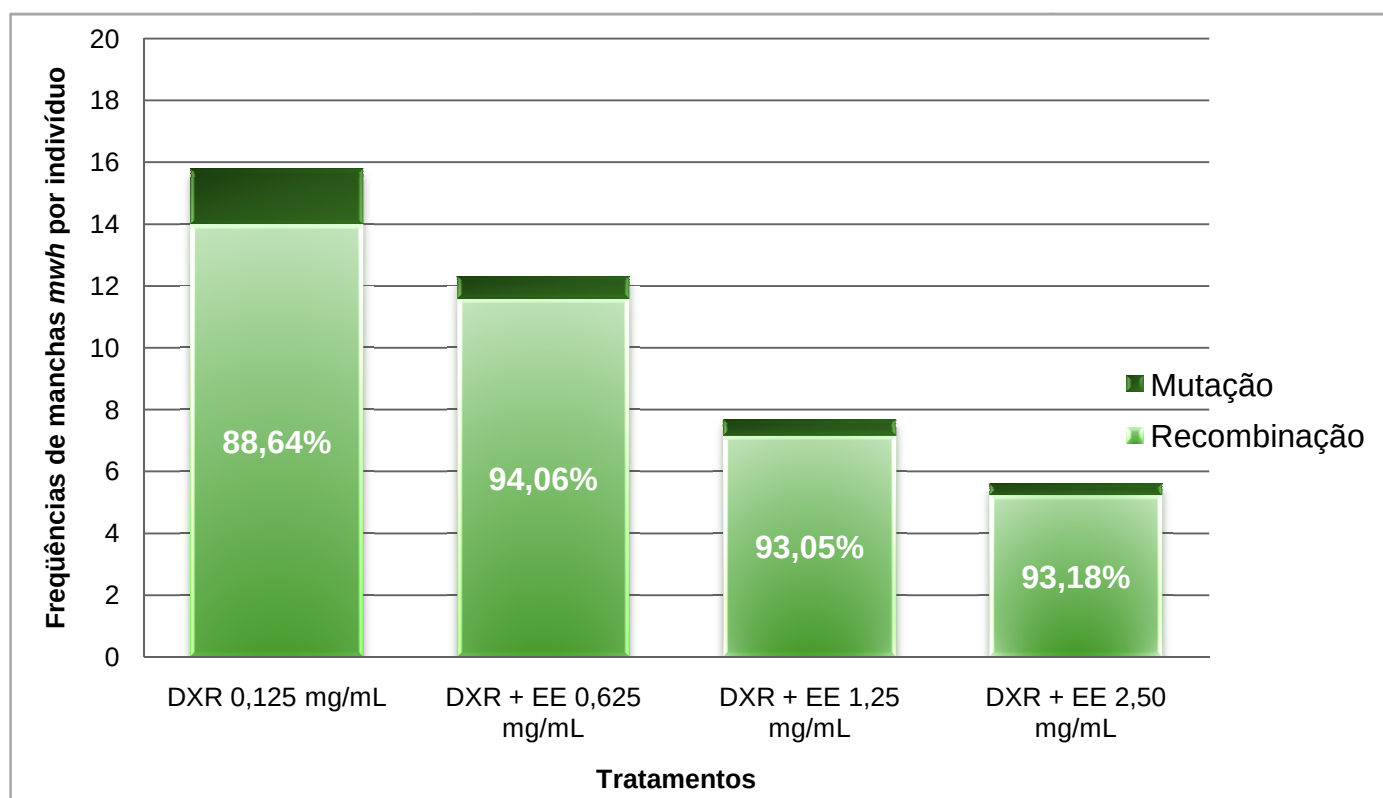


Gráfico 5: Contribuição das frequências de mutação e recombinação em relação à frequência total de manchas *mwh* por indivíduo, do cruzamento ST, após tratamento crônico com EE de folhas de *A. trinervis* associado à DXR.

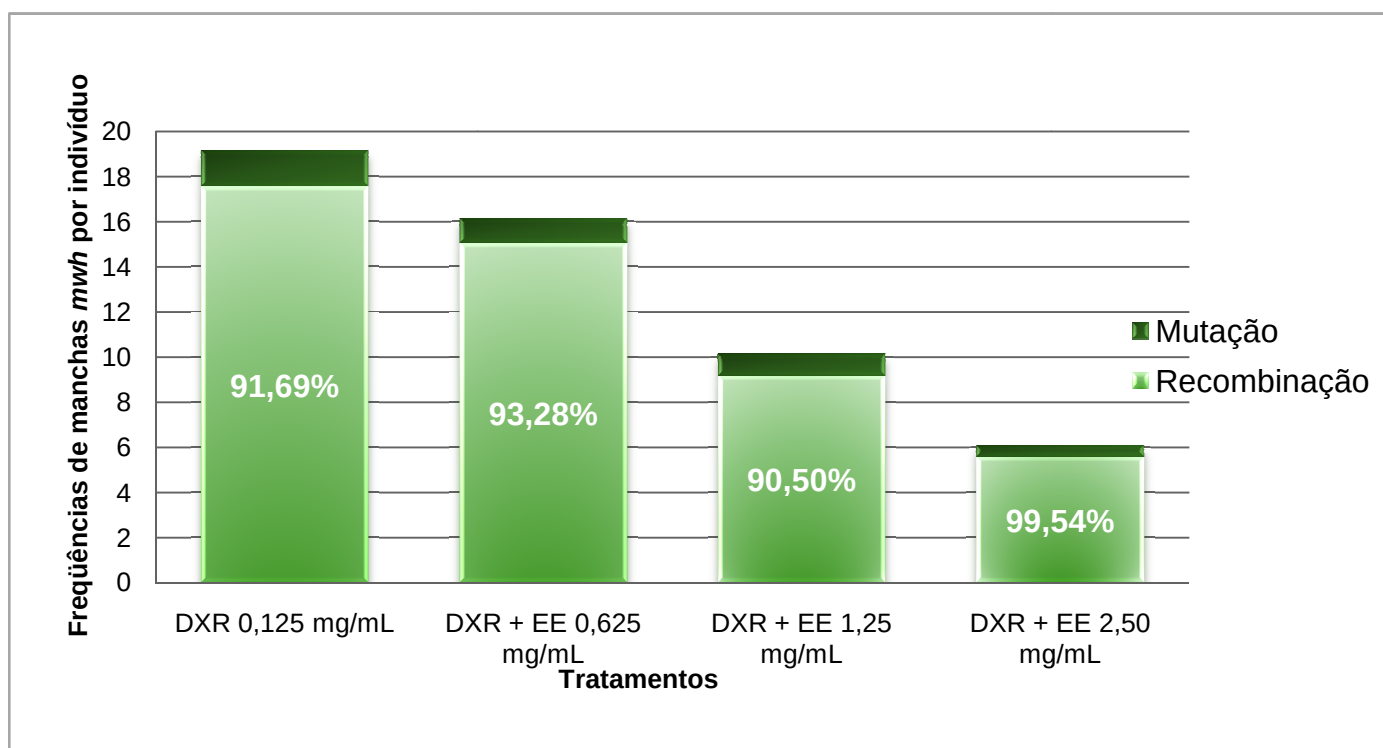


Gráfico 6: Contribuição das frequências de mutação e recombinação em relação à frequência total de manchas *mwh* por indivíduo, do cruzamento HB, após tratamento crônico com EE de folhas de *A. trinervis* associado à DXR.

Capítulo 3

Antioxidant and antimutagenic activities of ethanolic extracts of *Nectandra cissiflora* (Lauraceae)

Manuscript for Environmental and Molecular Mutagenesis

Antioxidant and antimutagenic activities of ethanolic extracts of *Nectandra cissiflora* (Lauraceae)

Zaira da Rosa Guterres^{1,2}, Alexandre Azenha Alves de Rezende², Lidilhone Harsman³, Fernanda Rodrigues Garcez³, Mário Antônio Spanó^{2*}

¹Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Mundo Novo (Estado do Mato Grosso do Sul - MS), Brazil

²Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Uberlândia (Estado de Minas Gerais - MG), Brazil

³Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Departamento de Química, Campo Grande (Estado do Mato Grosso - MS), Brazil

Running title: Antioxidant and Antimutagenic activities of *Nectandra cissiflora*

*Corresponding author address: Mário Antônio Spanó, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Mutagênese. Av. Pará, 1720, Campus Umuarama, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil.

Tel.: +55 34 32182505.

E-mail address: maspano@ufu.

ABSTRACT

In this study, the antioxidant activity of ethanolic extracts (EE) obtained from the leaves or stem of *Nectandra cissiflora* Ness were evaluated *in vitro* using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) test. The data observed with DPPH test demonstrates antiradical activity of plant extracts. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) using *Drosophila melanogaster* was used to evaluate the genotoxicity and antigenotoxicity of EE from the leaves or stem of *N. cissiflora*. Third stage larvae obtained from standard (ST) cross and high bioactivation (HB) cross were treated with: 1] a solution containing a final concentration of 0.625 mg mL⁻¹; 1.25 mg mL⁻¹ and 2.50 mg mL⁻¹ of EE from the leaves of *N. cissiflora* alone or combined with the genotoxic and antineoplastic agent doxorubicin (DXR) (0.125 mg.mL⁻¹); and 2] a solution containing a final concentration of 0.625 mg.mL⁻¹; 1.25 mg.mL⁻¹ and 2.50 mg.mL⁻¹ of EE from the stem of *N. cissiflora* alone or combined with DXR (0.125 mg.mL⁻¹). For either the ST cross or HB cross, no statistically significant differences in spot frequencies were observed in treatments with EE alone, indicating that under these experimental conditions the extracts showed no mutagenic effects on spontaneous DNA lesions. When EE were combined with DXR, the results indicated a dose-related antigenotoxic effect. However, EE from leaves of *N. cissiflora* showed a more pronounced effect than that obtained with EE from the stem. These results suggest that these different protective effects may be attributed to different secondary metabolites found in each type of extract, which probably operate through different mechanisms of action.

Key words: β -sitosterol; costic acid; *Drosophila melanogaster*; secondary metabolites; SMART; wing spot test

INTRODUCTION

Nectandra cissiflora Nees (Laurales Laurineae, Lauraceae Juss.), popularly known as “canela”, “canelo” or “massaranduba-branca”, is a plant found in the Brazilian “cerrado” (tropical American savanna) and in tropical and subtropical regions of the Americas. The “cerrado” is a semi-arid region of Brazil, in which plants are submitted to metabolic stress that triggers defense mechanism(s) when plants are confronted with unfavorable environmental conditions [Almeida et al., 2007].

The plants from the “cerrado” produce a wide range of secondary metabolites. Phytochemical studies have reported the presence of flavonoids, terpenos, sesquiterpenos and lignans in species of *Nectandra* [Barbosa-Filho et al., 1989; Ribeiro et al., 2002], with wide range of biological and pharmacological activities.

Plants of the genus *Nectandra* are used in folk medicine as antifungal, antidiarrheal, analgesic and antirheumatic agents. Scientific investigations have demonstrated the biological activity of certain species, e.g., the antitumor activity of *Nectandra rígida* [Le Quesne et al., 1980], antiplasmodial activity of *Nectandra salicifolia* [Bohlke, et al., 1996], and antimalarial activity of *Nectandra cuspidate* [Muñoz et al., 2000]. Natural products and herbal remedies used in traditional folk medicine have been the source of many medically beneficial drugs [Muñoz et al., 2000].

In phytochemical studies of *N. cissiflora* leaves were isolated catechins, sesquiterpenes, sesquiterpene lactone (SL) (costic acid) and β -sitosterol, as the primary component, while sesquiterpenes were isolated from *N. cissiflora* stems [Miranda, 2008].

Catechins has shown to provide protective effect against hormone related cancers; induces apoptosis and alters the expression of cell cycle regulatory proteins that are critical for cell survival and apoptosis; have anti-oxidant activities, inhibit bacterial growth in urinary tract infections and reduce atherosclerosis [Aruoma et al., 2006; Stuart et al., 2006]. The biosynthesis of catechins, their physiological role in plants, and their striking pharmacological and physiological effects on humans was reviewed by Yu and Jez [2008]. β -sitosterol is the most

abundant phytosteroid produced by plants, and is found primarily in vegetable oils: olive, peanut, soybean and sunflower [Ling and Jones, 1995]. Epidemiological evidence has shown that β -sitosterol is a particularly potent inhibitor of tumor growth in human colon cancer HT-29 cells and human prostate cancer LNCaP cells [Awad et al., 1996; von Holtz et al., 1998]. SLs are substances presenting diverse pharmacological activities, with anti-microbial, anti-viral, anti-inflammatory, and antitumor effects [Picman, 1986; Zang et al., 2005].

Doxorubicin (DXR) is one of the most effective and widely used anticancer drugs in the clinic. However, its therapeutic benefit is limited by acute and chronic cardiotoxicity, one of the life-threatening side effects of DXR-based therapy [Bien et al., 2007; Lyu et al., 2007]. DXR was used in the present study as positive control because it induce damage to the DNA molecule by interaction with the enzyme topoisomerase II [Zunino and Capranico, 1992; Horenstein et al., 2000; Minotti et al., 2004]; generation of free radicals and lipid peroxidation [Feinstein et al., 1993; Singal et al., 2000]; and induction of DNA homologous recombination [Lehmann et al., 2003; Fragiorgio et al., 2007; Valadares et al., 2008].

The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging method, introduced initially by Blois [1958] and developed by Brand-Williams et al. [1995], has shown to be an efficient method to determine spectrophotometrically the radical scavenging activity of plant extracts. The principle of the assay is based on the color change of the DPPH solution from purple to yellow as the radical is quenched by the antioxidant [Antolovich et al., 2002; Karagözler et al., 2008].

Drosophila melanogaster has shown to be a well-established insect model for toxicological studies [Nazir et al., 2003; Mukhopadhyay et al., 2003] and human diseases [Auluck et al., 2002; Kazantsev et al., 2002]. The European Centre for the Validation of Alternative Methods has recommended the use of *D. melanogaster* for research [Festing et al., 1998; Benford et al., 2000]. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *D. melanogaster* developed by Graf et al. [1984] has shown to be an efficient, versatile and sensitive eukaryotic short-term assay for detection of genotoxic activity of pure chemical compounds with different structures or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity [Graf et al., 1984; 1996; Vogel et al., 1999]. SMART can detect the genotoxicity of compounds that produces loss of heterozygosis by several

mechanisms, such as mitotic recombination, deletion, point mutation and chromosomal loss [Graf et al., 1984].

The wing SMART in *D. melanogaster* has been used to demonstrate the protective effects of different free radical scavengers on the genotoxicity of DXR [Costa and Nepomuceno, 2006; Fragiorgio et al., 2007; Valadares et al., 2008].

No data concerning to the antioxidant, mutagenic or antimutagenic activity of EE obtained from the leaves or stem of *N. cissiflora* were found in the literature.

In the present study, we assessed the antioxidant activity of EE from the leaves or stem of *N. cissiflora* *in vitro* using the DPPH test. The data observed with DPPH test demonstrates antiradical activity of these plant extracts. The wing SMART using the *D. melanogaster* standard (ST) cross and high bioactivation (HB) cross was used to evaluate the genotoxicity of EE from the leaves or stem of *N. cissiflora* alone. The extracts showed no mutagenic effects on spontaneous DNA lesions. So, due to these preliminary observed results, EE from the leaves or stem of *N. cissiflora* were used in combination with the free radical generator DXR for antigenotoxic evaluation.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Doxorubicin (DXR) (CAS N° 23214-92-8) Biorrub® Laboratórios Biosintética Ltda., São Paulo - SP, Brazil, used as a positive control, was obtained from the Hospital de Clinicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, Brazil. The EE obtained from the leaves of *N. cissiflora*, and the EE obtained from the stem of *N. cissiflora* were produced and supplied by the Chemical Department of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande - MS, Brazil. The EE were always prepared immediately before use and dissolved in 1% tween-80 (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema – SP, Brazil) and 3% ethanol (Proquímios, Rio de Janeiro – RJ, Brazil) and distilled water. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (CAS N° 1898-66-4) and butylated hydroxytoluene (BHT) (CAS N° 128-38-0) were obtained from Sigma-Aldrich Brazil Ltda., São Paulo – SP, Brazil.

Phytochemical study

Fractionation of the EE from the leaves of *N. cissiflora* led to the isolation of catechins, sesquiterpenes, sesquiterpene lactone (costic acid) and β -sitosterol. Fractionation of the EE from the stems of *N. cissiflora* led to the isolation of sesquiterpenes. Their structures were determined by spectroscopic analyses. For preparation of plant extracts and additional information, see Miranda [2008].

Radical-scavenging activity (DPPH)

The free radical scavenging capacity of EE from the leaves or stem of *N. cissiflora* was determined using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method [Antolovich et al., 2002]. The ability to scavenge DPPH radical was measured in these experiments by the discoloration of the solution. Briefly, 100 μ L of 0.02mM DPPH in ethanol was mixed with 100 μ L of EE from the leaves of *N. cissiflora* with differing final concentrations (12.50, 25.0, 50.0, 100.0 and 200.0 μ g.mL⁻¹) or with

100 μL of EE from the stems of *N. cissiflora* with differing final concentrations (12.50, 25.0, 50.0, 100.0 and 200.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and the mixtures were vortexed. The samples were kept in the dark for 30 min at room temperature and then the decrease in absorbance at 517 nm was measured spectrophotometrically. Absorbance of DPPH solution in the absence of plant extract was measured as the negative control. BHT was used as positive control. The antioxidant assays were carried out in triplicate.

Somatic Mutation And Recombination Test (SMART)

The genotoxic effects of EE obtained from the leaves or stem of *N. cissiflora* and the antigenotoxic effects of EE obtained from the leaves or stem of *N. cissiflora* on DXR-induced somatic mutations in *D. melanogaster* were assessed by SMART for the multiple wing hairs (*mwh*, 3-0,3) and flare-3 (*flr*³, 3-38) recessive mutations. The *D. melanogaster* crosses used were the standard (ST) cross, in which *flr*³/*ln*(3LR)TM3, *ri p^p sep l*(3)89Aa *bx*^{34e} e *Bd*^S females were mated with *mwh* males [Graf *et al.*, 1989]; and the high bioactivation (HB) cross, in which *ORR; flr*³/*ln*(3LR)TM3, *ri p^p sep l*(3)89Aa *bx*^{34e} e *Bd*^S females were mated with *mwh* males [Graf and van Schaik, 1992]. The HB cross is characterized by a high sensitivity to promutagens and procarcinogens because the *ORR; flr*³/TM3, *Bd*^S strain carries chromosomes 1 and 2 from a DDT-resistant Oregon R(R) line [Dapkus and Merrell, 1977] which is characterized by an increased level of cytochrome P-450 [Hällström and Blanck, 1985; Saner *et al.*, 1996].

Both crosses produce two types of progeny *i.e.* marker-heterozygous (MH) (*mwh*+/+*flr*³) flies, with phenotypically wild type wings and balancer-heterozygous (BH) (*mwh*+/+TM3, *Bd*^S) flies, with phenotypically serrate wings.

From the two crosses eggs were collected for 8h in culture bottles with an agar-agar base (4% w/v) topped with thick layer of live baker's yeast supplemented with sucrose. The larvae were washed out of the bottles 72 $\pm$ 4 h later with tap water and collected in a stainless steel strainer. For chronic feeding, a series of vials were prepared with 1.5 g mashed potato flakes (Yoki® Alimentos S.A., Brazil) according to Spanó *et al.* [2001] and 5 mL of a solution containing a final concentration of 0.625 mg mL⁻¹; 1.25 mg.mL⁻¹ and 2.50 mg.mL⁻¹ of EE from

leaves alone or combined with DXR at a final concentration of 0.125 mg.mL⁻¹; 5 mL of a solution containing a final concentration of 0.625 mg.mL⁻¹; 1.25 mg.mL⁻¹ and 2.50 mg.mL⁻¹ of EE from stem alone or combined with DXR at a final concentration of 0.125 mg.mL⁻¹. Negative (1% tween-80 and 3% ethanol in distilled water) and positive (0.125 mg.mL⁻¹ DXR) controls were included in both experiments.

Each treatment was conducted in duplicate. The hatched flies were stored in 70% (v/v) ethanol. Their wings were removed and mounted on slides with Faure's solution and analyzed under compound microscope at 400x magnification. Frequency and size of single and spots were recorded according to Graf et al. [1984].

Statistical analysis

DPPH

Scavenging activity was measured as the decrease of samples absorbance versus DPPH standard [Yagi et al., 2002]. The samples DPPH radical scavenging activity was expressed as percentage inhibition (%) and mean inhibiting concentration (IC₅₀)% was defined by the formula: % DPPH radical scavenging activity = [(OD control-OD sample)/OD control] X100 where OD control was the absorbance of the control and OD sample was the absorbance of the sample [Lee et al., 2003; Karagözler et al., 2008].

SMART

The frequency of each type of spot (small single, large single or twin) and the total frequency of spots per fly for each treatment were compared pair-wise (i.e., negative control versus EE; positive control (DXR) alone versus DXR plus EE) according to Kastenbaum and Bowman [1970], with P=0.05 [Frei and Würgler, 1988; 1995]. All inconclusive and weak results were analyzed with the non-parametric *U*-test of Mann, Whitney and Wilcoxon ($\alpha=\beta=0.05$, one sided) [Frei and Würgler, 1995]. Based on clone induction frequencies per 10⁵ cells, the

recombinogenic activity was calculated as: frequency of mutation (FM) = frequency of clones in BH flies/frequency of clones in MH flies; frequency of recombination (FR) = 1 - FM. Frequencies of total spots (FT) = total spots observed in MH flies (considering mwh and flr³ spots) / N° of flies; mutation = FT - FR; recombination = FT - FM [Santos et al., 1999; Sinigaglia et al., 2004]. Based on the control-corrected spot frequencies per 10⁵ cells, the percentages of EE inhibition were calculated as: (DXR alone – EE plus DXR/DXR alone) X100 [Abraham, 1994].

Results

Radical-scavenging activity (DPPH)

Radical scavenging activity of EE obtained from the leaves or stem of *N. cissiflora* was determined spectrophotometrically by the DPPH free radical scavenging method.

The quantitative evaluation of the antioxidant activity was carried out using the methodology described in the literature, monitoring the consumption of the free radical DPPH through the samples, by measuring the fall in absorbance of solutions of different concentrations. These measurements were made using a spectrophotometer at a wavelength of 517 nm.

The amount of extract tested, required to reduce the initial concentration of DPPH by 50% (IC₅₀), is shown in Table 1. A dose-dependent inhibition was found for the leaf extract, where at the concentration of 200 µg.mL⁻¹ the inhibition percentage was 88.45, with an IC₅₀ of 72.29 µg.mL⁻¹, whereas the positive control (BHT) presented an inhibition percentage of 86.13, with an IC₅₀ of 63.15 µg.mL⁻¹. These data indicate potent antioxidant activity of the leaves extract by DPPH, which inhibits free radicals. However, the EE of the stem produced no such antioxidant activity (data not shown).

Somatic Mutation And Recombination Test (SMART)

The genotoxic activities of the EE obtained from the leaves or stem of *N. cissiflora* alone and the antigenotoxic activities of the EE from the leaves or stem of *N. cissiflora* in association with DXR were evaluated using the SMART in the MH progeny from the ST and HB crosses. Concurrent negative (1% tween-80 and 3% ethanol in distilled water) and positive (DXR 0.125 mg.mL⁻¹) controls were also included. The BH progeny was analysed only when positive outcomes were observed in the total spots of MH individuals. In both crosses EE alone or in association with DXR was assessed twice. Since no statistical differences were found between the results of individual experiments, the data observed were pooled.

EE from the leaves of *N. cissiflora*

The results obtained after treatment of the larvae with equivalent concentrations of 0.625; 1.25 mg and 2.50 mg.mL⁻¹ of EE obtained from the leaves of *N. cissiflora* alone, and the negative and positive controls, are summarized in Tables 2 and 3, respectively for ST cross and HB cross. The frequencies of mutant spots observed in the negative controls compared with the frequencies observed in the treated groups with EE in both ST cross and HB cross, revealed no statistically significant differences. These data allow us to conclude that the EE from the leaves of *N. cissiflora* are not genotoxic in the concentrations evaluated. Furthermore, the results recorded in both tables demonstrate and confirm previous observations that DXR is a powerful direct-acting genotoxin, capable of inducing high frequencies of all kind of mutant spots.

The results obtained from the simultaneous treatment of different EE from the leaves of *N. cissiflora* combined with DXR are also summarized in Tables 2 and 3. The data obtained in the ST cross and HB cross are rather similar. The larvae of MH individuals treated with a solution containing a final concentration of 0.625; 1.25 and 2.50 mg.mL⁻¹ of EE combined with DXR (0.125 mg.mL⁻¹), showed a statistically significant reduction of total spots induced by DXR, except for the concentration of 0.625 mg.mL⁻¹ in the HB cross. The overall inhibition is 40.83%, 71.56% and 88.16% for EE 0.625; 1.25 and 2.50 mg mL⁻¹, respectively, for ST cross, and 23.04% and 62.00% for EE 1.25 and 2.50 mg mL⁻¹, respectively, for HB cross.

The larvae of BH individuals showed a statistically significant reduction of total spots induced by DXR for either the ST cross or HB cross.

Comparisons of the frequencies of clone formation observed in the MH and BH flies of the treated series with DXR alone and DXR plus EE were done to quantify the mutagenic and recombinogenic potential of the test samples, according to Santos et al. [1999] and Sinigaglia et al. [2004]. The results showed that the genotoxicity in MH flies was due to mainly to mitotic recombination (Tables 2 and 3). Nevertheless, the results obtained show that EE from the leaves of *N. cissiflora* had anti-mutagenic activity, but did not display antirecombinogenic activity.

EE from the stems of *N. cissiflora*

The results obtained after treatment of the larvae with equivalent concentrations of 0.625; 1.25 and 2.50 mg.mL⁻¹ of EE obtained from the stems of *N. cissiflora* alone, and the negative and positive controls, are summarized in Tables 4 and 5, respectively for ST cross and HB cross. For either the ST cross or HB cross, no statistically significant differences in spot frequencies were observed in treatments with EE from the stems of *N. cissiflora*, indicating that under these experimental conditions the extracts showed no mutagenic effects on spontaneous DNA lesions.

The results obtained from the simultaneous treatment of different EE from the stems of *N. cissiflora* combined with DXR are also summarized in Tables 4 and 5. The data obtained in the ST cross and HB cross are also rather similar. The larvae of MH individuals treated with a solution containing a final concentration of 0.625; 1.25 and 2.50 mg.mL⁻¹ of EE combined with DXR (0.125 mg.mL⁻¹), showed a statistically significant reduction of total spots induced by DXR, except for the concentration of 0.625 mg.mL⁻¹ in both crosses. The overall inhibition is 27.60%, and 39.72% for EE 1.25 and 2.50 mg.mL⁻¹, respectively, for ST cross, and 23.89% and 43.17% for EE 1.25 and 2.50 mg.mL⁻¹, respectively, for HB cross.

The larvae of BH individuals showed a statistically significant reduction of total spots induced by DXR for all concentrations either for the ST cross or HB cross.

Comparisons of the frequencies of clone formation observed in the MH and BH flies of the treated series with DXR alone and DXR plus EE showed that the genotoxicity in MH flies was due to mainly to mitotic recombination (Tables 4 and 5). The results obtained show that EE from the stems of *N. cissiflora* had anti-mutagenic activity but did not display antirecombinogenic activity.

Discussion

The molecule DPPH is characterized as a stable-free radical due to the delocalization that gives rise to a deep violet color, characterized by an absorption band in ethanol solution centered at 517 nm. When a solution of DPPH is mixed with that of a substance that can donate a hydrogen atom, this gives rise to the reduced form (diphenylpicrylhydrazine), with the loss of the violet color [Bouhlef et al., 2007].

The antioxidant activity observed with EE obtained from the leaves of *N. cissiflora* can be attributed in part to β -sitosterol, the main component of the extract. However, an additive or synergistic effect of other components cannot be discarded.

Moreno [2003] suggests that β -sitosterol, a minor component of olive oil, can protect against oxidative stress through modulation of antioxidant enzymes. Masella et al. [2004] suggested that β -sitosterol regulates the GSH redox cycle by preventing ROS accumulation through the improvement of antioxidant enzymes. β -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. The effects of β -sitosterol on antioxidant enzymes depend on the estrogen/phosphatidylinositol 3-kinase pathway [Vivancos et al., 2005]. β -sitosterol shows binding affinity for these estrogen receptors [Gutendorf and Westendorf, 2001] and estrogens act as antioxidants, at least to some extent, via the stimulation of antioxidant enzymes [Dabrosin et al., 1998].

Plants (fruits, vegetables, medicinal herbs, etc.) may contain a wide variety of free radical scavenging molecules, such as phenolic compounds (e.g. phenolic acids, flavonoids, quinones, coumarins, lignans, stilbenes, tannins), nitrogen compounds (alkaloids, amines, betalains), vitamins, terpenoids (including carotenoids), and some other endogenous metabolites, which are rich in antioxidant activity [Cotelle et al., 1996; Velioglu et al., 1998; Zheng and Wang, 2001; Cai et al., 2003].

The antioxidative potential of a plant does not depend solely on phenolic content [Dorman et al., 2003]. The terpenes are a major group of chemicals present in plants and they have been shown to possess antioxidative properties particularly against lipid peroxidation [Grassmann et al., 2002]. In addition to the

classical anti-oxidants, plants with antioxidative properties have been traditionally used to prevent diseases associated with free radicals [Kim et al., 2007]. So, the antioxidants naturally contained in aromatic and medicinal plants, fruits and vegetables can be used in the prevention of deleterious oxidative effects and, therefore, are considered chemoprotectives [Kitts, 1994; Verhagen et al., 1997; Kris-Etherton et al., 2002].

Data from numerous experiments suggest that oxidative damage to DNA is important in aging, as well as in the etiology of many human diseases, including atherosclerosis, neurodegenerative diseases and even cancer [Marnett, 2000; Olinski et al., 2002].

The genotoxic potential is directly proportional to the number of oxidative injuries to the DNA that escape the repair mechanism. It is known that the repair mechanism weakens with age and this is how DNA injuries accumulate [Valko et al., 2004].

According to Maguire et al. [2003], β -sitosterol (the main component of the EE from the leaves of *N. cissiflora*) and β -sitosterol oxide, do not induce genotoxic effects in mammal cells, but cause a significant reduction in cell viability. However, SLs were also isolated from EE from the leaves of *N. cissiflora*. Previous studies have shown that most known active SLs present cytotoxic activity (KB and P388 leukemia cells in vitro) and activity against *in vivo* p388 leukemia cells [Fernandes et al., 2008]. According to Hibasami et al. [2003], SLs are considered to be responsible for the observed antitumoral activity, showing strong growth inhibitory effect against human promyelotic leukemia (HL-60) cells and apoptosis.

Chemical studies showed that the cytotoxic activity is due to the reaction of α - β -unsaturated carbonyl structures of the SLs with thiols, such as cysteine. These studies support the view that SLs inhibit tumor growth by selective alkylation of growth-regulatory biological macromolecules, such as key enzymes, which control cell division, thereby inhibiting a variety of cellular functions, which directs the cells into apoptosis [Fernandes et al., 2008]. Severe oxidative stress conferred by SLs-induced thiol depletion results in a disruption of the integrity of mitochondria, triggering mitochondrial permeability transition and release of mitochondrial pro-apoptotic proteins [Tukov et al., 2004].

However, in the present study the EE obtained from the leaves or stems of *N. cissiflora* did not induce genotoxic effect in somatic cells of *D. melanogaster*, since no reduction in hatching and no statistically significant differences in spot frequencies were observed for larvae treated with these EE when compared to the negative control. These results are probably due to the concentration of SL in the extract, which was not sufficient to cause neither cytotoxic nor genotoxic events.

An analysis of the frequencies of recombinations obtained in the groups treated simultaneously with DXR and EE in the ST and HB crosses showed that the frequency of recombination was similar to that observed in the positive control (DXR) at all concentrations. The data are similar to that obtained by Fragiorgi et al. [2007].

DXR interacts with the enzyme topoisomerase II, which controls the topology of super spiralized regions of DNA, linking to it and causing an opening in the double strand. As such, the treatments with DXR prevent the reattachment of the double strands cut by topoisomerase II, causing permanent damage to the DNA molecule [Minotti et al., 2004]. According to Ferguson and Pearson [1996], all of the point inhibitors have a potent clastogenic effect and can induce illegitimate recombination. According to previous observations [Lehmann et al., 2003; Fragiorgi et al., 2007; Valadares et al., 2008], DXR is a preferential inducer of homologous recombination when compared with mutational events in *D. melanogaster* somatic cells.

Comparing the data obtained with the EE (leaves and stem), a dose-dependent antimutagenic effect was found. However, extracts obtained from the leaves are more efficient when compared to the results obtained with the stem extract. These results are attributed to different metabolites found in each type of extract. Leaves exhibited antioxidant activity and, therefore reduce the mutagenic effects caused by DXR, including the production of free radicals.

The effective anti-oxidant activity of the EE extract from the leaves of *N. cissiflora* may be due to the scavenger properties of EE against the free radicals generated by DXR, playing an important role in antimutagenic activity.

The antigenotoxic effect obtained with the stem extract can be attributed to the action of sesquiterpenes that protect against oxidative stress. *Linalool* presents activity against a broad spectrum of cancer cells, especially cervical cancer cells.

However, this does not discard the action of other compounds present in the extract, though none were identified in the antigenotoxic activity observed [Cherng *et al.*, 2007].

The present study revealed that *N. cissiflora* extracts are effective in reducing levels of mutagenicity from DXR, probably operating through more than one mechanism.

Another explanation for the reduction in the frequency of spots in this experiment may be due to the activation of the repair mechanism. Konopacka *et al.* [1998] showed that the radio protective effects of vitamins C and E, as well as β -carotene, depend on the treatment concentration, and are not only due to capturing of the free radicals but also to an increase in DNA repair.

Antimutagenic activity of substances derived from plants may be due to a variety of mechanisms, such as inhibition of genotoxic effects, signal transduction modulation, antioxidant activity and scavenging of free radicals [De Flora *et al.*, 1999; Mantle *et al.*, 2000].

Diverse studies indicate that antimutagenic properties may be due to inhibition of penetration of the mutagens into the cells [Shankel *et al.*, 1993]; inhibition of metabolic conversion by P450 of promutagens into mutagens [Gomes-Carneiro *et al.*, 2005], or activation of enzymatic detoxification of mutagens for instance by plant extracts.

Natural compounds play important roles in multiple mechanisms, which may be responsible for their anticarcinogenic effects. Antioxidant activity and iron chelating activities as well as inhibition of bioactivating (phase I) enzymes and induction of detoxifying (phase II) enzymes [Marchand, 2002; Galati and O'Brien, 2004] may provide protection against cancer initiation (antigenotoxic effects).

Although β -sitosterol is the main component of EE from the leaves, the genotoxic and/or antigenotoxic activity of this substance was not evaluated with SMART. The literature, however, attributes diverse activities to β -sitosterol. Epidemiological evidence has shown that β -sitosterol is a particularly potent inhibitor of tumor growth in human colon cancer HT-29 cells and human prostate cancer LNCaP cells [Awad *et al.*, 1996; von Holtz *et al.*, 1998].

Several lines of evidence are available to suggest that plant phytosterols inhibit the induction of tumors in animals; dietary plant phytosterols appear to

inhibit colonic cancer development prior to adenoma formation [Ling and Jones, 1995], β -Sitosterol induces G2/M arrest, endoreduplication, and apoptosis through the Bcl-2 and PI3K/Akt signaling pathways [Moon et al., 2008].

β -sitosterol had an inhibitory effect on the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in mouse skin following initiation by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene [Yasukawa et al., 1991] and coadministration of *N*-methyl-*N*-nitrosourea and β -sitosterol to rats produced significantly fewer colon tumors (benign or benign and malignant) as compared to rats given the carcinogen alone [Raicht et al., 1980].

In conclusion, under the experimental conditions, the EE obtained from the leaves of *N. cissiflora* presented an antioxidant and antimutagenic effect on DXR-induced genotoxicity whereas EE obtained from the stems of *N. cissiflora* presented only antigenotoxic activity. Further studies will be needed with the components isolated to determine the contribution of each one on the antioxidant and antigenotoxic activities of EE.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS) and the Brazilian agencies CAPES, CNPq and FAPEMIG.

REFERENCES

Abraham SK. 1994. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis* 9:383-386.

Almeida LFR, Sannomiya M, Rodrigues CM, Delachiave ME, Santos LC, Vilegas W, Feo V. 2007. *In vitro* allelopathic of extracts and amenthoflavone from *Byrsonima crassa* (Malpighiaceae). *J Plant Interactions* 2:121-124.

Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127:183–198.

Aruoma OI, Sun B, Fujii H, Neergheen VS, Bahorun T, Kang KS, Sung MK. 2006. Low molecular proanthocyanidin dietary biofactor Oligonol: its modulation of oxidative stress, bioefficacy, neuroprotection, food application and chemoprevention potentials. *Biofactors* 27:245–265.

Auluck PK, EdwinChan HY, Trojanowshi JQ, Lee VMY, Bonini NM. 2002. Chaperone suppression of α -Synuclein toxicity in *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science* 295:865-868.

Awad AB, Chen YC, Fink CS, Hennessey T. 1996. β -Sitosterol inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids. *Anticancer Res* 16:2797-2804.

Barbosa-Filho JM, Yoshida M, Gottlieb OR. 1989. Lignoids from *Nectandra amazonum* and *N. glabrescens*. *Phytochemistry* 28:1991-1993.

Benford DJ, Hanley BA, Bottrill K, Oehlschlager S, Balls M, Branca F, Castengnaro JJ, Descotes J, Hemminiki K, Lindsay D, Schitter B. 2000. Biomarkers as predictive tools in toxicity testing. *Altern Lab Anim* 28:119-131.

Bien S, Riad A, Ritter CA, Gratz M, Olshausen F, Westermann D, Grube M, Krieg T, Ciecholewski S, Felix SB, Staudt A, Schultheiss HP, Ewert R, Völker U, Tschöpe C, Kroemer HK. 2007. The endothelin receptor blocker bosentan inhibits doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cancer Res* 67:10428-10435.

Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200.

Bohlke M, Guinaudeau H, Angerhofer CK, Wongpanich V, Soejarto DD, Farnsworth NR. 1996. Costaricine, a new antiplasmodial bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Nectandra salicifolia* trunk bark. *J Nat Prod* 59:576-580.

Bouhlef I, Mansour HB, Limem I, Sghaier MB, Mahmoud A, Chibani JB, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. 2007. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in different extracts from the leaves of *Acacia salicina* from the center of Tunisia. *Environ Toxicol Pharmacol* 23:56-63.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.* 28:25-30.

Cai YZ, Sun M, Corke H. 2003. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *J Agric Food Chem* 51:2288-2294.

Cherng JM, Shieh DE, Chiang W, Chang MY, Chiang LC. 2007. Chemopreventive effects of minor dietary constituents in common foods on human cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:1500-1504.

Cotelle N, Bernier JL, Catteau JP, Pommery J, Wallet JC, Gaydou EM. 1996. Antioxidant properties of hydroxyflavones. *Free Radic Biol Med* 20:35–43.

Costa WF, Nepomuceno JC. 2006. Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 47:18-24.

Dabrosin C, Hammar M, Ollinger K. 1998. Impact of oestradiol and progesterone on antioxidant activity in normal human breast epithelial cells in culture. *Free Radic Res* 28:241–249.

Dapkus D, Merrell DJ. 1977. Chromosomal analysis of DDT resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 87:685-697.

De Flora S, Bagnasco M, Vainio H. 1999. Modulation of genotoxic and related effects by carotenoids and vitamin A in experimental models: mechanistic issues. *Mutagenesis* 14:153-172.

Dorman HJ, Peltoketo A, Hiltunen R, Tikkanen MJ. 2003. Characterization of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chem* 83:255-262.

Feinstein E, Canaani E, Weiner LM. 1993. Dependence of nucleic acid degradation on in situ free-radical production by adriamycin. *Biochemistry* 32: 13156-13161.

Fernandes M B, Scotti MT, Ferreira M, Emerenciano VP. 2008. Use of self-organizing maps and molecular descriptors to predict the cytotoxic activity of sesquiterpene lactones. *Eur J Med Chem* 24:1-9.

Festing MFW, Baumans V, Combes DR, Hadler M, Hendriksen FM, Howards BR, Lovell DP, Moore GJ, Overend P, Wilson MS. 1998. Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions. *Altern Lab Anim* 26:283-301.

Ferguson LR, Pearson AE. 1996. The clinical use of mutagenic anticancer drugs. *Mutat Res* 355:1-12.

Fragiorgis EJ, Spanó MA, Antunes LMG. 2007. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Genet Mol Biol 2:449-455.

Frei H and Würigler FE. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative or inconclusive result. Mutat Res 203:297-308.

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

Galati G, O'Brien PJ. 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. Free Radic Biol Med 37:287-303.

Gomes-Carneiro MR, Dias DMM, De-Oliveira ACAX, Paumgarten FJR. 2005. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of α -bisabolol in the Salmonella/microsome assay. Mutat Res 585:105-112.

Graf U, Frei H, Kägi A, Katz AJ, Würigler FE. 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. Mutat Res 222:359-373.

Graf U, Spanó MA, Guzmán-Rincón J, Abraham SK, Andrade HHR. 1996. The wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. Afr Newsl Occup Health Saf 6:9-13.

Graf U, van Schaik N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Mutat Res 271:59-67.

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

Grassmann J, Hippeli S, Elstner EF. 2002. Plant's defense and its benefits for animals and medicine: Role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. Plant Physiol Biochem 40:471-478.

Gutendorf B, Westendorf J. 2001. Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthesis estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. Toxicology 166:79–89.

Hällström I, Blanck A. 1985. Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I Chromosomal determination of some cytochrome P-450-dependent reactions. Chem Biol Interact 56:157-171.

Hibasami H, Yamada Y, Moteki H, Katsuzaki H, Imai K, Yoshida K. 2003. Sesquiterpenes (costunolide and zaluzanin D) isolated from laurel (*Laurus nobilis* L.) induce cell death and morphological change indicative of apoptotic chromatin condensation in leukemia HL-60 cells. Inter J Mol Med 12:147-151.

Horenstein MS, Heide VRS, L'Ecuyer, TJ. 2000. Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. Mol Genet Metab 71:436-444.

Karagözler AA, Erdağ B, Emek YÇ, Uygun DA. 2008. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. Food Chem 111:400-407.

Kastenbaum MA and Bowman KO. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutat Res 9:527-549.

Kazantsev A, Walker HA, Slepko N. 2002. Abivalent Huntingtin binding peptide suppresses polyglutamine aggregation and pathogenesis in *Drosophila*. Nat Genet 30:367-376.

Kim DS, Woo ER, Chae SW, Ha KC, Lee GH, Hong ST, Kwon DY, Kim MS, Jung YK, Kim HM, Kim HK, Hyung-Ryong HR, Chae HJ. 2007. Plantainoside D protects adriamycin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells via the inhibition of ROS generation and NF- κ B activation. Life Sci 80:314–323.

Kitts DD. 1994. Bioactive substances in food: identification and potential uses. Can J Physiol Pharmacol 76:423-424.

Konopacka M, Widel M, Rzeszowska-Wolny J. 1998. Modifying effect of vitamins C, E and β -carotene against γ -ray-induced DNA damage in mouse cells. Mutat Res 417:85-94.

Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. Am J Med 113:71S–88S.

Lee KW, Lee HJ, Surh YJ, Lee CY. 2003. Vitamin C and cancer chemoprevention: reappraisal. Am J Clin Nutr 78:1074-1078.

Lehmann M, Franco A, Vilar KSP, Reguly ML, 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*. Mutat Res 539:167-175.

Le Quesne PW, Larrahondo JE, Raffauf RF. 1980. Antitumor plants constituents of *Nectandra rigia*. J Nat Prod 43:353-359.

Ling WH, Jones PJH. 1995. Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits, and side effects. Life Sci 57:195-206.

Lyu YL, Kerrigan JE, Lin CP, Azarova AM, Tsai YC, Ban Y, Liu LF. 2007. Topoisomerase II β -mediated DNA double-strand breaks: Implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res* 67:8839-8846.

Maguire L, Konoplyannikov M, Ford A, Aguire AR, O'Brien, NM. 2003. Comparison of the cytotoxic effects of β -sitosterol oxides and a cholesterol oxide, β -hydroxycholesterol in cultured mammalian cells. *British J Nutr* 90:767-775.

Mantle D, Lennard TW, Pickering, AT. 2000. Therapeutic applications of medicinal plants in the treatment of breast cancer: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *Adverse Drug Reactions and Toxicology Reviews* 19:223-240.

Marchand LL. 2002. Cancer preventive effects of flavonoids - a review. *Biomed Pharmacother* 56:296-301.

Marnett LJ. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21:361-370.

Masella R, Vari R, D'Archivio M, Di Benedetto R, Matarrese P, Malorni W, Scazzocchio B, Giovannini C. 2004. Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *J Nutr*. 134:785-791.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. 2004. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56:185-229.

Miranda ACM. 2008. Estudo químico das folhas e caule da *Nectandra cissiflora* (Lauraceae). Dissertação de Mestrado. UFMS, Departamento de Química.

Moon DO, Choi YH, Kim GY. 2008. β -Sitosterol induces G2/M arrest, endoreduplication, and apoptosis through the Bcl-2 and PI3K/Akt signaling pathways. *Cancer Lett* 264:181-191.

Moreno JJ. 2003. Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radic Biol Med* 35:1073-1081.

Mukhopadhyay I, Saxena DK, Chowdhuri DK. 2003. Hazardous effects of effluent from the chrome plating industry: 70 kDa heat shock protein expression as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (*hsp 70-LacZ*). *Environ Health Perspect* 111:1926-1932.

Muñoz V, Sauvain M, Bourdy G, Callapa J, Bergeron S, Roj I, Bravo JA, Balderrama L, Ortiz B, Gimenez A, Deharo E. 2000. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I Evaluation of the antimalarial activity of plants use by the Chacolo Indians. *J Ethnopharmacol* 69:127-137.

Nazir A, Saxena DK, Kar-Chowdhuri. 2003. Induction of hsp 70 in transgenic *Drosophila*: biomarker of exposure against phthalimide group of chemicals. *Biochem Biophys Acta* 1621:218-225.

Olinski R, Gackowski D, Foksinski M, Rozalski R, Roszkowski K, Jaruga P. 2002. Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. *Free Radic Biol Med* 33:192-200.

Picman AK. 1986. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem Syst Ecol* 14:255-281.

Raicht FB, Cohen BI, Fazzini EP, Sarwal AN, Takahasi M. 1980. Protective effects of plant sterols against chemically induced colon tumor in rats. *Cancer Res* 41:403-405.

Ribeiro AB, Silva DHS, Bolzani VS. 2002. Antioxidant flavonol glycosides from *Nectandra grandiflora* (Lauraceae) Eclet. Quím 27:35-44.

Saner C, Weibel B, Würgler FE, Sengstag C. 1996. Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Mol Mutagen* 27:46-58.

Santos JH, Graf U, Reguly ML, Andrade HHR. 1999. The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 444:355-365.

Shankel DM, Kuo S, Haines C, Mitscher LA. 1993. Extracellular interception of mutagens. *Basic Life Sci.* 61:65-74.

Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. 2000. Adriamycin-induced heart-failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem* 207:77-85.

Sinigaglia M, Reguly ML, Andrade HHR. 2004. Effect of vanillin on toxicant-induced mutation and mitotic recombination in proliferating somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 44:394-400.

Spanó MA, Frei H, Würgler FE, Graf U. 2001. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* 16:385-394.

Stuart EC, Scandlyn MJ, Rosengren RJ. 2006. Role of epigallocatechin gallate (EGCG) in the treatment of breast and prostate cancer. *Life Sci* 79:2329-2336.

Tukov FF, Anand S, Gadepalli RS, Gunatilaka AA, Matthews JC, Rimoldi J. 2004. Inactivation of the cytotoxic activity of repin, a sesquiterpene lactone from *Centaurea repen*. Chem Res Toxicol 17:1170-1176.

Valadares BLB, Graf U, Spanó MA. 2008. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. Food Chem Toxicol 46:1103-1110.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence Mol Cell Biochem 266:37-56.

Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. J Agric Food Chem 46:4113-4117.

Verhagen H, Rompelberg CJM, Strube M, van Poppel G, van Bladeren PJ. 1997. Cancer prevention by dietary constituents in toxicological perspective. J Envir Path Tox Oncol 16:343-360.

Vivancos M, Juan J, Moreno T. 2005. β -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. Free Radic Biol Med 39:91-97.

Vogel W, Graf U, Frei H, Nivard MM. 1999. The results of assay in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. In: The use of short- and medium-term tests for carcinogenic hazard evaluation (McGregor, D.B., Rice, J.M.)

Von Holtz RL, Fink CS, Awad AB. 1998. β -Sitosterol activates the sphingomyelin cycle and induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells, Nutr Cancer 32:8-12.

Yagi A, Kabash A, Okamura NO, Haraguchi H, Moustafa SM, Khalifa TI. 2002. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of alosein derivatives in *Aloe vera*. Planta Med 68:957-960.

Yasukawa K, Takido M, Matsumoto T, Takeuchi M, Nakagawa S. 1991. Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of tumor promoter and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse. *Oncology* 48:72-76.

Yu O, Jez JM. 2008. Nature's assembly line: biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. *Plant Journal* 54:750-762.

Zang S, Won YK, Ong CN, Shen HM. 2005. Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 5:239-249.

Zheng W, Wang SY. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem* 49:5165-5170.

Zunino F, Capranico G. 1992. DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anticancer Drug Des* 5:307-317.

Table 1. Anti-oxidant activities of the ethanolic extracts (EE) from the leaves of *N. cissiflora* on DPPH free radical

Compounds and Concentration ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Inhibition (%) ^a	IC ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Butylated hydroxyl toluene (BHT) ^b		
12.5	8.55	63.15 ± 0.34
25	20.40	
50	38.42*	
100	62.96*	
200	86.31*	
EE from the leaves of <i>N. cissiflora</i>		
12.5	8.77	72.29 ± 0.36
25	17.30	
50	30.02*	
100	51.72*	
200	88.45*	

^a Inhibition of absorbance at 517 nm relative to that of standard DPPH solution.

^b Positive control of anti-oxidant effect.

* P < 0,05 (Dunett test)

TABLE 2. Summary of results obtained with the *Drosophila* wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) and balancer-heterozygous (BH) progeny of the standard (ST) cross after chronic treatment of larvae with ethanolic extracts (EE) from the leaves of *N.cissiflora* and doxorubicin (DXR)

Genotypes and treatments		N° of flies	Spots per fly (number of spots) statistical diagnosis ^a				Spots with mwh clone ^c	Frequency of clone formation/10 ⁵ cells per cell division ^d		Recombination (%)	Inhibition ^e (%)
DXR (mg/mL)	EE (mg/mL)		Small single spots (1-2 cells) ^b	Large single spots (>2 cells) ^b	Twin spots	Total spots		Observed	Control corrected		
<i>mwh/flr³</i>											
0	0	60	0.23 (14)	0.02 (01)	0.00 (00)	0.25 (15)	15	0.51			
0	0.625	60	0.23 (14) i	0.06 (02) i	0.00 (00) i	0.25 (15) -	16	0.54	0.03		
0	1.250	60	0.26 (16) i	0.00 (00) i	0.00 (00) i	0.26 (16) i	16	0.54	0.03		
0	2.500	60	0.23 (14) i	0.02 (01) i	0.00 (00) i	0.25 (15) -	15	0.51	0.00		
0.125	0	60	7.47 (219)+	5.33 (320)+	7.23 (434)+	16.22 (973)+	943	32.20	31.69	89.33	
0.125	0.625	60	7.03 (206)	2.35 (141)*	3.73 (224)*	9.52 (571)*	564	19.26	18.75	95.30	40.83
0.125	1.250	60	3.41 (100) *	1.23 (74)*	1.77 (106)*	4.67 (280)*	279	9.52	9.01	92.78	71.56
0.125	2.500	60	0.82 (49) *	0.43 (26)*	0.87 (52)*	2.12 (127)*	125	4.26	3.75	92.80	88.16
<i>mwh/TM3</i>											
0	0	60	0.34 (10)	0.00 (00)	†	0.34 (10)	10	0.34			
0.125	0	60	2.52 (74)+	1.19 (35)+	†	3.72 (109)+	109	3.72	3.38		
0.125	0.625	60	1.16 (34)*	0.06 (02)*	†	1.22 (36)*	36	1.22	0.88		73.96
0.125	1.250	60	0.92 (27)*	0.06 (02)*	†	0.99 (29)*	29	0.99	0.65		80.76
0.125	2.500	60	0.58 (15)*	0.03 (01)*	†	0.61 (18)*	18	0.61	0.27		92.00

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würzler [1988; 1995]. *U*-test, two-sided; probability levels: -, negative; +, positive; i, inconclusive; $P \leq 0.05$ vs. untreated control; *, $P \leq 0.05$ vs. DXR only.

^bIncluding rare *flr³* single spots.

^cConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^dFrequency of clone formation: clones/flies/48,800 cells (without size correction).

^eCalculated as [DXR alone – DXR + EE) / DXR alone} X 100, according to Abraham [1994].

^fBalancer chromosome *TM3* does not carry the *flr³* mutation and recombination is suppressed, due to the multiply inverted region in these chromosome.

TABLE 3. Summary of results obtained with the *Drosophila* wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) and balancer-heterozygous (BH) progeny of the high bioactivation (HB) cross after chronic treatment of larvae with ethanolic extracts (EE) from the leaves of *N. cissiflora* and doxorubicin (DXR)

Genotypes and treatments		N° of flies	Spots per fly (number of spots) statistical diagnosis ^a				Spots with mwh clone ^c	Frequency of clone formation/10 ⁵ cells per cell division ^d		Recombination (%)	Inhibition ^e (%)
DXR (mg/mL)	EE (mg/mL)		Small single spots (1-2 cells) ^b	Large single spots (>2 cells) ^b	Twin spots	Total spots		Observed	Control corrected		
<i>mwh/flr</i> ³											
0	0	60	0.25 (15)	0.08 (05)	0.00 (00)	0.33 (20)	20	0.68			
0	0.625	60	0.58 (17)i	0.06 (02)-	0.10 (01)i	0.33 (20)-	20	0.68	0.00		
0	1.250	60	0.68 (20)i	0.10 (03)i	0.06 (02)i	0.85 (25)i	25	0.85	0.17		
0	2.500	60	0.75 (22)i	0.03 (01)-	0.00 (00)i	0.78 (23)-	23	0.78	0.10		
0.125	0	60	2.15 (129)+	5.65 (339)+	9.07 (544)+	16.87 (1012)+	16.47(988)	33.74	33.06	93.07	
0.125	0.625	60	3.73 (224)*	4.47 (268)*	8.13 (488)*	16.33 (980)	16.18(971)	33.16	32.48	95.90	
0.125	1.250	60	3.53 (212)*	3.52 (211)*	5.82 (349)*	12.87 (772)*	12.75(765)	26.12	25.44	96.22	23.04
0.125	2.500	60	2.07 (122)*	1.85 (111)*	2.62 (157)*	6.53 (392)*	6.47(388)	13.25	12.57	96.73	62.00
<i>mwh/TM3</i>											
0	0	60	0.27 (16)	0.00 (0)	†	0.27 (16)	16	0.54			
0.125	0	60	0.87 (52)+	0.52 (31)+	†	1.38 (83)+	83	2.83	2.29		
0.125	0.625	60	0.77 (46)	0.15 (09)*	†	0.92 (55)*	55	1.87	1.33		41.92
0.125	1.250	60	0.63 (38)	0.10 (06)*	†	0.73 (44)*	44	1.50	0.96		58.07
0.125	2.500	60	0.38 (23)*	0.08 (05)*	†	0.47 (28)*	28	0.95	0.41		82.09

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würzler [1988; 1995]. *U*-test, two-sided; probability levels: -, negative; +, positive; i, inconclusive; $P \leq 0.05$ vs. untreated control; *, $P \leq 0.05$ vs. DXR only.

^bIncluding rare *flr³* single spots.

^cConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^dFrequency of clone formation: clones/flies/48,800 cells (without size correction).

^eCalculated as [DXR alone – DXR + EE] / DXR alone} X 100, according to Abraham [1994].

^fBalancer chromosome *TM3* does not carry the *flr³* mutation and recombination is suppressed, due to the multiply inverted region in these chromosome.

TABLE 4. Summary of results obtained with the *Drosophila* wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) and balancer-heterozygous (BH) progeny of the standard (ST) cross after chronic treatment of larvae with ethanolic extracts (EE) from the stem of *N.cissiflora* and doxorubicin (DXR)

Genotypes and treatments		N° of flies	Spots per fly (number of spots) statistical diagnosis ^a				Spots with mwh clone ^c	Frequency of clone formation/10 ⁵ cells per cell division ^d		Recombination (%)	Inhibition ^e (%)
DXR (mg/mL)	EE (mg/mL)		Small single spots (1-2 cells) ^b	Large single spots (>2 cells) ^b	Twin spots	Total spots		Observed	Control corrected		
<i>mwh/flr³</i>											
0	0	60	0.33 (20)	0.02 (01)	0.06 (04)	0.41 (25)	25	0.85			
0	0.625	60	0.23 (14)-	0.05 (03)i	0.02 (01)-	0.30 (18)-	18	0.61	-0.24		
0	1.250	60	0.26 (16)-	0.03 (02)i	0.03 (02)i	0.33 (20)-	20	0.68	-0.17		
0	2.500	60	0.31 (19)-	0.02 (01)i	0.06 (04)i	0.40 (24)-	24	0.81	-0.04		
0.125	0	60	1.60 (96)+	2.25 (135)+	2.95 (177)+	6.80 (408)+	6.5 (390)	13.31	12.46	95.02	
0.125	0.625	60	1.52 (91)	2.28 (137)	2.88 (173)	6.68 (401)	6.6 (396)	13.69	12.84	98.13	
0.125	1.250	60	1.22 (73) *	1.52 (91)*	2.23 (134)*	4.97 (298)*	4.8 (289)	9.87	9.02	98.44	27.60
0.125	2.500	60	1.05 (63) *	1.45 (87)*	1.68 (101)*	4.18 (251)*	4.0 (251)	8.36	7.51	100.00	39.72
<i>mwh/TM3</i>											
0	0	60	0.18 (11)	0.00 (00)	†	0.18 (11)	11	0.37			
0.125	0	60	0.48 (29)+	0.00 (00)	†	0.48 (29)+	29	0.99	0.62		
0.125	0.625	60	0.25 (15)*	0.05 (03)	†	0.30 (18)	18	0.61	0.24		61.30
0.125	1.250	60	0.18 (11)*	0.07 (04)	†	0.25 (15)*	15	0.51	0.14		77.40
0.125	2.500	60	0.15 (09)*	0.03 (02)	†	0.18 (11)*	11	0.37	0.00		100.00

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würigler [1988; 1995]. *U*-test, two-sided; probability levels: -, negative; +, positive; i, inconclusive; $P \leq 0.05$ vs. untreated control; *, $P \leq 0.05$ vs. DXR only.

^bIncluding rare *flr³* single spots.

^cConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^dFrequency of clone formation: clones/flies/48,800 cells (without size correction).

^eCalculated as [DXR alone – DXR + EE) / DXR alone} X 100, according to Abraham [1994].

^fBalancer chromosome *TM3* does not carry the *flr³* mutation and recombination is suppressed, due to the multiply inverted region in these chromosome.

TABLE 5. Summary of results obtained with the *Drosophila* wing spot test (SMART) in the marker-heterozygous (MH) and balancer-heterozygous (BH) progeny of the high bioactivation (HB) cross after chronic treatment of larvae with ethanolic extracts (EE) from the stem of *N. cissiflora* and doxorubicin (DXR)

Genotypes and treatments		Nº of flies	Spots per fly (number of spots) statistical diagnosis ^a				Spots with mwh clone ^c	Frequency of clone formation/10 ⁵ cells per cell division ^d		Recombination (%)	Inhibition ^e (%)
DXR (mg/mL)	EE (mg/mL)		Small single spots (1-2 cells) ^b	Large single spots (>2 cells) ^b	Twin spots	Total spots		Observed	Control corrected		
<i>mwh/flr³</i>											
0	0	60	0.25 (15)	0.08 (05)	0.00 (00)	0.33 (20)	20	0.68			
0	0.625	60	0.58 (17)i	0.03 (02) -	0.10 (01)i	0.33 (20)-	20	0.68	0.00		
0	1.250	60	0.68 (20)i	0.05 (03) i	0.06 (02)i	0.85 (25)i	25	0.85	0.17		
0	2.500	60	0.75 (22)i	0.02 (01) -	0.00 (00)i	0.78 (23)-	23	0.78	0.10		
0.125	0	60	2.15 (129)+	5.65 (339)+	9.07 (544)+	16.87 (1012)+	988	33.74	33.06	93.07	
0.125	0.625	60	3.73 (224)	4.47 (268)*	8.13 (488)*	16.33 (980)	971	33.16	32.48	95.90	
0.125	1.250	60	3.53 (212)	3.52 (211)*	5.82 (349)*	12.87 (772)*	765	26.12	25.44	96.22	23.04
0.125	2.500	60	2.07 (122) -	1.85 (111)*	2.62 (157)*	6.53 (392)*	388	13.25	12.57	96.73	62.00
<i>mwh/TM3</i>											
0	0	60	0.27 (16)	0.00 (0)	f	0.27 (16)	16	0.54			
0.125	0	60	0.87 (52)+	0.52 (31)+	f	1.38 (83)+	83	2.83	2.29		
0.125	0.625	60	1.77 (46)	0.30 (09)*	f	1.87 (55)*	55	1.87	1.33		41.92
0.125	1.250	60	1.29 (38)	0.20 (06)*	f	1.50 (44)*	44	1.50	0.96		58.07
0.125	2.500	60	0.78 (23) *	0.17 (05)*	f	0.95 (28)*	28	0.95	0.41		82.09

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würzler [1988; 1995]. *U*-test, two-sided; probability levels: -, negative; +, positive; i, inconclusive; $P \leq 0.05$ vs. untreated control; *, $P \leq 0.05$ vs. DXR only.

^bIncluding rare *flr³* single spots.

^cConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^dFrequency of clone formation: clones/flies/48,800 cells (without size correction).

^eCalculated as [DXR alone – DXR + EE] / DXR alone} X 100, according to Abraham [1994].

^fBalancer chromosome *TM3* does not carry the *flr³* mutation and recombination is suppressed, due to the multiply inverted region in these chromosome.

APÊNDICE B

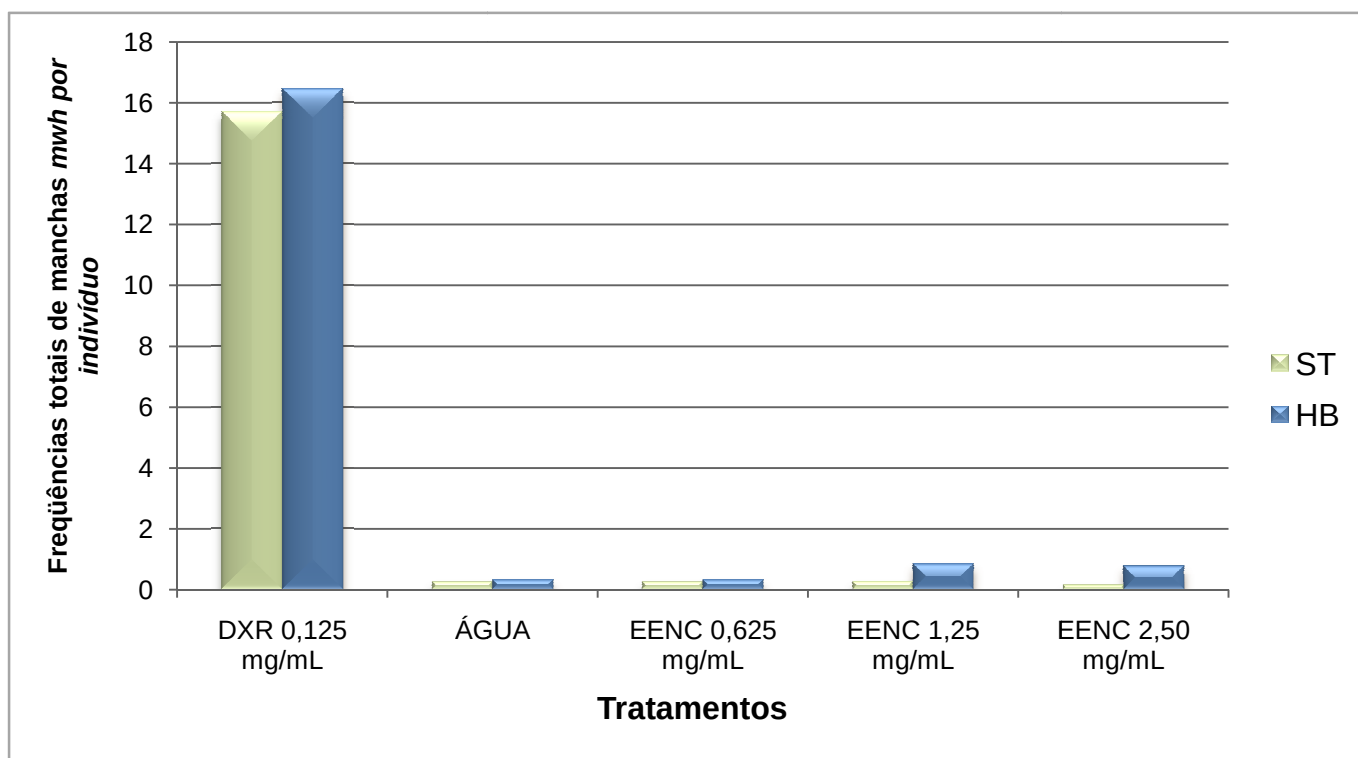


Gráfico 1: Frequências totais de manchas *mwh* observadas em células de asas de *D. melanogaster*, dos cruzamentos ST e HB, após tratamento crônico com EE obtidos de folhas da *N. cissiflora* (EENC) associado à DXR.

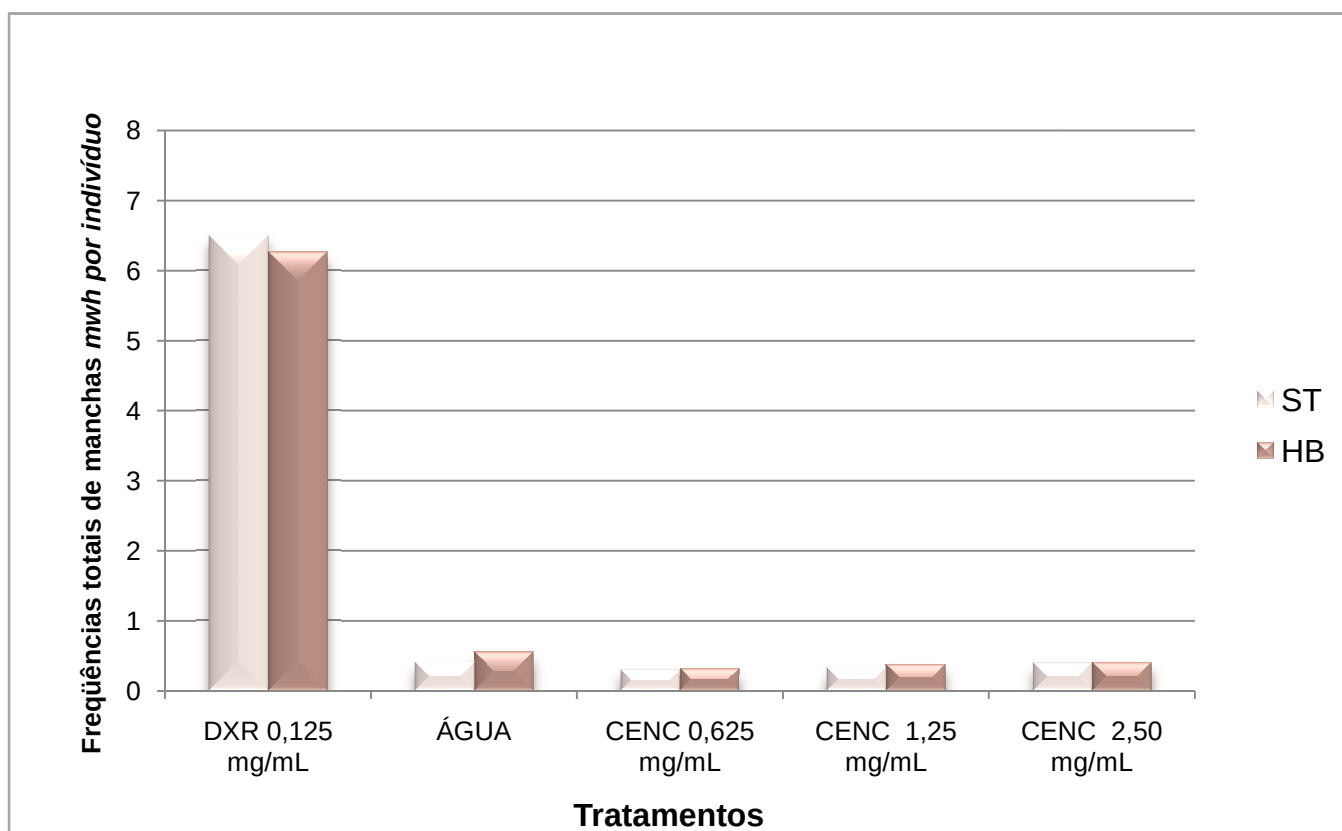


Gráfico 2: Frequências totais de manchas *mwh* em células de asas de *D. melanogaster* após tratamento crônico com EE de caule de *N. cissiflora* observadas nos cruzamentos ST e HB.

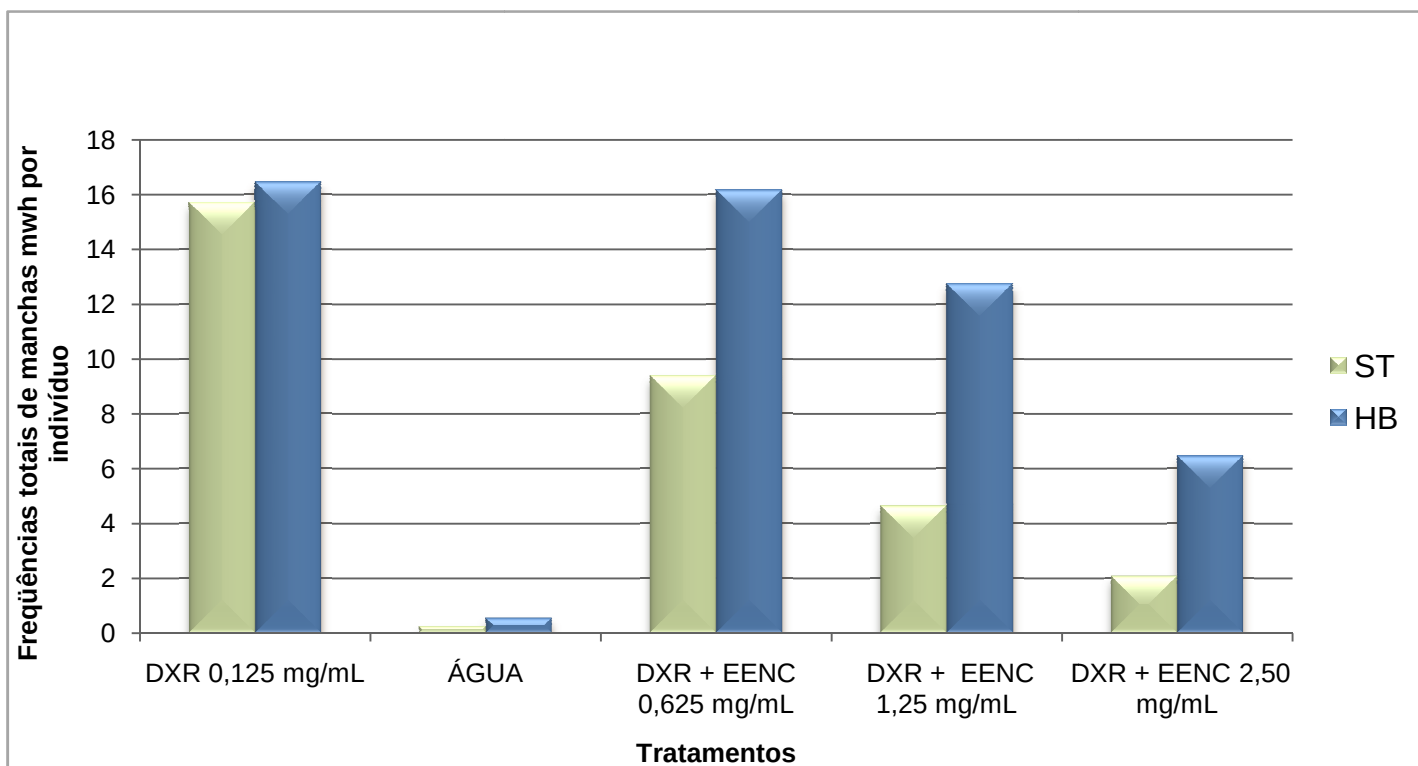


Gráfico 3: Frequências totais de manchas *mwh* observadas em células de asas de *D. melanogaster*, dos cruzamentos ST e HB, após tratamento crônico com EE obtidos de folhas da *N. cissiflora* (EENC) associado à DXR.

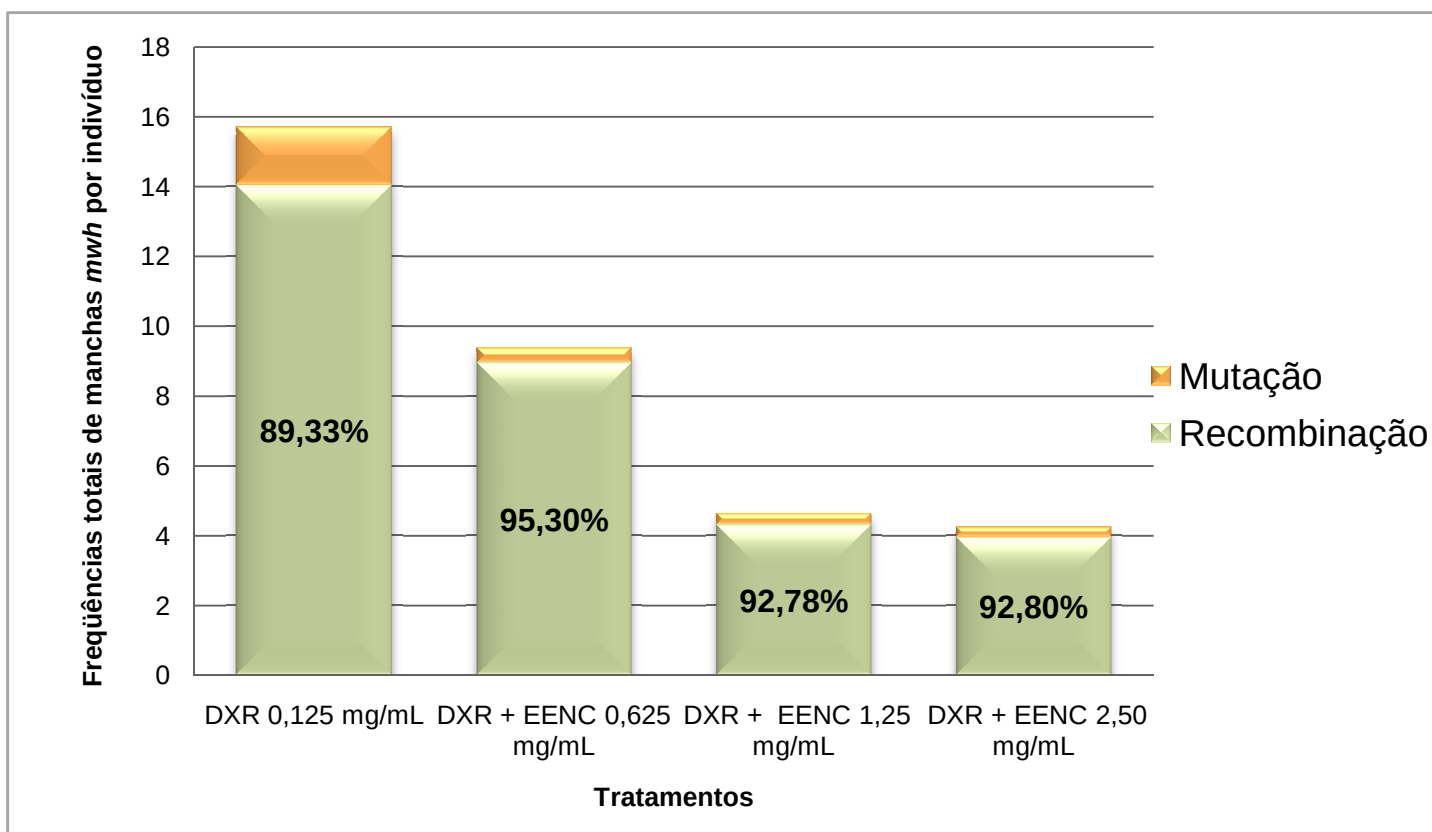


Gráfico 4: Contribuição das frequências de mutação e recombinação em relação à frequência total de manchas *mwh* por indivíduo, no cruzamento ST, após tratamento crônico com EE obtido de folhas da *N. cissiflora* (EENC) associado à DXR.

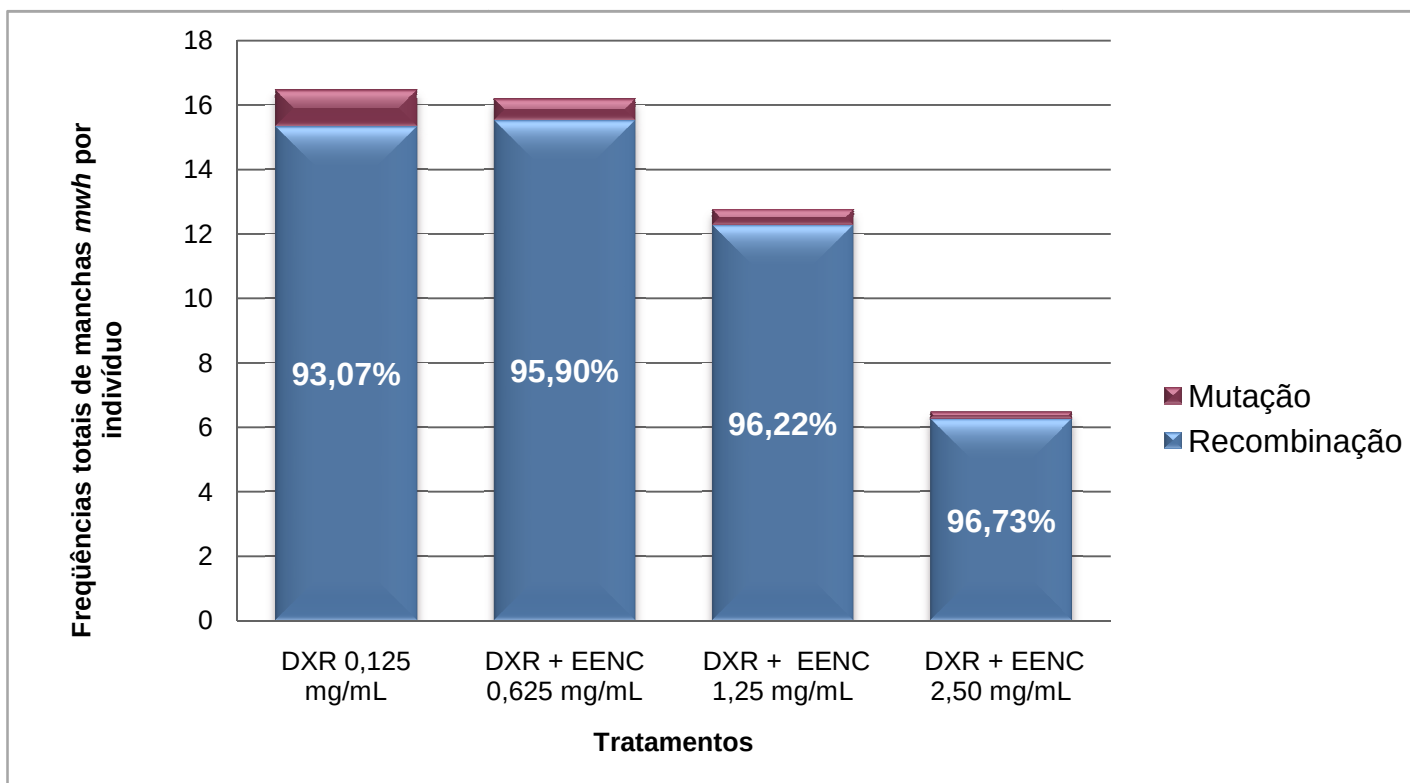


Gráfico 5: Contribuição das frequências de mutação e recombinação em relação à frequência total de manchas *mwh* por indivíduo, em células de asas de *D. melanogaster* do cruzamento HB, após tratamento crônico com EE obtido de folhas de *N. cissiflora* (EENC) associado à DXR.

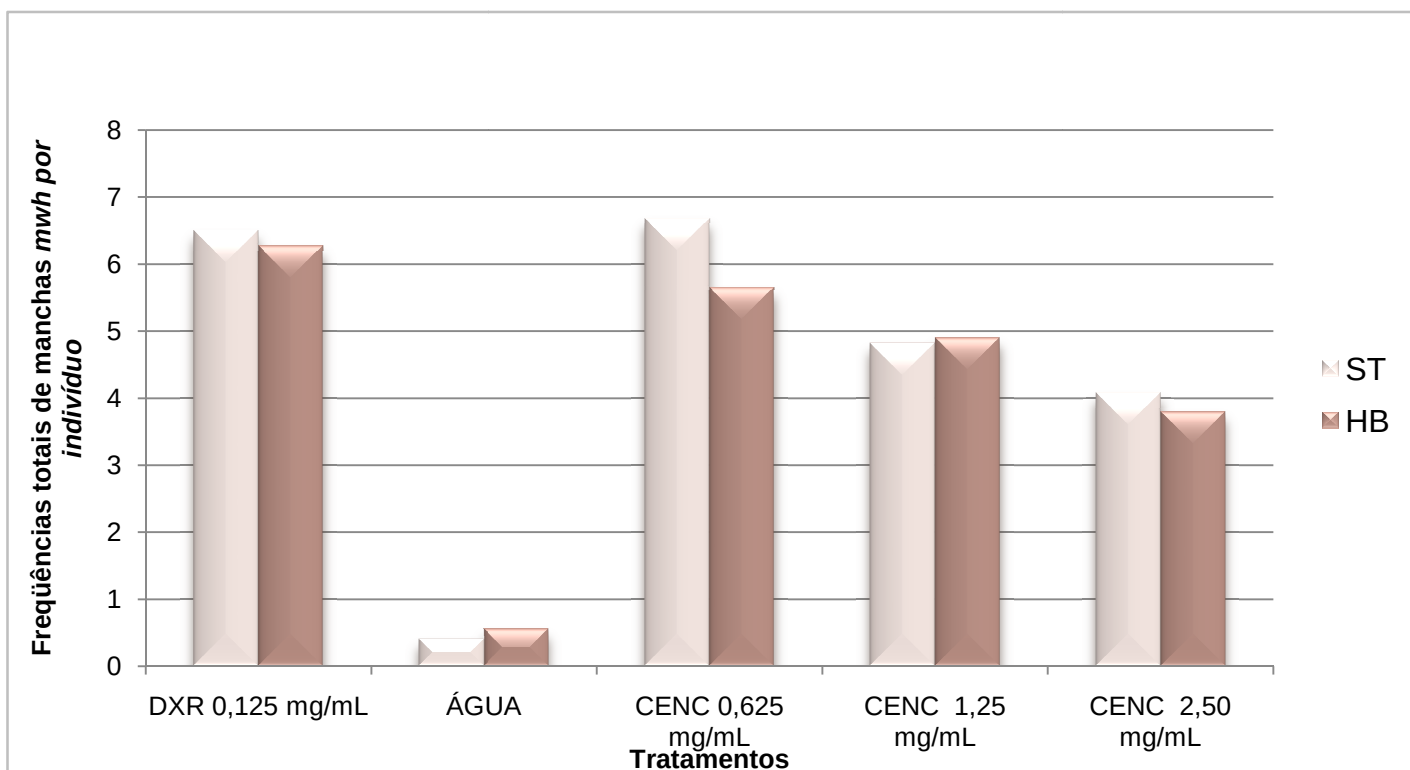


Gráfico 6: Frequências totais de manchas *mwh* observadas em células de asas de *D. melanogaster*, dos cruzamentos ST e HB, após tratamento crônico com EE de caule de *N. cissiflora* (CENC) associado à DXR.

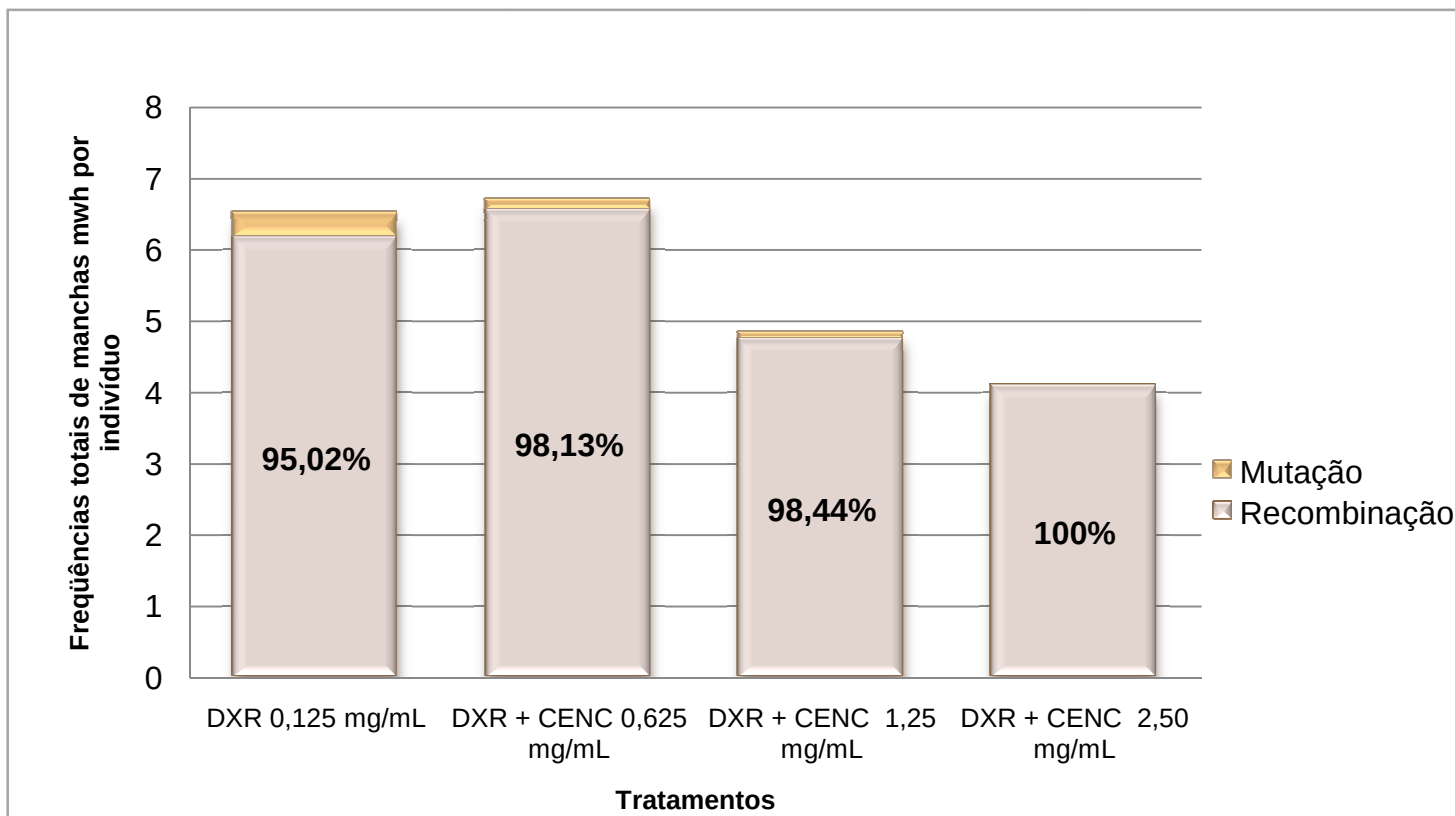


Gráfico 7: Contribuição das frequências de mutação e recombinação em relação à frequência total de manchas *mwh* por indivíduo, em células de asas de *D. melanogaster* do cruzamento ST, após tratamento crônico EE de caule de *N. cissiflora* (CENC) associado à DXR.

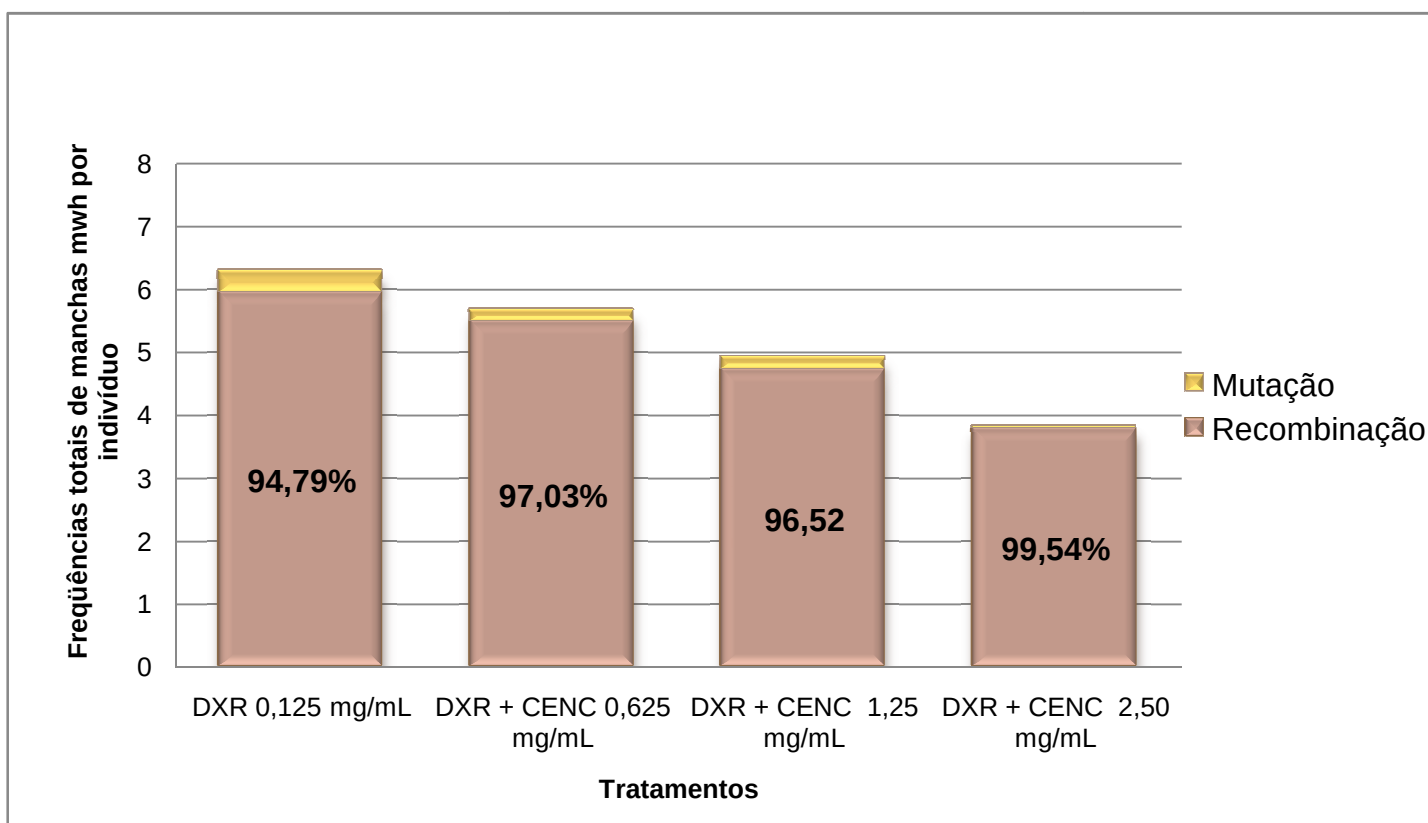


Gráfico 8: Contribuição das frequência de mutação e recombinação em relação à frequência total de manchas *mwh* por indivíduo, obtidos no cruzamento HB, após tratamento crônico com EE de caule de *N. cissiflora* (CENC) associado à DXR.

Capítulo 4

Atividade antigenotóxica de extratos etanólicos de *Ocotea minarum* (Lauraceae) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Manuscrito para Life Sciences

**Atividade antigenotóxica de extratos etanólicos de *Ocotea minarum*
(Lauraceae) em células somáticas de *Drosophila melanogaster***

Zaira da Rosa Guterres^{1, 2}, Lillian May Grespan Estodutto da Silva³, Cláudio Rodrigo Nogueira³, Walmir Silva Garcez³, Fernanda Rodrigues Garcez³, Mário Antônio Spanó^{2*}

¹Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Mundo Novo (Estado do Mato Grosso do Sul – MS), Brasil

²Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Uberlândia (Estado de Minas Gerais – MG), Brasil

³Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Departamento de Química, Campo Grande (Estado do Mato Grosso do Sul – MS), Brasil

*Autor para correspondência: Mário Antônio Spanó, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Mutagênese. Av. Pará nº 1720, Campus Umuarama, 38400-902 Uberlândia, MG, Brasil.

Tel.: +55 34 32182505.

E-mail: maspano@ufu.br

Resumo

O gênero *Ocotea* é conhecido pela produção de metabólitos secundários, tais como alcalóides benzilisoquinolínico, neolignanas e pironas. Diversas atividades biológicas são atribuídas às plantas pertencentes a este gênero, tais como antipirético, antiinflamatório, antioxidante, antimicrobiano, e preventivos contra a agregação plaquetária *in vitro*. No presente trabalho, foram avaliadas as atividades genotóxicas (mutagênicas e recombinogênicas) de extratos etanólicos (EE) obtidos de folhas e de EE obtidos de frutos da *Ocotea minarum*, utilizando-se o teste de detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) em células de asas de *Drosophila melanogaster*. Para tanto, larvas de terceiro estágio foram tratadas com soluções contendo diferentes concentrações finais 0,625; 1,25 e 2,5mg.mL⁻¹ de EE de folhas e com 0,625; 1,25 e 2,5 mg.mL⁻¹ de EE de frutos isoladamente. Uma vez comprovado a ausência de efeitos genotóxicos desses EE, os mesmos foram testados em associação com o agente antineoplásico cloridrato de doxorrubicina (DXR - 0,125 mg.mL⁻¹), para avaliação de antingenotoxicidade. A análise dos indivíduos trans-heterozigotos marcados (MH) (genótipo *mwh/flr*³) dos cruzamentos ST e HB, tratados simultaneamente com diferentes concentrações finais de EE de folhas e DXR, indica redução aproximada de 32 a 61% da genotoxicidade ocasionada pela DXR no cruzamento ST; e de 37% a 48% no cruzamento HB. Os indivíduos resultantes do cruzamento ST, tratados simultaneamente com EE de frutos e DXR, apresentaram inibição de 44% a 75% da genotoxicidade induzida pela DXR. Em conclusão, nessas condições experimentais, os EE de folhas e de frutos de *O. minarum* não apresentaram efeitos genotóxicos em células de asas de *D. melanogaster*, mas inibiram a mutagenicidade induzida pela DXR.

Palavras-chave: Genotoxicidade, Lauraceae, metabólitos secundários, somatic mutation and recombination test; SMART.

Introdução

A *Ocotea minarum* (Laurales; Lauracea) é uma planta nativa do cerrado brasileiro, pertencente ao gênero *Ocotea*, o mais expressivo das Lauraceae brasileiras, conhecido pela produção de metabólitos secundários, tais como alcalóides benzilisoquinolínico, neolignanas e pironas (Barbosa-Filho *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 2002). As espécies pertencentes a este gênero apresentam variações inter- e intra-específicas quanto à produção de metabólitos secundários (Chaverri & Cicció, 2005; Sacchetti *et al.*, 2006).

Vecchietti *et al.* (1979) isolaram quatorze alcalóides aporfínicos das folhas da *O. minarum* coletadas no Estado brasileiro de Minas Gerais. Porém, em estudos fitoquímicos das folhas de *O. minarum* coletadas em Campo Grande (Estado do Mato grosso do Sul, Brasil) foram isolados: terpenos, esteróide glicosilado (sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosídeo), lactona terpênica, norsesquiterpeno e sesquiterpenos (ácido curcumen e ácido lanceólico) (Nogueira, 2008). De frutos de *O. minarum* foram isolados: alcalóide indol (triptofol-5-O- β -D-glicopiranosídeo), cumarina escopoletina e flavonóides (taxifolina, quercetina, eriodictiol e naringenina) (Garcez *et al.*, 2005).

O gênero *Ocotea* possui o maior número de espécies medicinais utilizadas pela população nativa como anti-reumática, depurativa, tônico estomático e contra abscessos (Chaves *et al.*, 1995; Moraes, 2005). Diversas atividades biológicas são atribuídas a plantas pertencentes a este gênero, tais como efeitos antipirético, antiinflamatório, antioxidante, antimicrobiano, e preventivos contra a agregação plaquetária *in vitro* (Kurup *et al.*, 1989; Ahmed *et al.*, 2000; Tognolini *et al.*, 2006).

Alcalóides isoquinolínicos (*noraporfine*, *caaverine* e *domesticine*) isolados de *O. lancifolia* apresentaram atividade *in vitro* contra a forma promastigota de três linhagens de *Leishmania* spp (*L. braziliensis*; *L. amazonensis* e *L. donovani*) e mostraram atividade hepatotóxica em células da linhagem Hep-G2 (Fournet *et al.*, 2007).

A doxorubicina (DXR) é um agente antineoplásico mutagênico, que apresenta múltiplos mecanismos de ação, tais como produção de radicais e estresse oxidativo (Singal *et al.*, 2000), favorecendo a peroxidação lipídica (Quiles *et al.*, 1999), ocasionando injúrias oxidativas no DNA (Feinstein *et al.*, 1993),

induzindo a complexação da topoisomerase II com a hélice do DNA, ocasionando numerosas quebras de fita dupla (Filyak *et al.*, 2007).

No presente trabalho, foi avaliada a atividade genotóxica (mutagênica e recombinogênica) de extratos etanólicos (EE) obtidos de folhas e de frutos de *O. minarum*, utilizando-se o teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) em células de asas de *Drosophila melanogaster*. Uma vez comprovado a ausência de efeitos genotóxicos desses EE, os mesmos foram testados em associação com o agente antineoplásico DXR (0,125 mg.mL⁻¹), para avaliação de antigenotoxicidade. Para tanto, para a obtenção da progênie larval experimental, moscas portadoras dos marcadores genéticos recessivos *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e *flare 3* (*flr*³, 3-38,8) foram utilizadas para a realização de dois cruzamentos diferentes: 1] Cruzamento padrão (Standard cross - ST); e 2] Cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (High bioactivation cross - HB), que apresenta altos níveis constitutivos da enzima citocromo P-450, o que torna os descendentes mais sensíveis a diversos promutágenos e procarcinógenos. Este teste detecta um amplo espectro de alterações genéticas, incluindo mutação de ponto, deleção, recombinação mitótica e não-disjunção (Graf *et al.*, 1989; Graf & van Schaik, 1992), sendo mais sensível para a detecção de eventos recombinacionais (Spanó *et al.*, 2001).

Material e Métodos

Substâncias Químicas

Cloridrato de Doxorubicina (DXR) (Biorrub® - Biosintética Ltda., São Paulo, Brasil - CAS n. 23214-92-8) foi obtido do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia (MG), Brasil). Os extratos etanólicos (EE) foram produzidos no Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande (MS), Brasil. Os EE foram preparados imediatamente antes do uso, dissolvidos em uma solução de 1% tween-80 : 3% etanol em água ultra pura, obtida de um sistema MilliQ (Millipore, Vimodrone, Milan, Italy).

Estoques de *Drosophila melanogaster* e cruzamentos

O teste para detecção de mutação e recombinação somática (somatic mutation and recombination test – SMART) em células de asas de *Drosophila melanogaster*, também denominado de teste da mancha da asa, foi realizado utilizando três linhagens mutantes: 1] linhagem “multiple wing hairs” (*mwh*) com constituição genética *y; mwh jv*; 2] linhagem “flare-3” (*flr³*), com constituição genética *flr³ / In(3LR)TM3, ri p^p se^p l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*; 3] linhagem “ORR; flare-3” (ORR; *flare-3*), com constituição genética *ORR; flr³ / In(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*. Esta última linhagem possui os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem Oregon R (R), resistente ao DDT, contendo genes responsáveis por alto nível de enzimas de metabolização do tipo citocromo P(CYP)6 A2 (Graf & van Schaik, 1992).

Com estas linhagens foram realizados dois diferentes cruzamentos: 1) cruzamento padrão (ST – *standard cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens “*flr³*” (Graf *et al.*, 1984; 1989); 2) cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica (HB – *high bioactivation cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens “ORR; *flr³*” (Graf & van Schaik, 1992). Ovos dos dois cruzamentos foram coletados por 8 horas em frascos contendo uma base de ágar-ágar (4% w/v) coberta com uma camada de fermento biológico suplementado com açúcar.

Larvas de terceiro estágio de desenvolvimento (72 ± 4 h) foram lavadas com água corrente e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina. Grupos de larvas foram transferidos para frascos de vidros contendo 1,5 g de meio alternativo (purê de batata instantâneo Yoki[®]) (Yoki Alimentos S. A. – São Bernardo do Campo, SP, Brasil) rehidratado com soluções contendo diferentes concentrações finais equivalentes a (0,625; 1,25 e 2,5 mg.mL⁻¹) dos extratos, isoladamente ou em associação com DXR (0,125 mg.mL⁻¹). Como controle positivo foi utilizado o cloridrato de doxorrubicina (DXR) na concentração de 0,125 mg/mL. Como controle negativo foi utilizado o solvente (1% de Tween-80 + 3% etanol em água ultra pura).

Adultos emergentes portadores dos dois tipos de genótipos: *mwh* + / + *flr*³ (trans-heterozigoto marcado – MH) ou *mwh* + / + *TM3*, *Bd*^s (heterozigoto balanceado – BH) foram coletados e fixados em etanol 70%. As asas foram destacadas e montadas entre lâminas e lamínulas com solução de Faure e analisadas quanto a ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópio óptico de luz, com magnificação de 400x.

Análise estatística

As freqüências de cada tipo de mancha (pequenas simples, grandes simples ou gêmeas) e o as freqüências totais de manchas por mosca, de cada tratamento, foram comparadas aos pares (i.e., controle negativo versus EE; controle negativo versus controle positivo; controle positivo (DXR) isoladamente versus DXR associado a EE), de acordo com Kastenbaum & Bowman (1970), com $P = 0,05$ (Frei & Würgler, 1988; 1995). Todos os resultados inconclusivos e fracos positivos foram analisados com o teste não-paramétrico *U*-test de Mann, Whitney and Wilcoxon ($\alpha = \beta = 0.05$) (Frei & Würgler, 1995). Com base na freqüência de indução de manchas por 10^5 células, a atividade recombinogênica foi calculada como: freqüência de mutação (F_M) = freqüência de manchas observadas em moscas BH / freqüência de manchas observadas em moscas MH; freqüência de recombinação (F_R) = $1 - F_M$. Freqüência total de manchas (F_T) = total de manchas observadas nas moscas MH (considerando manchas *mwh* e *flr*³) / N°

de moscas; mutação = $F_T \times F_M$; recombinação = $F_T \times F_R$ (Santos *et al.*, 1999; Sinigaglia *et al.*, 2006).

Resultados

A avaliação genotóxica do EE obtido de folhas de *O. minarum* foi realizada por meio dos cruzamentos ST e HB.

As Tabelas 1 e 2 mostram, respectivamente, os resultados obtidos com os indivíduos MH dos cruzamentos ST e HB, tratados com soluções contendo concentrações finais (0,625; 1,25 e 2,5 mg.mL⁻¹) de EE de folhas. Verifica-se que no cruzamento ST a frequência total de manchas por indivíduo observada no controle negativo foi de 0,35, enquanto que os tratados com o EE de folhas de *O. minarum* apresentaram frequências que variaram de 0,18 a 0,22. No cruzamento HB, a frequência total de manchas por indivíduo observada no controle negativo foi de 0,57, enquanto que os tratados com o EE de folhas de *O. minarum* apresentaram frequências que variaram de 0,22 a 0,43.

O EE de folhas de *O. minarum* reduziu as frequências espontâneas de manchas induzidas em ambos os cruzamentos. Esses resultados nos permitem concluir que, nessas condições experimentais, o EE não apresenta efeitos genotóxicos diretos ou indiretos.

Diante dos resultados negativos observados no teste de genotoxicidade, foi realizada a avaliação antigenotóxica do EE de folhas de *O. minarum* contra os efeitos genotóxicos do agente antineoplásico DXR.

Os resultados observados nos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, tratados com concentração equivalente a 0,125 mg.mL⁻¹ de DXR, revelaram aumento na frequência de todas as categorias de manchas mutantes, quando comparadas com o controle negativo (Tabelas 1, 2 e 3). Uma vez observados aumentos estatisticamente significativos nas frequências de manchas mutantes nos descendentes MH, procedeu-se a análise dos descendentes BH, com o propósito de comparação de resultados para a determinação da porcentagem de manchas devidas à mutação e a porcentagem de manchas devidas à recombinação.

Os resultados da análise dos indivíduos MH dos cruzamentos ST e HB, tratados simultaneamente com EE de folhas de *O. minarum* associado à DXR, indicaram uma redução para todas as categorias de manchas, exceto manchas simples grandes, para a concentração de 0,625 mg.mL⁻¹ do cruzamento ST.

Analisando-se a porcentagem de inibição, observa-se que os EE reduziram a genotoxicidade ocasionada pela DXR de 32% a 61% para o cruzamento ST e de 37% a 48% para o cruzamento HB. Conclui-se, portanto, que a taxa de inibição foi dose-resposta.

Diante dos resultados observados com os descendentes MH resultantes dos cruzamentos ST e HB, tratados simultaneamente com EE de folhas de *O. minarum* e DXR, procedeu-se a análise dos descendentes BH. Os resultados observados mostram que houve diminuição estatisticamente significativa nas freqüências de manchas mutantes observadas nos tratados simultaneamente com EE de folhas de *O. minarum* e DXR.

Comparando-se as freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH, com as obtidas nos indivíduos BH dos cruzamentos ST e HB, tratados simultaneamente com EE de folhas de *O. minarum* e DXR, verifica-se predominante atividade recombinogênica (Tabelas 1 e 2).

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos com os indivíduos MH do cruzamento ST tratados com soluções contendo concentrações finais (0,625; 1,25 e 2,5 mg.mL⁻¹) de EE de frutos de *O. minarum*. Verifica-se que as freqüências totais de manchas por indivíduo observadas nos tratados com o EE de frutos de *O. minarum* não diferem estatisticamente da freqüência total de manchas por indivíduo observada no controle negativo. Esses resultados nos permitem concluir que, nessas condições experimentais, o EE de frutos de *O. minarum* não apresenta efeitos genotóxicos diretos.

Diante dos resultados negativos observados no teste de genotoxicidade, foi realizada a avaliação antigenotóxica do EE de frutos de *O. minarum* contra os efeitos genotóxicos da DXR.

Os resultados da análise dos indivíduos MH do cruzamento ST tratados simultaneamente com EE de frutos de *O. minarum* associado à DXR, indicaram uma redução para todas as categorias de manchas, exceto manchas simples pequenas, para a concentração de 0,625 mg.mL⁻¹. Analisando-se a porcentagem de inibição, observa-se que os EE reduziram a genotoxicidade ocasionada pela DXR de aproximadamente 45% a 75%. Conclui-se, portanto, que a taxa de inibição foi dose-resposta.

Diante dos resultados observados com os descendentes MH resultantes do cruzamento ST, tratados simultaneamente com EE de frutos de *O. minarum* e DXR, procedeu-se a análise dos descendentes BH. Os resultados observados mostram que houve diminuição dose-dependente estatisticamente significativa nas frequências totais de manchas mutantes.

Comparando-se as frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH, com as obtidas nos indivíduos BH tratados simultaneamente com EE de frutos de *O. minarum* e DXR, verificou-se uma predominante atividade recombinogênica (aproximadamente de 86% a 93%).

Os resultados observados permitem sugerir que, nessas condições experimentais o EE de folhas e o EE de frutos de *O. minarum* não possuem efeitos genotóxicos, mas inibem a ação genotóxica da DXR.

Discussão

De EE de folhas de *O. minarum* foram isolados β -sitosterol, terpenos, lactonas terpênicas, norsesquiterpeno e sesquiterpenos. Dos compostos isolados supracitados são atribuídas atividades citotóxicas e apoptóticas em culturas de células, apenas para os sesquiterpenos e lactonas sesquiterpênicas.

De acordo com Hibasami *et al.* (2003), os sesquiterpenos (*costunolide* e *zaluzanin D*) isolados do *Laurus nobilis* (Lauraceae) induziram apoptose em células leucêmicas (HL-60). Em prévios estudos realizados (Park *et al.*, 2002; Dirsch *et al.*, 2001a, b; Wen *et al.*, 2002), foi demonstrado que as lactonas sesquiterpênicas *costunolide*, *helenalin* e *parthenolide* são citotóxicas e induzem apoptose, mediada pelo estresse oxidativo, em células T leucêmicas. Entretanto, não foram encontrados dados na literatura sobre a atividade biológica dos sesquiterpenos (ácido curcumen e ácido lanceólico) isolados do EE de folhas da *Ocotea minarum*.

No presente trabalho, o EE de folhas de *O. minarum* não apresentou efeitos genotóxicos, o que pode ser atribuído às baixas concentrações de sesquiterpenos e de lactonas sesquiterpênicas, ou à estrutura química destes compostos. De acordo com Heinrich *et al.* (1998), lactonas sesquiterpênicas fazem parte de um grande grupo de metabólitos secundários de plantas, com diversas estruturas químicas, as quais apresentam diversas atividades biológicas, tais como atividades anti-neoplásica e efeito cito-protetor em células gástricas (Robles *et al.*, 1995; Penissi *et al.*, 1998).

Porém, quando EE obtidos de folhas da *Ocotea lancifolia* (dados não mostrados), foram avaliados com o SMART (cruzamentos ST e HB), tratados com concentrações equivalentes a 0,625; 1,25 ou 2,5 mg.mL⁻¹, apresentaram atividade genotóxica dose dependente em ambos os cruzamentos. Estes resultados são atribuídos aos alcalóides isoquinolínicos (leucoxina, n-óxido ocoteína, ocoteína e dicentrina), componentes majoritários deste extrato (¹Silva, comunicação verbal).

¹SILVA, A. F. G. Comunicação pessoal. 2008 (Departamento de Química da UFMS, Curso de Pós-Graduação em Química, Campo Grande, Mato Grosso do Sul).

Extratos de *Ocotea leucoxylon* mostraram atividade seletiva típica de inibidores da enzima topoisomerase I, em ensaios com levedura, para agentes que danificam o DNA. Os compostos bioativos deste extrato foram isolados e identificados como os alcalóides aporfínicos dicentrinona e dicentrina. Estudos bioquímicos com topoisomerase I recombinante indicam que a dicentrinona e dicentrina são inibidores desta enzima (Zhou *et al.*, 2000).

No presente trabalho, o EE de frutos de *O. minarum* também não apresentou efeitos genotóxicos. Deste extrato foram isolados o alcalóide indol (triptofol), a cumarina, e diferentes flavonóides (taxifolina, quercetina, eriodictiol e naringenina). Estes dados revelam que existe uma diferença inter específica quanto à atividade genotóxica de extratos obtidos de plantas do gênero *Ocotea*, relacionados aos diferentes metabólitos secundários encontrados em cada espécie.

A DXR induziu elevadas freqüências de manchas mutantes, devidas preponderantemente à recombinação mitótica. Esses resultados estão de acordo com os encontrados em trabalhos preliminares (Lehmann *et al.*, 2003; Fragiorge *et al.*, 2007; Valadares *et al.*, 2008), e devem estar relacionados com o mecanismo de ação da DXR, uma vez que sua estrutura química favorece a geração de radicais livres, os quais ocasionam danos no DNA, além de formar complexos, induzindo quebras de fita dupla (Keizer *et al.*, 1990). De acordo com Spencer *et al.* (2008), a recombinação homóloga é o principal mecanismo usado pelas células para reparar quebras de fita dupla de DNA.

Os EE de frutos modularam os efeitos mutagênicos da DXR, mas não inibiram os eventos de recombinação. Os mecanismos celulares, e os constituintes ativos do EE de frutos, responsáveis pela diminuição dos danos do DNA causados pela DXR, não são conhecidos, mas é possível especular que o EE pode ter protegido as células, de quebras de fita do DNA induzidos pelos radicais livres produzidos pela DXR, pela ação dos flavonóides (*taxifolina*, *eriodictiol*, *naringenina* e *quercetina*) presentes neste extrato, uma vez que este extrato apresentou atividade antioxidante pelo método DPPH (dados não mostrados).

Os flavonóides são metabólitos secundários de plantas que exibem diversas atividades biológicas, tais como atividades anti-hepatotóxica, anti-

alérgica, anti-inflamatória, anticarcinogênica e antimutagênica. Essas funções freqüentemente são atribuídas às suas atividades antioxidantes e seqüestradoras de radicais livres (Agullo *et al.*, 1997; Shih *et al.*, 2000).

Muitos flavonóides também são conhecidos por modular as enzimas de metabolização de xenobióticos (Guengerich *et al.*, 1995; Obermeier *et al.*, 1995). Estudos com os flavonóides *tangeretina*, *naringenina* e *naringina* têm demonstrado que estes flavonóides podem modular a genotoxicidade induzida por xenobióticos em fígado de ratos (Siess *et al.*, 1995). Outros estudos têm demonstrado que estes flavonóides podem modular a atividade da CYP (P450) em células de fígado de rato e fígado humano (Obermeier *et al.*, 1995).

A *naringenina* eleva a síntese de RNAm da catalase, superóxido dismutase e da glutathione peroxidase em coelhos (Jeon *et al.*, 2001, 2002); seqüestra os radicais livres superóxido e hidroxila (Yuting *et al.*, 1990); protege contra danos induzidos pela radiação (Jagetia *et al.*, 2003), e contra a indução de micronúcleos induzidos pela ifosfamida em células de medula óssea de camundongos (Álvarez-González *et al.*, 2001).

Dos EE de frutos também foi isolada a quercetina. De acordo com Duthie *et al.* (1997), os flavonóides quercetina e *myricetina* reduziram os danos no DNA de linfócitos humanos induzidos pelo peróxido de hidrogênio, sendo que a quercetina foi mais efetiva em inibir as quebras no DNA, e também protegeu contra os danos oxidativos das bases pirimidinas. A quercetina diminui a mutagenicidade associada com os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (*benzo[a]pyrene* e *dimethylbenz[a]anthracene*), provavelmente pela inibição da ativação metabólica mediada pelo citocromo P450 ou pela indução da detoxificação (Middleton & Kandaswami, 1993).

O efeito antigenotóxico observado no EE de frutos pode ser atribuído a outros mecanismos, tais como indução de reparo do DNA. Esta função é atribuída à quercetina, flavonóide encontrado neste extrato (Ramos *et al.*, 2008). Estudos realizados por Kong *et al.*, (2000) indicam que os flavonóides interagem intracelularmente com proteínas envolvidas na cascata de sinal intracelular ou por regular a expressão de genes da via das caspases na indução de apoptose. Os flavonóides podem modular a expressão gênica e a interação com as vias de sinalização celular (Soobrattee *et al.*, 2005), modular o sistema de reparo (De

Flora, 1998; Collins *et al.*, 2003), reduzindo assim a ação genotóxica da DXR. A ação sinérgica dos compostos encontrados no EE de frutos também não está descartada.

A atividade antigenotóxica observada com o EE de folhas foi menor do que a observada com o EE de frutos. Tal fato deve-se, provavelmente, por este extrato não possuir atividade antioxidante. Portanto, a atividade antigenotóxica deve ser atribuída a outros mecanismos de ação presentes em seus constituintes, tais como terpenos e sesquiterpenos. Lam & Zheng (1991) relataram que terpenos isolados do cravo da Índia exibem alta atividade de indução da enzima GST em camundongos. O incremento da atividade das enzimas de detoxificação está associado com a inibição da carcinogênese. Os terpenos e seus derivados são utilizados na prevenção e terapia de diversas doenças, incluindo o câncer. Terpenos tais como *d-Limonene* e o álcool *perillyl* inibem de modo dose dependente, o desenvolvimento do câncer de mama, fígado, pele, pulmão, cólon, estômago e pâncreas (Paduch *et al.*, 2007). Enquanto que os sesquiterpenos protegem contra o estresse oxidativo, o *linalool* apresenta atividade contra um amplo espectro de células cancerosas, especialmente células de carcinoma cervical (Cherng *et al.*, 2007).

Em conclusão, o presente estudo indica que os EE de folhas e frutos de *O. minarum* possuem atividade antigenotóxica no teste SMART. O provável mecanismo de ação do EE (desmutagênico ou bioantimutagênico), bem como os constituintes químicos responsáveis pela antigenotoxicidade, não foram elucidados, considerando que os EE utilizados contêm uma mistura complexa de metabólitos secundários. Portanto, a atividade antigenotóxica observada pode estar relacionada com o efeito sinérgico dos metabólitos secundários terpenos e seus derivados, no EE de folhas, e os flavonóides, triptofol e cumarina, no EE de frutos, os quais podem ter efeito antioxidante, modular a atividade das enzimas de fase I e II ou atuar sobre o sistema de reparo, e modular a expressão gênica.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS) e às agências brasileiras de fomento à pesquisa CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Referências

- Agullo, G., Gamet-Payrastre, L., Manenti, S., Viala, C., Remesy, C., Chap, H., Payrastre, B., 1997. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochemical Pharmacology* 53 (11), 1649–1657.
- Ahmed, M., Amin, S., Islam, M., Takahashi, M., Okuyama, E., Hossain, C.F., 2000. Analgesic principle from *Abutilon indicum*. *Pharmazie* 55 (4), 314-316.
- Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E., Dorado, V., Espinosa-Aguirre, J.J., 2001. Inhibitory effect of naringin on the micronuclei induced by ifosfamide in mouse and evaluation of its modulatory effect on the CYP3A subfamily. *Mutation Research*, 480/481 (1), 171–178.
- Barbosa-Filho, J.M., Yoshida, M., Gottlieb, O.R., 1989. Lignoids from *Nectandra amazonum* and *N. glabrescens*. *Phytochemistry* 28 (7), 1991-1996.
- Chaverri, C., Cicció, J.F., 2005. Essential oil of trees of the genus *Ocotea* (Lauraceae) in Costa Rica. I. *Ocotea brenesii*. *Revista de Biología Tropical* 53 (3-4), 431- 436.
- Chaves, J.P., Gottlieb, O.R., Yoshida, M., 1995. 10-desmethyl-1-methyleudesmanes from *Ocotea corymbosa*. *Phytochemistry* 39 (4), 849-852.
- Cherng, J.M., Shieh, D.E., Chiang, W., Chang, M.Y., Chiang, L.C., 2007. Chemopreventive effects of minor dietary constituents in common foods on human cancer cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71(6), 1500–1504.
- Collins, A.R., Harrington, V., Drew, J., Melvin, R., 2003. Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study. *Carcinogenesis* 24 (3), 511–515.

- De Flora, S., 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research* 402 (1-2), 151–158.
- Dirsch, V.M., Stuppner, H., Vollmar, A.M., 2001a. Cytotoxic sesquiterpene lactones mediate their death-inducing effect in leukemia T cells by triggering apoptosis. *Planta Medica* 67 (5), 557– 559.
- Dirsch, V.M., Stuppner, H., Vollmar, A.M., 2001b. Helenalin triggers a CD95 death receptor-independent apoptosis that is not affected by overexpression of Bcl-x(L) or Bcl-2. *Cancer Research* 61 (1), 5817– 5823.
- Duthie, S.J., Collins, A.R., Duthie, G.G., Dobson, V.L., 1997. Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage strand breaks and oxidized pyrimidines in human lymphocytes. *Mutation Research* 393 (3), 223–231
- Feinstein, E., Canaani, E., Weiner, L.M., 1993. Dependence of nucleic acid degradation on in situ free-radical production by adriamycin. *Biochemistry* 32 (48), 13156-13161.
- Filyak, Y., Filyak, O., Stoika, H., Rostyslav, R., 2007. Transforming growth factor beta-1 enhances cytotoxic effect of doxorubicin in human lung adenocarcinoma cells of A549 line. *Cell Biology International* 31(8), 851- 855.
- Fournet, A., Ferreira, M.H., Arias, A.R., Guy, I., Guinaudeau, H., Heinzen, H., 2007. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia* 78 (5), 382-384.
- Fragiorge, E.J., Spanó, M.A., Antunes, L.M.G., 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 (2), 449-455.

- Frei, H., Würgler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research* 203 (44), 297–308.
- Frei, H., Würgler, F.E., 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research* 334 (2), 247-258.
- Garcez, W.S., Garcez, F.R., Silva, L.M.G.E., Shimabukuro, A., 2005. Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. *Journal Brazilian Chemical Society* 16 (6B), 1382-1386.
- Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., Kale, P.G., 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Mutagenesis* 6, 153-188.
- Graf, U., Frei, H., Kägi, A., Katz, A.J., Würgler, F.E., 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test, *Mutation Research* 222 (44), 359–373.
- Graf, U., van Schaik, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 271 (11), 59–67.
- Guengerich, F.P., 1995. Influence of nutrients and other dietary materials on cytochrome P-450 enzymes. *American Journal of Clinical Nutrition* 61 (1), 651S–658S.
- Heinrich, M., Robles, M., West, J.E., Ortiz, B.R., 1998. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (compositae). *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology* 58 (1) 539-565.
- Hibasami, H., Yamada, Y., Moteki, H., Katsuzaki, H., Imai, K., Yoshioka, K., Komiya, T., 2003. Sesquiterpenes (costunolide and zaluzanin D) isolated from

- laurel (*Laurus nobilis* L.) induce cell death and morphological change indicative of apoptotic chromatin condensation in leukemia HL-60 cells. *International Journal of Molecular Medicine* 12 (2), 147–151.
- Jagetia, G.C., Venkatesha, V.A., Reddy, T.K., 2003. Naringin, a citrus flavonone, protects against radiation-induced chromosome damage in mouse bone marrow. *Mutagenesis* 18 (4), 337–343.
- Jeon, S.M., Bok, S.H., Jang, M.K., Kim, Y.H., Nam, K.T., Jeong, T.S., Park, Y. B., Choi, M.S., 2002. Comparison of antioxidant effects of naringin and probucol in cholesterol-fed rabbits. *Clinica Chimica Acta* 317 (1-2), 181–190.
- Jeon, S.M., Bok, S.H., Jang, M.K., Lee, M.K., Nam, K.T., Park, Y.B., Rhee, S. J., Choi, M.S., 2001. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *Life Sciences* 69 (24), 2855–2866.
- Kastenbaum MA, Bowman KO., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research* 9 (1) 527-549.
- Keizer, H.G., Pinedo, H.M., Schuurhuis, G.J., Joenje, H., 1990. Doxorubicin (Adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity, *Pharmacology & Therapeutics* 47 (2), 219–231.
- Kong, A.N., Yu, R., Chen, C., Mandlekar, S., Primiano, T., 2000. Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Archives of Pharmacal Research* 23 (1), 1–16.
- Kurup, A., Kumar, A. V., Rao, M.N., 1989. Antiinflammatory activity of cinnamic acids. *Pharmazie* 44 (12), 870-874.

- Lam, L.K.T., Zheng, B., 1991. Effects of essential oils on glutathione S-transferase activity in mice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 39 (1), 660-667.
- Lehmann, M., Vilar, K.S.P., Franco, A., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 2004. Activity of topoisomerase inhibitors daunorubicin, idarubicin, and aclarubicin in the *Drosophila* Somatic Mutation and Recombination Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 43 (4), 250-257.
- Middleton, E., Kandaswami, C., 1993. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer, in: J.B. Harborne_Ed., *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*, Chapman and Hall, 1993.
- Moraes, P.L.R., 2005. Sinopse das Lauraceas nos Estados de Goiás e Tocantins, Brasil. *Biota Neotrópica* 5 (2), 1-18.
- Nogueira, C.R., 2007. Sesquiterpenos das Folhas de *Ocotea minarum* (Meissn) Mez. (Lauraceae). Monografia. UFMS, Departamento de Química.
- Obermeier, M.T., White, R.E., Yang, C.S., 1995. Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Xenobiotica* 25 (6), 575–584.
- Paduch, R. Kandefer-Szerszen, M., Trytek, M., Fiedurek, J., 2007. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae Therapiae Experimentalis* 55(5) 315-327.
- Park, E.J., Pezzuto, J.M., 2002. Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews* 21 (3-4), 231–255.
- Penissi, A.B., Fogal, T., Guzmán, J.A, Piezzi, R.S., 1998. Gastroduodenal mucosal protection induced by dehydroleuccodine. Mucus secretion and role of monoamines. *Digestive Diseases and Science* 43 (1), 791-798.

- Quiles, J.L., Ramírez-Tortosa, M.C., Huertas, J.R., Ibáñez, S., Gómez, J.A., Battino, M., Mataix, J., 1999a. Olive oil supplemented with vitamin E affects mitochondrial coenzyme Q levels in liver of rats after an oxidative stress induced by adriamycin. *Biofactors* 9 (2-4), 331-336.
- Ramos, A.A., Lima, C.F., Pereira, M.L., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C., 2008. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: Evaluation by the comet assay. *Toxicology Letters* 177 (1), 66–73.
- Robles, M., Aregullin, M., West, J., 1995. Recent studies on the zoopharmacognosy and neurotoxicology of sesquiterpene lactone. *Planta Medica* 61 (1), 199-203.
- Sacchetti, G., Guerrini, A., Noriega, P., Bianchi, A., Bruni, R., 2006. Essential oil of wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) leaves from Amazonian Ecuador. *Flavour and Fragrance Journal* 21 (4), 674-676.
- Sánchez-Lamar, A., Fiore, M., Cundari, E., Ricordy R., Cozzi, R., De Salvia, R., 1999. *Phyllanthus orbicularis* aqueous extract: cytotoxic, genotoxic, and antimutagenic effects in the CHO cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 161(3), 231-239.
- Santos, J.H., Graf, U., Reguli, M.L., Andrade, H.H.R., 1999. The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 444, 355-365.
- Shih, H., Pickwell, G.V., Quattrochi, L.C., 2000. Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. *Archives of Biochemistry Biophysics* 373 (1), 287–294.

- Siess, M.H., Leclerc, J., Canivenclavier, M.C., Rat, P., Suschetet, M., 1995. Heterogenous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 130 (1), 73–78.
- Silva, I.G., Barbosa-Filho, J.M., Silva, M.S., Lacerda, C.D.G., Cunha, E.V.L., 2002. Coclaurine from *Ocotea duckei*. *Biochemical Systematics and Ecology* 30 (9), 881-883.
- Singal, P.K., Li, T., Kumar, D., Danelisen, I., Iliskovic, N., 2000. Adriamycin-induced heart-failure: mechanism and modulation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 207 (1-2), 77-85.
- Sinigaglia, M., Lehmann, M., Baumgardt, P., Amaral, V.S., Dihl, R.R., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 2006. Vanillin as a modulator agent in SMART test: Inhibition in the steps that precede N-methyl-N-nitrosourea-, N-ethyl-N-nitrosourea-, ethylmethanesulphonate- and bleomycin-genotoxicity. *Mutation Research*, 607, 225-230.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T., 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research* 579 (1-2), 200-213.
- Spanó, M.A., Frei, H., Würgler, .E., Graf, U., 2001. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* 16 (5), 385-394.
- Spencer, D.M.S., Bilardi, R.A., Koch, T.H., Post, G.C., Nafie, J.W., Kimura, K.I., Cutts, S.M., Phillips, D.R., 2008. DNA repair in response to anthracycline–DNA adducts: A role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Mutation Research* 638 (1-2), 110-121.

- Tognolini, M., Barocelli, E., Ballabeni, V., Bruni, R., Bianchi, A., Chiavarini, M., 2006. Comparative screening of natural essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sciences* 78 (13), 1419-1432.
- Valadares, B.L.B., Graf U., Spanó M.A., 2008. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol* 46, 1103-1110.
- Vecchietti, V., Casagrande, C., Ferrari, G., Severini Ricca, G., 1979. New aporphine alkaloids of *Ocotea minarum*. *Farmaco-Ed. Sciences* 34(2), 829-840.
- Wen, J., You, K.R., Lee, S.Y., Song, C.H., Kim, D.G., 2002. Oxidative stress-mediated apoptosis: the anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (41), 38954– 38964.
- Yuting C, Rongliang Z, Zhongjian J, Yong J., 1990. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 9(1), 19-21.
- Zhou, B., Johnson, R.K., Mattern, M.R., Wang, X., Hecht, S.M., Beck, H.T., Ortiz, A., Kingston, D.G.I., 2000. Isolation and Biochemical Characterization of a New Topoisomerase I Inhibitor from *Ocotea leucoxydon*. *Journal of Natural Products* 63 (1), 217-221

TABLE 1. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) e heterozigoto balanceado (BH) de *D. Melanogaster* do cruzamento padrão (ST) após tratamento crônico com extrato etanólico (EE) de folhas de *O. minarum* e DXR.

Genótipos e tratamentos		Manchas por indiv. (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a					Total manchas mwh ^c	Frequência de formação de clones /10 ⁵ céls por divisão céls ^d		Recombinação (%)	Inibição ^e (%)
DXR (mg.mL ⁻¹)	EE (mg.mL ⁻¹)	Nº indiv.	MSP (1-2 céls) ^b	MSG (>2 céls) ^b	MG	T M		Observado	Controle corrigido		
<i>mwh/flr³</i>											
0	0	60	0,30 (18)	0,05 (03)	0,00 (00)	0,35 (21)	21	0,71			
0	0,625	60	0,18 (11) -	0,02 (01) i	0,02 (00) i	0,22 (13) -	13	0,44	-0,27		
0	1,250	60	0,15 (09) -	0,03 (02) i	0,00 (00) i	0,18 (11) -	11	0,37	-0,34		
0	2,500	60	0,20 (12) -	0,02 (01) i	0,00 (00) i	0,22 (13) -	13	0,44	-0,27		
0,125	0	60	1,60 (96)+	2,55 (135)+	2,95 (177)+	6,80 (408)+	390	13,31	12,60	94,60	
0,125	0,625	60	0,92 (55)*	1,83 (110) -	1,93 (116)*	4,68 (281)*	272	9,28	8,57	98,48	32,00
0,125	1,250	60	0,55 (33) *	1,57 (94)*	1,87 (112)*	3,98 (239)*	225	7,68	6,97	97,41	44,68
0,125	2,500	60	0,78 (47) *	0,90 (54)*	1,15 (69)*	2,83 (170)*	165	5,63	4,92	97,76	60,95
<i>mwh/TM3</i>											
0	0	40	0,28 (11)	0,05 (02)		0,33 (13)	13	0,32			
0,125	0	40	0,90 (36)+	0,10 (04)i		1,00 (40)+	40	1,00	0,68		
0,125	0,625	40	0,40 (16)+	0,05 (02)i		0,45 (18)+	18	0,45	0,13		
0,125	1,250	40	0,35 (14)+	0,15 (06)i		0,50 (20)+	20	0,50	0,18		
0,125	2,500	40	0,35 (14)+	0,08 (03)i		0,43 (17)+	17	0,43	0,11		

Indivíduos trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) e heterozigoto balanceado (*mwh/TM3*).

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei and Würzler [1988; 1995]. *U*-test, bi-caudal; Diagnóstico estatístico: -, negativo; +, positivo; i, inconclusivo; $P \leq 0,05$ vs. controle negativo; * $P \leq 0,05$ vs DXR.

^b Incluindo manchas simples *flr³* raras.

^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as gêmeas.

^d Frequência de formação de manchas: manchas/moscas/48.800 células (sem correção).

^e Calculado por [DXR isolado – DXR + EE] / DXR isolado] X 100, de acordo com Abraham [1994].

^f Devido à presença de inversões múltiplas no cromossomo balanceador, as células resultantes de recombinação mitótica são inviáveis.

TABLE 2. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) e heterozigoto balanceado (BH) de *D. Melanogaster* do cruzamento padrão (HB) após tratamento crônico com extrato etanólico (EE) de folhas de *O. minarum* e DXR.

Genótipos e tratamentos		Nº Indiv.	Manchas por indiv. (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Total de manchas <i>mwh</i> ^c	Frequência de formação de clone /10 ⁵ cells por divisão ^d		Recombinação (%)	Inibição ^e (%)
DXR (mg/mL)	EE (mg/mL)		MSP (1-2 céls) ^b	MSG (>2 céls) ^b	MG	TM		Observado	Controle corrigido		
<i>mwh/flr³</i>											
0	0	60	0.52 (31)	0.03 (02)	0.02 (01)	0.57 (34)	33	1.12			
0	0.625	60	0.37 (22)-	0.05 (03)i	0.02 (01)i	0.43 (26)-	26	0.88	-0.24		
0	1.250	60	0.23 (14)-	0.00 (00)i	0.02 (01)i	0.25 (15)-	15	0.51	-0.61		
0	2.500	60	0.20 (12)-	0.02 (01)i	0.00 (00)i	0.22 (13)-	13	0.44	-0.68		
0.125	0	60	1.25 (75)+	2.25 (135)+	3.10 (186)+	6.60 (396)+	376	12.84	11.72	91.72	
0.125	0.625	60	0.95 (57)	1.47 (88)*	1.93 (116)*	4.35 (261)*	249	8.50	7.38	88.61	37.00
0.125	1.250	60	0.58 (35)*	1.55 (93)*	2.10 (126)*	4.23 (254)*	242	8.26	7.14	92.00	39.00
0.125	2.500	60	0.78 (47)*	1.03 (62)*	1.82 (109)*	3.63 (218)*	212	7.24	6.12	92.32	47.78
<i>mwh/TM3</i>											
0	0	40	0.28 (11)	0.05 (02)		0.33 (13)	13	0.33			
0.125	0	40	1.08 (43)+	0.23 (09)+		1.30 (52)+	52	1.30	0.97		
0.125	0.625	40	1.10 (44)-	0.10 (04)i		1.20 (48)-	48	1.20	0.87		
0.125	1.250	40	0.80 (32)i	0.10 (04)i		0.90 (36)i	36	0.90	0.57		
0.125	2.500	40	0.80 (32)i	0.00 (00)+		0.80 (32)+	32	0.80	0.47		

Indivíduos trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) e heterozigoto balanceado (*mwh/TM3*).

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei and Würzler [1988; 1995]. *U*-test, bi-caudal; Diagnóstico estatístico: -, negativo; +, positivo; i, inconclusivo; $P \leq 0,05$ vs. controle negativo; * $P \leq 0,05$ vs DXR.

^b Incluindo manchas simples *flr³* raras.

^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as gêmeas.

^d Frequência de formação de manchas: manchas/moscas/48.800 células (sem correção).

^e Calculado por [DXR isolado – DXR + EE] / DXR isolado] X 100, de acordo com Abraham [1994].

^f Devido à presença de inversões múltiplas no cromossomo balanceador, as células resultantes de recombinação mitótica são inviáveis.

Tabela 3. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST) após tratamento crônico com extrato etanólico (EE) de frutos de *O. minarum* e doxorubicina (DXR)

Genótipos e tratamentos		Nº indiv.	Manchas por indiv. (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Total manchas <i>mwh</i> ^c	Frequência de formação de clones de clones /10 ⁵ céls por divisão cel ^d		Recombinação (%)	Inibição ^e (%)
DXR (mg/mL)	EE (mg/mL)		MSP (1-2 céls) ^b	MSG (>2 céls) ^b	MG	T M		Observado	Controle corrigido		
<i>mwh/flr³</i>											
0	0	40	0,53 (21)	0,08 (03)	0,05 (02)	0,65 (26)	26	1,33			
0	0,625	40	0,50 (20)	0,03 (01) i	0,05 (02) i	0,58 (23) -	23	1,17	-0,16		
0	1,250	40	0,55 (22)	0,05 (02) i	0,03 (01) i	0,63 (25) i	25	1,28	-0,05		
0	2,500	40	0,53 (21)	0,08 (03) i	0,00 (00) i	0,60 (24) -	24	1,23	-0,10		
0,125	0	40	1,78 (71)+	4,58 (183)+	7,05 (282)+	13,40 (536)+	12,88(515)	26,38	25,05	90,37	
0,125	0,625	40	1,75 (70)	2,28 (91)*	3,55 (142)*	7,58 (303)*	7,45(298)	15,26	13,93	91,52	44,40
0,125	1,250	40	0,85 (34) *	2,20 (88)*	4,20 (168)*	7,25 (290)*	7,02(281)	14,39	13,06	92,57	48,00
0,125	2,500	40	0,93 (37) *	1,03 (41)*	1,71 (71)*	3,73 (149)*	3,68(147)	7,53	6,20	86,00	75,00
<i>mwh/TM3</i>											
0	0	40	0,33 (13)	0,00 (00)	†	0,33 (13)	13	0,66			
0,125	0	40	1,40 (56)+	0,10 (04)	†	1,50 (60)+	60	3,07	2,41		
0,125	0,625	40	0,78 (31)*	0,13 (05)	†	0,90 (36)*	36	1,84	1,18		
0,125	1,250	40	0,70 (28)*	0,10 (04)	†	0,80 (32)*	32	1,63	0,97		
0,125	2,500	40	0,65 (26)*	0,10 (04)	†	0,75 (30)*	30	1,53	0,87		

Indivíduos trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) e heterozigoto balanceado (*mwh/TM3*).

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei and Würzler [1988; 1995]. *U*-test, bi-caudal; Diagnóstico estatístico: -, negativo; +, positivo; i, inconclusivo; P≤0,05 vs, controle negativo; * P ≤ 0,05 vs DXR.

^b Incluindo manchas simples *flr³* raras.

^c Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as gêmeas.

^d Frequência de formação de manchas: manchas/moscas/48.800 células (sem correção).

^e Calculado por [DXR isolado – DXR + EE] / DXR isolado] X 100, de acordo com Abraham [1994].

^f Devido à presença de inversões múltiplas no cromossomo balanceador, as células resultantes de recombinação mitótica são inviáveis.

APÊNDICE C

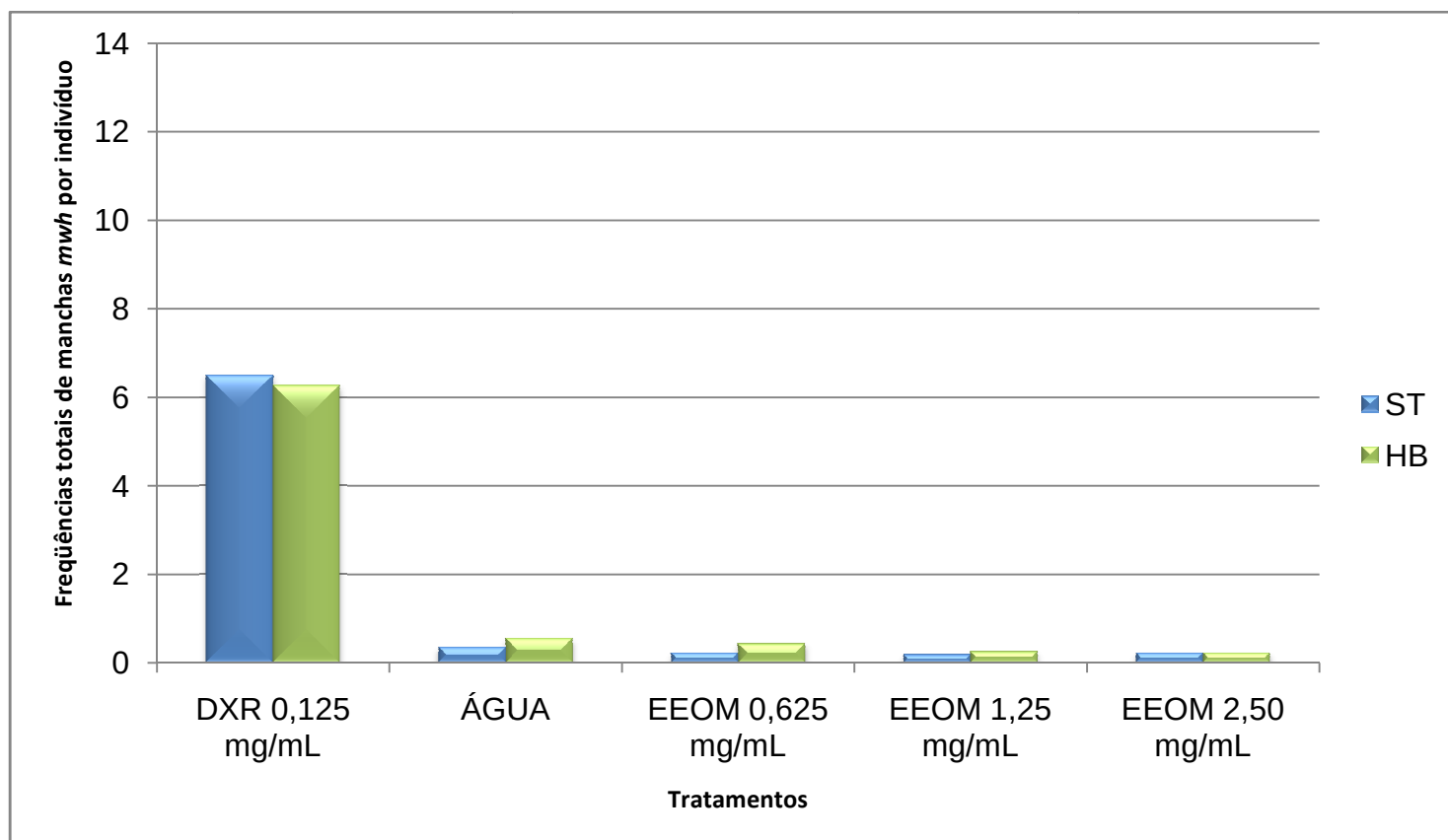


Gráfico 1: Frequências totais de manchas *mwh* em células de asas de *D. melanogaster* após tratamento crônico com EE de folhas de *Ocotea minarum* (EEOM) observadas nos cruzamentos ST e HB.

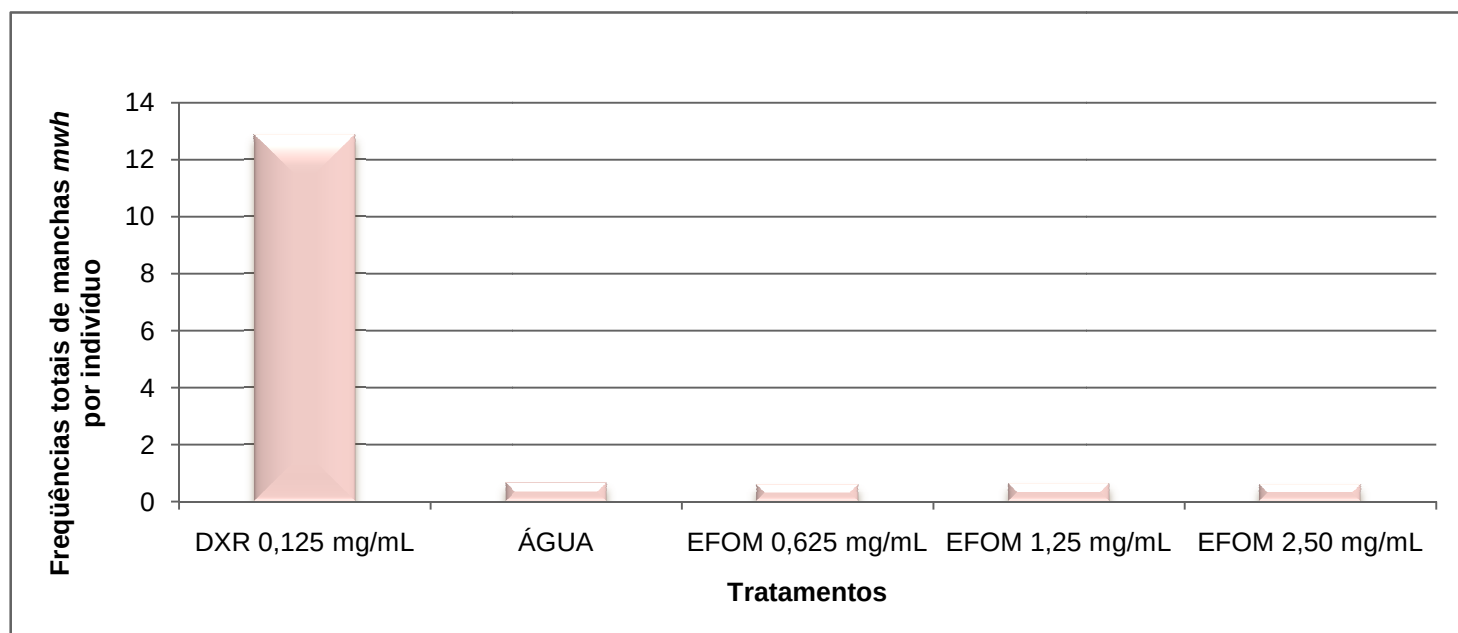


Gráfico 2: Frequências totais de manchas *mwh* em células de asas de *D. melanogaster* após tratamento crônico com EE de frutos de *Ocotea minarum* (EEFOM) observadas no cruzamento ST.

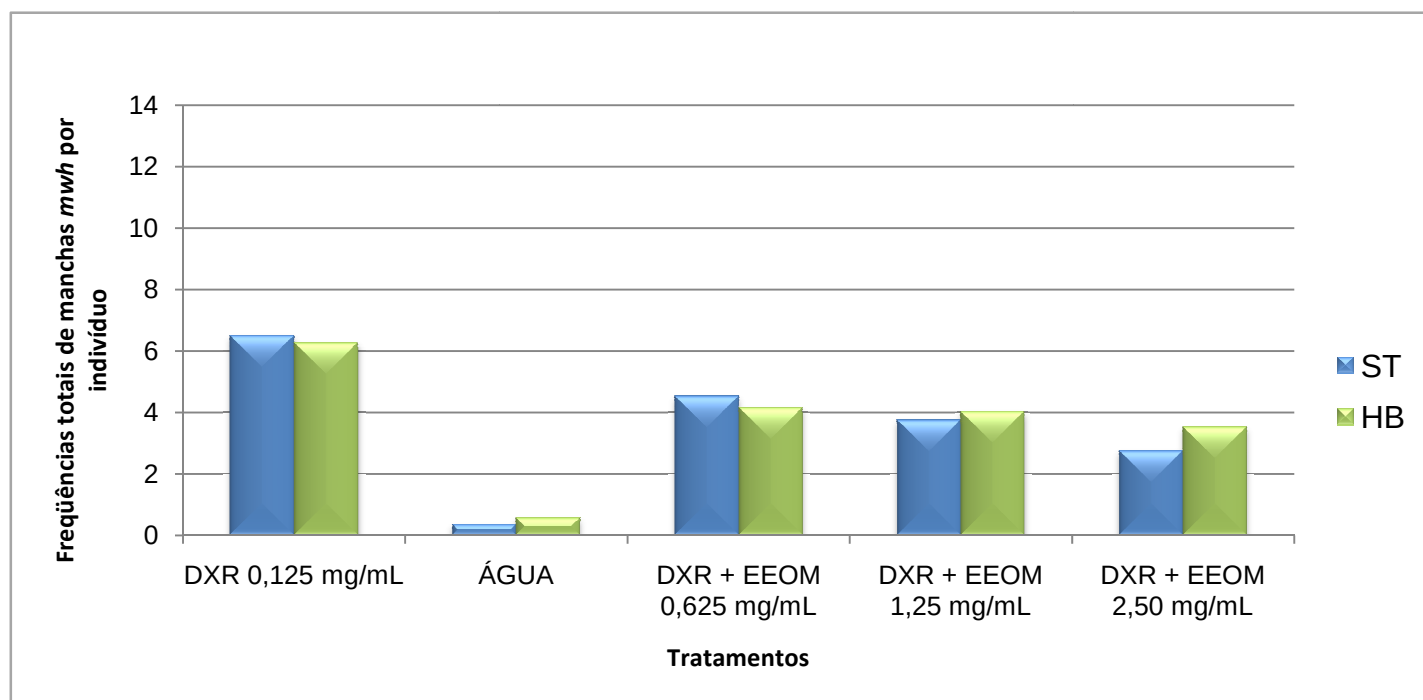


Gráfico 3: Frequências totais de manchas *mwh* observadas em células de asas de *D. melanogaster*, dos cruzamentos ST e HB, após tratamento crônico com EE de folhas de *O. minarum* associados à DXR.

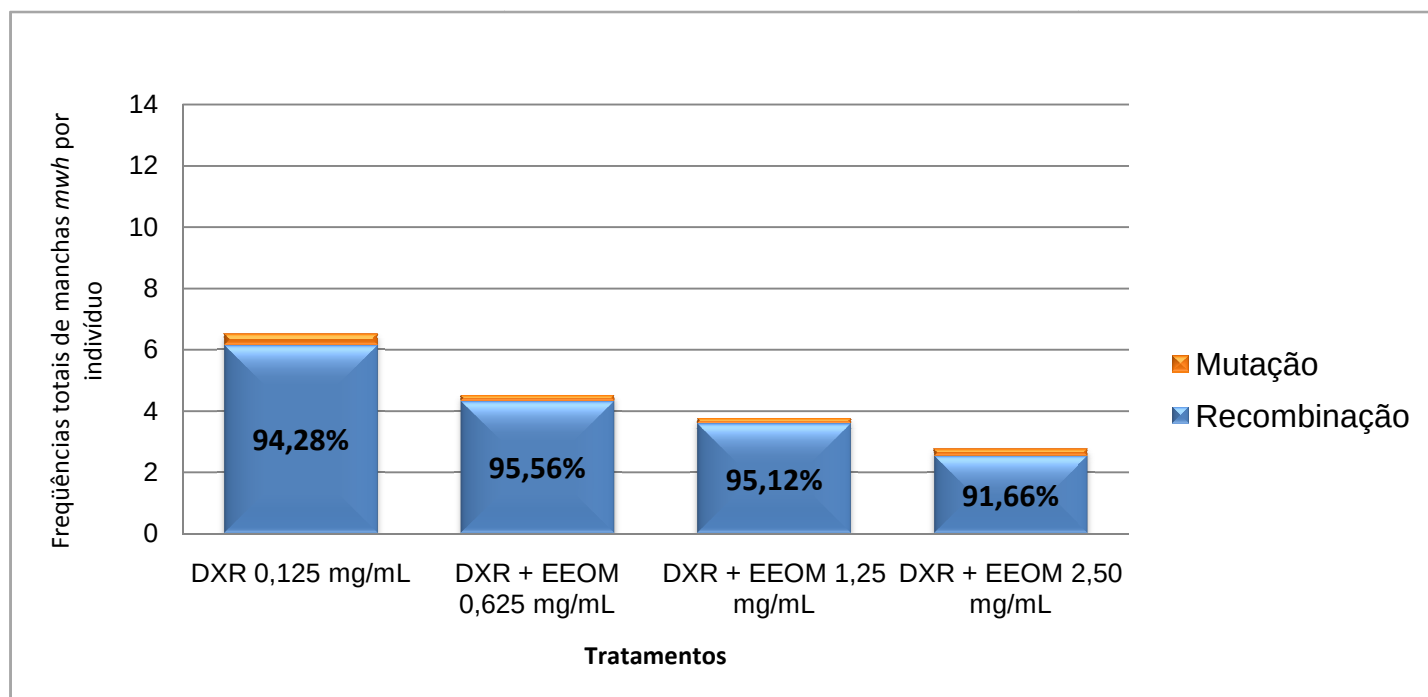


Gráfico 4: Contribuição das frequências de mutação e recombinação em relação à frequência total de manchas *mwh* por indivíduo, em células de asas de *D. melanogaster* do cruzamento ST, após tratamento crônico com EE de folhas de *O. minarum* associados à DXR.

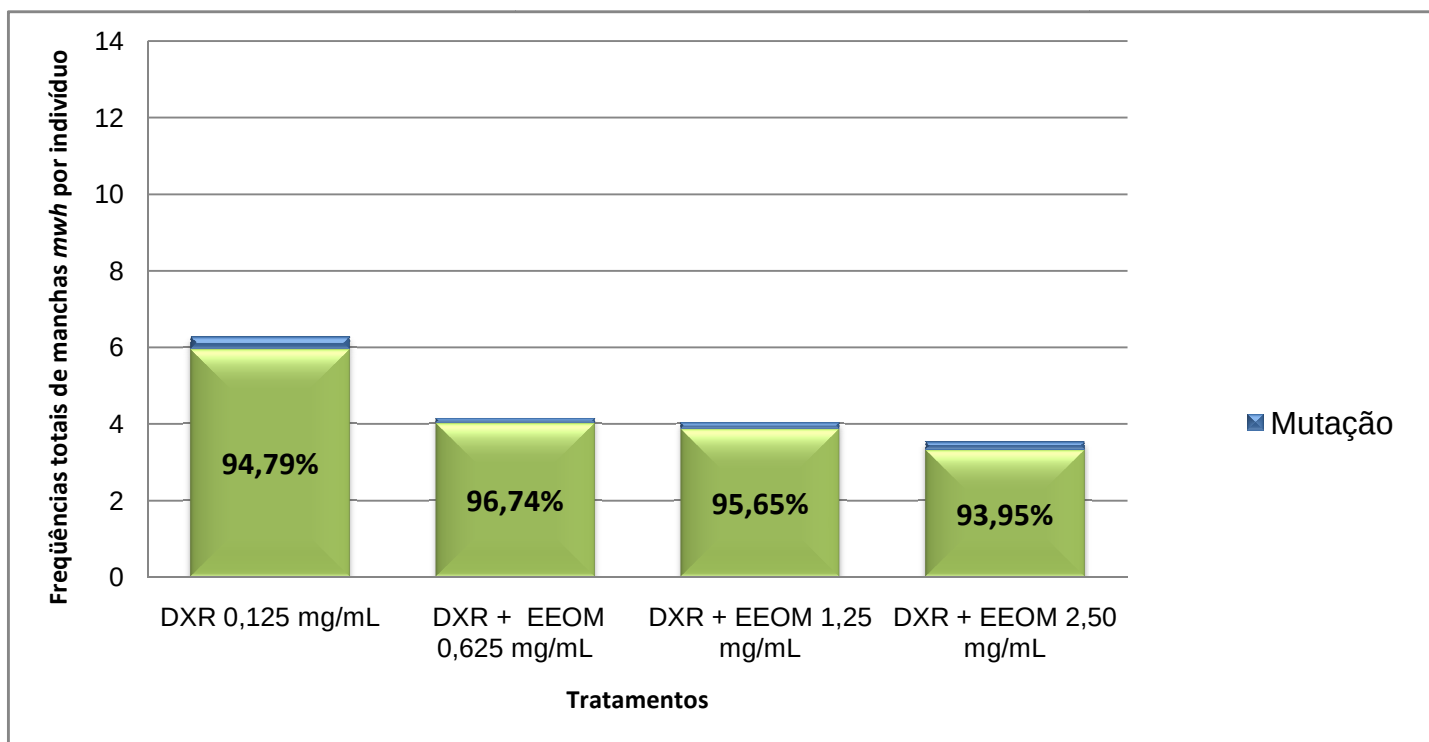


Gráfico 5: Contribuição das frequências de mutação e recombinação em relação à frequência total de manchas *mwh* por indivíduo, em células de asas de *D. melanogaster* do cruzamento HB, após tratamento crônico com EE de folhas da *O. minarum* associado à DXR.

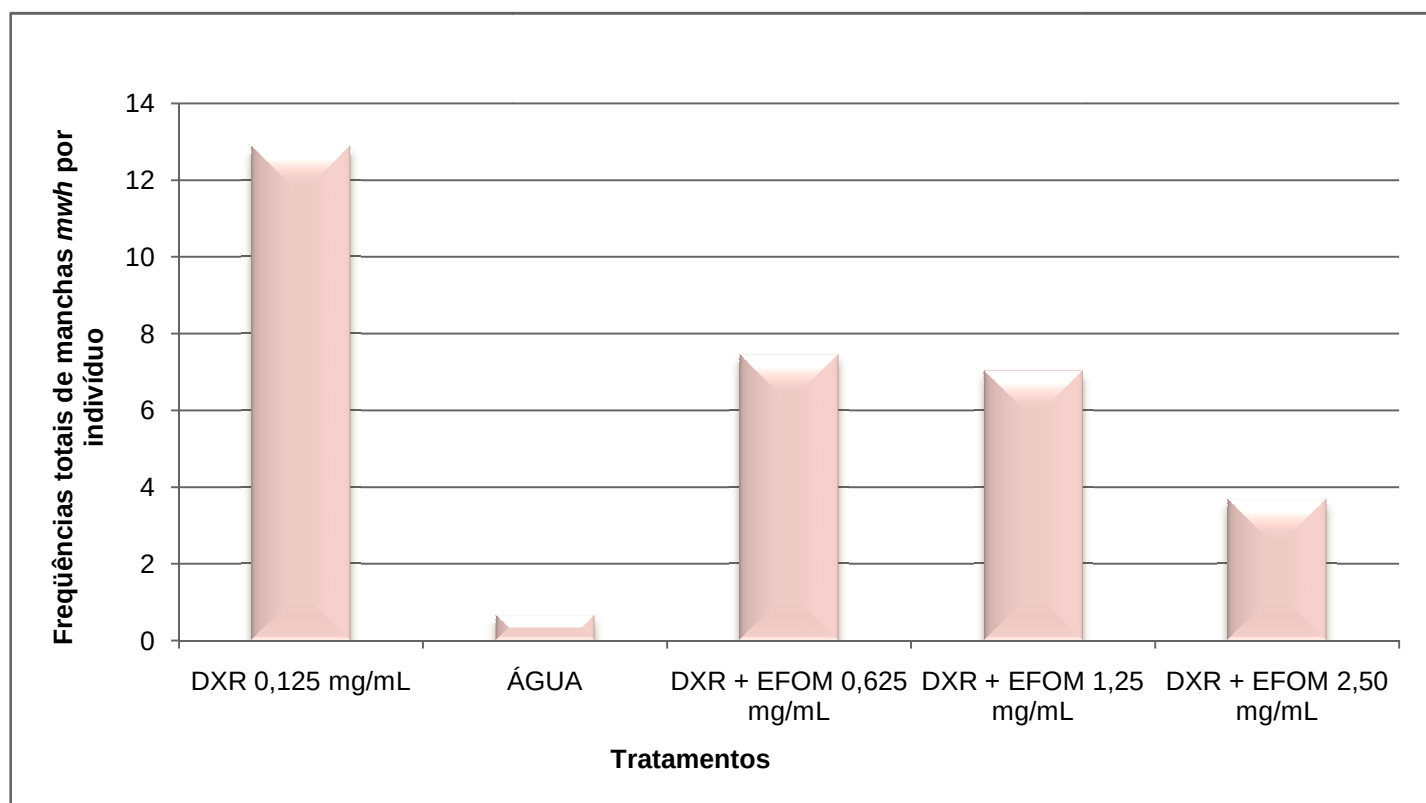


Gráfico 6: Frequências totais de manchas *mwh* observadas em células de asas de *D. melanogaster*, do cruzamento ST, após tratamento crônico com EE de frutos da *O. minarum* associados à DXR.

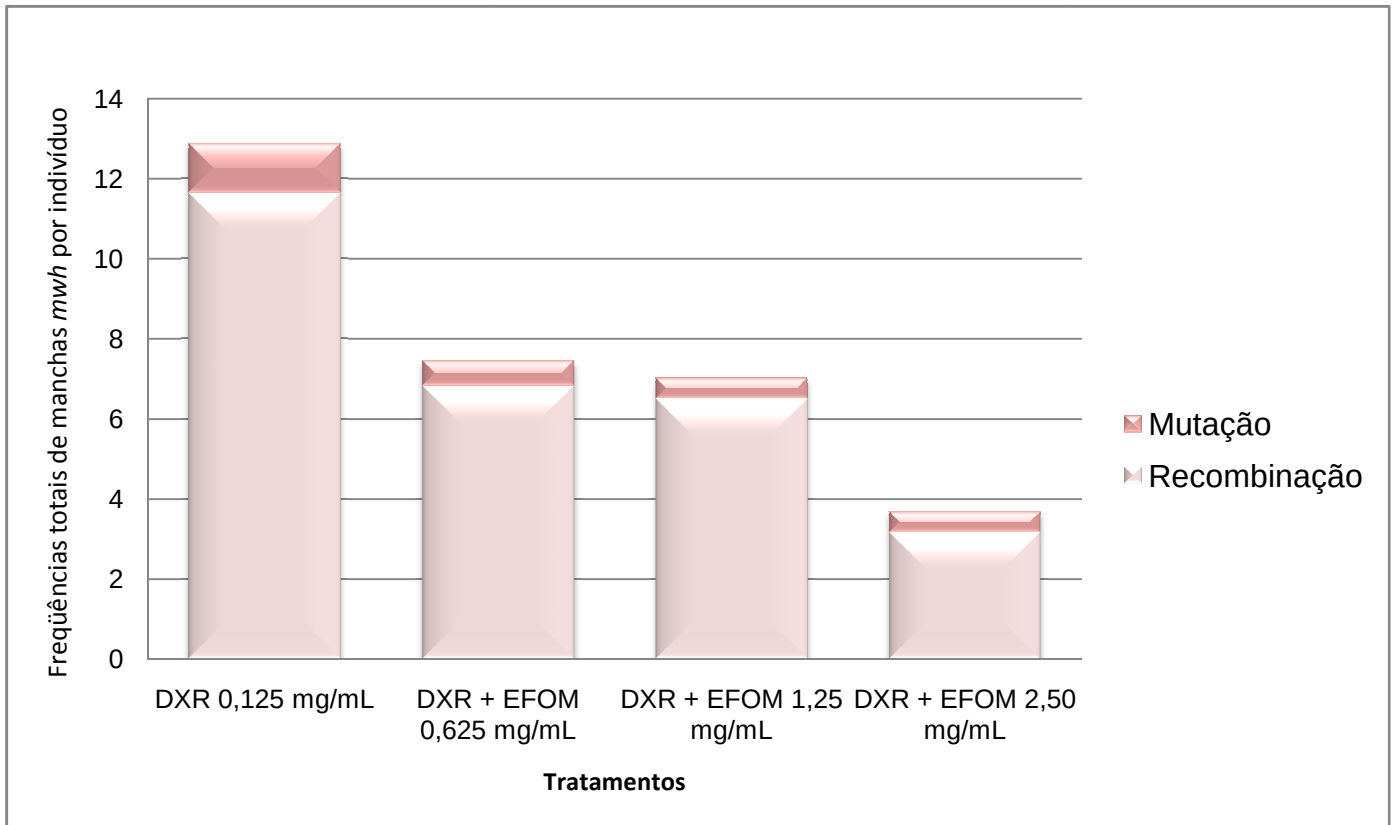


Gráfico 7: Contribuição das frequências de mutação e recombinação em relação à frequência total de manchas *mwh* por indivíduo, em células de asas de *D. melanogaster* do cruzamento ST, após tratamento crônico com EE de frutos da *O. minarum* associados à DXR.

Capítulo 5

**Avaliação genotóxica dos alcalóides triptofol,
ocoteína e dicentrina em células somáticas de
*Drosophila melanogaster***

Avaliação genotóxica dos alcalóides triptofol, ocoteína e dicentrina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Zaira da Rosa Guterres^{1, 2}, Ana Francisca Gomes da Silva^{1,3}, Lillian May Grespan Estodutto da Silva³, Alexandre Azenha Alves de Rezende², Fernanda Rodrigues Garcez³, Ulrich Graf⁴, Mário Antônio Spanó^{2*}

¹Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, Mundo Novo (Estado do Mato Grosso do Sul – MS), Brasil

²Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Uberlândia (Estado de Minas Gerais – MG), Brasil

³Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Departamento de Química, Campo Grande (Estado do Mato Grosso do Sul – MS), Brasil

⁴Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Sciences, ETH Zürich, CH-8603 Schwerzenbach, Switzerland

*Corresponding author address: Mário Antônio Spanó, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Mutagênese. Av. Pará 1720, Umuarama, Uberlândia, MG, 38400-902, Brazil. Tel.: +55 34 32182505.

E-mail address: maspano@ufu.br

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar as atividades mutagênicas e recombinogênicas do alcalóide indólico triptofol, isolado de frutos de *Ocotea minarum*; e dos alcalóides isoquinolínicos ocoteína e dicentrina, isolados de folhas de *Ocotea acutifolia*. Para tanto, foi utilizado o teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) em células de asas de *Drosophila melanogaster*. Larvas de terceiro estágio (72 h), obtidas do cruzamento padrão (ST – standard cross) foram tratadas com soluções contendo concentrações finais (0,1; 0,2 e 0,4 mM) de cada um dos alcalóides isoladamente. Como controles negativo e positivo foram utilizados, respectivamente, o solvente (1% de etanol em água destilada) e o agente genotóxico antineoplásico cloridrato de doxorrubicina – DXR (0,2 mM). A análise dos descendentes MH mostrou que as diferentes concentrações do triptofol não induziram aumentos estatisticamente significativos nas frequências de manchas mutantes, quando comparadas com as observadas no controle negativo. No entanto, a ocoteína e a dicentrina apresentaram efeitos citotóxico e genotóxico, aumentando, de forma estatisticamente significativa, as frequências de manchas mutantes. Comparando-se os resultados observados nos descendentes MH com os observados nos BH, conclui-se que os alcalóides isoquinolínicos induziram altas frequências de recombinação mitótica. Os resultados obtidos sugerem que a atividade genotóxica dos alcalóides isoquinolínicos está relacionada com as suas estruturas químicas, que inibem a atividade das enzimas topoisomerase I e II, fixando as quebras simples e duplas de DNA, induzidas por estas enzimas, favorecendo a ocorrência, principalmente de eventos recombinacionais.

Palavras-chave: Mutagenicidade, recombinação mitótica, somatic mutation and recombination test, SMART, topoisomerase.

INTRODUÇÃO

A *Ocotea minarum* e a *Ocotea acutifolia* são plantas pertencentes ao gênero *Ocotea*, um dos gêneros mais expressivos das Lauraceae brasileiras, amplamente distribuído no território nacional, o qual tem despertado interesse dos fitoquímicos brasileiros, pois vários alcalóides aporfínicos (isoquinolínicos), comumente encontrados neste gênero, apresentam diferentes atividades biológicas (Zanin & Lordello, 2007).

De estudos fitoquímicos preliminares, realizados com frutos de *O. minarum*, coletados em Campo Grande (MS), foi isolado, entre outros compostos, o alcalóide indólico triptofol (Garcez *et al.*, 2005). De folhas de *O. acutifolia*, também coletadas em Campo Grande, foram isolados quatorze alcalóides aporfínicos, entre eles: leucoxina, n-óxido ocoteína, ocoteína e dicentrina (¹Silva, comunicação pessoal).

Os alcalóides indólicos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas (Somei & Yamada, 2005). Muitos deles são utilizados com propósito medicinal. Outros servem de protótipo para o desenvolvimento de novas substâncias sintéticas (Dembitsky, 2002; 2005). Entre os alcalóides indólicos estão incluídas a vincristina, a vinblastina e a camptotecina, as quais são freqüentemente prescritas como agentes antineoplásicos, pelo fato de interromperem processos biológicos básicos nas células humanas (Sirikantaramas, 2008).

Vários alcalóides aporfínicos, como a ocoteína e a dicentrina, apresentam pronunciada bioatividade. A ocoteína possui atividade antitussígena e adrenolítica, enquanto que a dicentrina possui ação analgésica, sedativa e anti-neoplásica (Bing-Nan *et al.*, 2000). A dicentrina é um agente intercalante que interfere com a atividade catalítica da DNA topoisomerase I e II. Além disso, possui atividade citotóxica e anti-tripanosossomal (Zhou *et al.*, 2000; Hoet *et al.*, 2004).

As DNA topoisomerases são enzimas essenciais que governam a topologia do DNA durante processos metabólicos nucleares fundamentais. Agentes químicos que interferem com as DNA topoisomerases são freqüentemente encontrados na natureza. Alguns têm eficácia terapêutica no tratamento de

doenças infecciosas, assim como no tratamento do câncer humano. Os compostos que interferem com as topoisomerases podem ser divididos em duas categorias, baseados no mecanismo de ação: 1] venenos de topoisomerases; e 2] inibidores catalíticos de topoisomerases (Capranico *et al.*, 1997).

Os alcalóides isoquinolínicos exercem os dois tipos de atividades contra a DNA topoisomerase I. A potência de agentes químicos que atuam como venenos de topoisomerase pode estar mais relacionada às funções celulares desta enzima, do que a ação do agente químico contra a enzima propriamente dita (Li & Liu, 2001; Pommier, 2006).

O teste para detecção de mutação e recombinação em células somáticas de *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) é um teste de curta duração, versátil e sensível usado para detecção da atividade genotóxica de compostos simples e misturas complexas, assim como para estudos de antigenotoxicidade (Graf *et al.*, 1996) e estudos comparativos para avaliação genotóxica de agentes químicos com diferentes estruturas (Vogel *et al.*, 1999; Tiburi *et al.*, 2002; Lehmann *et al.*, 2004; Fragiorgio *et al.*, 2008), entre eles os inibidores de DNA topoisomerases (Pérez-Chiesa & Narvaez, 1993; Frei & Würigler, 1996; Torres *et al.*, 1998; Cunha *et al.*, 2002; Lehmann *et al.*, 2004).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito genotóxico (mutagênico e recombinogênico) do alcalóide indólico triptofol, isolado de frutos de *O. minarum*; e dos alcalóides isoquinolínicos ocoteína e dicentrina, isolados de folhas de *O. acutifolia*.

Material e Métodos

Agentes Químicos

O alcalóide indólico triptofol e os alcalóides isoquinolínicos ocoteína e dicentrina foram fornecidos pela Prof^a Dr^a Fernanda Rodrigues Garcez, do Departamento de Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande (MS). A solução de alcalóides foi preparada com etanol 1%, em água destilada, imediatamente antes do uso. Cloridrato de doxorubicina (DXR) (Biorrub® - Biosintética Ltda., São Paulo, Brasil – CAS Nº 23214-92-8) foi obtido do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia (MG), Brasil.

Linhagens de *Drosophila* e Cruzamentos

Foram utilizadas duas linhagens portadoras dos marcadores recessivos das células das asas de *Drosophila melanogaster*: *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0.3) e *flare* (*flr*³, 3-38.8): 1] linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*) com constituição genética *y; mwh jv*; 2] linhagem *flare*, com constituição genética *flr*³ / *In(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx*^{34e} e *Bd*^S. O cruzamento padrão (ST) foi realizado com fêmeas virgens *flare* cruzadas com machos *mwh* (Graf *et al.*, 1984, 1989).

Os ovos foram coletados durante um período de 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% w/v), coberta com uma camada de fermento biológico suplementado com sacarose. Após 72 ± 4 horas, as larvas foram lavadas em água corrente e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina e transferidas para frascos contendo 1,5 g de meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo Yoki® - Yoki Alimentos S. A. – São Bernardo do Campo, SP, Brasil) reidratado com soluções contendo diferentes concentrações finais (0,1; 0,2 e 0,4 mM) dos alcalóides triptofol, ocoteína ou dicentrina. Como controle negativo foi utilizado o solvente (1% de etanol em água destilada estéril) e como controle positivo a DXR (0,2 mM). Os tratamentos foram realizados por um período de aproximadamente 48 horas (tratamento crônico). Adultos emergentes portadores dos dois tipos de genótipos trans-heterozigotos

marcados (MH) (genótipo *mwh* + / + *flr*³) e heterozigotos balaceados (BH) (genótipo *mwh* + / + *TM3, Bd⁶*) foram coletados e fixados em etanol 70%. As asas foram montadas entre lâminas e lamínulas com solução de Faure e analisadas, quanto à ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópios ópticos, com magnificação de 400x.

Análise estatística

Para a avaliação dos efeitos genotóxicos, as frequências de manchas mutantes observadas por mosca, de cada série tratada, foram comparadas com as frequências observadas no controle negativo. As comparações estatísticas foram feitas por meio do programa SMART de computador, o qual utiliza o teste do χ^2 para proporções, de acordo com Frei & Würigler (1988). Para a análise estatística final de todos os resultados positivos, o teste não paramétrico de Mann-Whitney *U*-test com níveis de significância $\alpha = \beta = 0.05$ foi utilizado com o objetivo de excluir falsos positivos (Frei and Würigler, 1995). Com base na frequência de indução de manchas por 10^5 células, a atividade recombinogênica foi calculada como: frequência de mutação (F_M) = frequência de manchas observadas em moscas BH / frequência de manchas observadas em moscas MH; frequência de recombinação (F_R) = 1- F_M . Frequência total de manchas (F_T) = total de manchas observadas nas moscas MH (considerando manchas *mwh* e *flr*³) / N° de moscas; mutação = $F_T \times F_M$; recombinação = $F_T \times F_R$ (Santos *et al.*, 1999; Sinigaglia *et al.*, 2006).

Resultados

Os resultados observados na análise dos descendentes MH do cruzamento ST, tratados com soluções contendo concentrações finais de 0,1; 0,2 e 0,4 mM do alcalóide triptofol, assim como os controles negativo e positivo, estão representados na Tabela 1.

No controle positivo (DXR) foram observados aumentos estatisticamente significativos nas freqüências de todas as categorias de manchas mutantes (simples pequena, simples grande e gêmeas), quando comparado com o controle negativo.

As diferentes concentrações do triptofol não induziram aumentos estatisticamente significativos ($\alpha > 0,05$) nas freqüências de manchas, quando comparado com o controle negativo. A maior freqüência de manchas por asa observada no grupo tratado com triptofol foi de 0,43, enquanto que a freqüência espontânea obtida no controle negativo foi de 0,42. Esses resultados demonstram que, nessas condições experimentais, o triptofol não possui efeitos genotóxicos.

Os resultados obtidos na análise dos descendentes MH e BH das séries tratadas com concentrações finais equivalentes a 0,1; 0,2 e 0,4 mM dos alcalóides ocoteína e dicentrina, e os respectivos controles negativo e positivo, estão apresentados na Tabela 2.

Na análise dos descendentes MH, tratados com as diferentes concentrações de ocoteína, verifica-se aumento estatisticamente significativo nas freqüências totais de manchas mutantes, exceto para a concentração de 0,1mM, que apresentou aumento estatisticamente inconclusivo.

Analisando-se os dados obtidos com dicentrina, verifica-se um aumento estatisticamente significativo nas freqüências totais de manchas mutantes, para todas as concentrações utilizadas, quando comparado com o controle negativo.

Os resultados obtidos com ocoteína e dicentrina indicam que as freqüências de manchas mutantes estão diretamente relacionadas com dose-resposta, para ambos os alcalóides.

A ocoteína apresentou uma freqüência de formação de clones de $1,7 \cdot 10^{-5}$ por divisão celular para a concentração de 0,1 mM e de $4,37 \cdot 10^{-5}$ para a concentração de 0,4 mM. No entanto, para a dicentrina as freqüências de

formação de clones variaram de $11,57 \cdot 10^{-5}$ a $28,89 \cdot 10^{-5}$, respectivamente para as concentrações de 0,1 mM e de 0,4 mM.

Diante dos aumentos estatisticamente significativos observados nas freqüências de manchas mutantes nos descendentes MH, procedeu-se a análise dos descendentes BH, com o propósito de comparação de resultados para a determinação da porcentagem de manchas devidas à mutação e a porcentagem de manchas devidas à recombinação.

A análise dos descendentes BH demonstrou que as freqüências de manchas mutantes induzidas por todas as concentrações de ocoteína foram estatisticamente inconclusivas quando comparadas com o controle negativo. No entanto, todas as concentrações de dicentrina induziram aumentos estatisticamente significativos nas freqüências totais de manchas mutantes, para todas as concentrações utilizadas, quando comparado com o controle negativo.

Os resultados da análise dos indivíduos BH, tratados com ocoteína e dicentrina, quando comparados com os obtidos nos descendentes MH, revelaram freqüências de recombinação acima de 80%.

Discussão

Os resultados obtidos nos experimentos realizados com o alcalóide indólico triptofol nos permitem concluir que, nas condições experimentais utilizadas, o mesmo não possui efeitos genotóxicos. Foi ainda verificado que a frequência espontânea obtida no controle negativo está de acordo com os valores descritos na literatura, que variam de 0,22 a 0,50 (Romero-Jiménez *et al.*, 2005; Fragiorge *et al.*, 2007).

Não foram encontrados na literatura especializada, referências relacionadas à avaliação genotóxica do triptofol. No entanto, esse alcalóide apresenta estrutura química semelhante ao indole-3-carbinol (I3C), que não apresentou efeitos clastogênicos e nem aneugênicos, quando testado por meio do teste do micronúcleo em células de medula óssea, e em linfócitos de sangue periférico de camundongos (Rupa *et al.*, 2007).

Entretanto, o I3C induziu apoptose em células epiteliais de carcinoma mamário, mas não em células de epitélio mamário normal (Rahman *et al.*, 2003). Exibiu atividade antiproliferativa em cultura de células de câncer de próstata e mama (Cover *et al.*, 1999; Le *et al.*, 2003), inibiu carcinoma de fígado em rato, por meio da indução das enzimas de fase I (P450 oxidases) e de fase II (conjugases), que são enzimas essenciais no metabolismo de xenobióticos (ex. carcinógenos) e endobióticos (ex. hormônios) (Parkin & Malejka-Giganti, 2004).

Outros alcalóides indólicos, como a vincristina e a vinblastina, são inibidores do fuso, ocasionando aneugênese. Esta propriedade foi confirmada em ensaios *in vitro* em culturas de fibroblastos de pulmão de hamster (sub-clone V79-MZ); e de medula óssea e de eritrócitos de hamster (Gudi *et al.*, 1990; Antoccia *et al.*, 1991).

Quando diferentes alcalóides indólicos foram avaliados por meio do SMART de asas de *D. melanogaster*, foram observados os seguintes resultados: a vincristina e a vinblastina foram consideradas genotóxicas (Tiburi *et al.*, 2002). A camptotecina foi o composto mais genotóxico quando comparado a três diferentes venenos de topo II (Frei & Würigler, 1996). No entanto, a fagaronina e a nitidina não apresentaram atividade genotóxica (Pérez-Chiesa & Narvaez, 1993). Desta forma, pode-se concluir que nem todos os alcalóides indólicos ocasionam

eventos de genotoxicidade em células somáticas de *Drosophila*, sendo provável que a atividade genotóxica esteja relacionada com a estrutura química do alcalóide.

No controle positivo, a frequência de formação de clones por divisão celular observada foi de $15,82 \cdot 10^{-5}$ (dado não apresentado). Este efeito é atribuído aos diversos mecanismos de ação da DXR, tais como: estresse oxidativo e a produção de radicais livres (Singal *et al.*, 2000). A DXR ainda pode interagir com a enzima topoisomerase II, a qual controla a topologia das regiões super-espiralizadas do DNA, ligando-se e causando a abertura da dupla fita. Sendo assim, os tratamentos com DXR impedem a re-ligação das duplas fitas seccionadas pela topoisomerase II, causando lesão permanente à molécula do DNA (Minotti *et al.*, 2004).

Com relação aos alcalóides isoquinolínicos ocoteína e dicentrina foi verificado que a dicentrina é aproximadamente 4,5 vezes mais genotóxica do que a ocoteína, apesar destes alcalóides possuírem estrutura química muito semelhante. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que os mesmos induziram efeitos citotóxicos ou apoptóticos em células somáticas de *D. melanogaster*, pois ocorreram reduções de aproximadamente 70% no número de eclosões, pós-metamorfose dos indivíduos tratados, quando comparados com o controle negativo.

Trabalhos preliminares descreveram as atividades citotóxica e antitumoral de alcalóides isoquinolínicos (Yasukawa *et al.*, 1991; Iwasa *et al.*, 2001 a, b; Stevigny *et al.*, 2002). O alcalóide isoquinolínico *actinodaphnine* isolado de *Cassytha filiformis* (Lauraceae) induz citotoxicidade em algumas linhagens de células de câncer, tais como Mel-5 (células de melanoma) e HL-60 (células mielóides) (Stevigny *et al.*, 2002).

De acordo com Woo *et al.* (1997; 1999) a pronunciada atividade da dicentrina deve-se ao fato desta molécula ser mais planar do que os demais alcalóides aporfinóides, sendo, portanto, um agente intercalante. Desta forma, a diferença de planaridade pode conduzir a diferenças no comportamento biológico. Outro ponto relevante sobre a atividade da dicentrina é seu mecanismo de ação, pois atua sobre a enzima topo II (Hoet *et al.*, 2004). Este mecanismo de inibição, somados à sua capacidade intercalante, explicam a elevada atividade genotóxica.

Os resultados obtidos neste trabalho com os alcalóides ocoteína e dicentrina estão de acordo com os resultados observados com outros alcalóides inibidores de topoisomerasas, também avaliados por meio do SMART em células de asas de *D. melanogaster*, como os obtidos com a elipticina (Frei & Würigler, 1996); etoposide VP-16 (Torres *et al.*, 1998); e com daunorubicina, idarubicina e idarubicina (Lemann *et al.*, 2004).

No presente trabalho, aproximadamente 60% dos clones de células mutantes são de manchas pequenas (uma ou duas células). Apesar da ausência de informações sobre a atividade da ocoteína e dicentrina como indutoras de mutações cromossômicas, a sua atividade aneugênica foi descartada, visto que estes alcalóides também aumentaram de forma significativa o número de manchas grandes. De acordo com Graf *et al.* (1984) substâncias aneugênicas avaliadas pelo SMART, caracterizam-se por induzir preferencialmente manchas pequenas, em função da taxa reduzida de divisão mitótica presente nas células que sofreram aneugênese.

As elevadas freqüências de recombinação observadas para a ocoteína e dicentrina, são semelhantes às obtidas por Cunha *et al.* (2002) para bloqueadores de topo I e II, e podem ser correlacionadas ao mecanismo de ação destes alcalóides, uma vez que as quebras de fitas do DNA e a posterior re-ligação são reações catalisadas pelas DNA topoisomerasas, que podem ser requeridas para a formação de recombinações intermediárias (Wang *et al.*, 1996). De acordo com Ferguson & Pearson (1996), todos os inibidores de topo têm potente efeito clastogênico e são capazes de induzir recombinação.

Os resultados observados nos permitem sugerir que, ao inibir a atividade das topoisomerasas I e II, os alcalóides (ocoteína e dicentrina) fixaram as quebras simples e duplas de DNA induzidas por estas enzimas, favorecendo a ocorrência de eventos de mutação e recombinação.

Inibidores de topoisomerase II são efetivos agentes quimiopreventivos, com valor preditivo de 91% (Cho *et al.*, 2000). Esses compostos são agentes importantes usados na terapia de muitas neoplasias, incluindo câncer de mama, pulmão, testículo e sarcomas (Hande, 2006).

Alcalóides isolados de plantas, com atividades citotóxica e genotóxica, têm sido ativamente explorados nos últimos trinta anos, com o propósito de descobrir

novas moléculas, as quais possam ser utilizadas como agentes quimioterápicos, ou servirem de protótipo para o desenvolvimento de novas drogas sintéticas. Um dos principais mecanismos de ação dos quimioterápicos é a sua atuação sobre as topoisomerasas. O requerimento da topo II, para que as células complete a mitose, tornou esta enzima essencial para a divisão e proliferação celular. Desta forma, os inibidores catalíticos de topo II podem se constituir em uma nova classe de agentes quimiopreventivos, que podem inibir a carcinogênese via ação anti-proliferativa ou de diferenciação celular (Cho *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos sugerem que os alcalóides isoquinolínicos (ocoteína e dicentrina) possuem altas atividades citotóxica e genotóxica, relacionadas com as suas estruturas químicas, que inibem a atividade das enzimas topoisomerase I e II, fixando as quebras simples e duplas de DNA induzidas por estas enzimas, favorecendo a ocorrência de eventos recombinacionais. No entanto, pesquisas adicionais são necessárias para que sejam esclarecidos os seus mecanismos de ação e que esses alcalóides possam ser utilizados como agentes quimioterápicos, ou servirem de protótipo para o desenvolvimento de novas drogas sintéticas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS) e às agências brasileiras de fomento à pesquisa CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Referências Bibliográficas

- Antoccia, A., Degrassi, F., Batistone, A., Ciliutti, P., Tanzarella, C., 1991. In vitro micronucleus assay with kinetochore staining: evaluation of test performance. *Mutagenesis* 6 (4), 319-324.
- Bing-Nan, Z., Randall, K.J., Mattern, M.R., Wang, X., Hecht, S.M., Beck, T.H., Ortiz, A., Kingston, D.G.I., 2000. Isolation and Biochemical Characterization of a New Topoisomerase I Inhibitor from *Ocotea leucoxydon*. *Journal of Natural Products* 63 (2), 217-221.
- Capranico, G., Binaschi, M., Borgnetto, M. E., Zunino, F., Palumbo, M., 1997. A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons. *Trends Pharmacological Sciences* 18 (9), 323-329.
- Cho, K.H., Pezzuto, J.M., Bolton, J.L., Steele, V.E., Kelloff, G.J., Lee, S.K., Constantinou, A., 2000. Selection of cancer chemopreventive agents based on inhibition of topoisomerase II activity. *European Journal of Cancer* 36 (16), 2146-2156.
- Cover, C.M., Hsieh S.J., Cram E.J., Hong, C., Riby, J.E., Bjeldanes, L.F., Firestone, G.L., 1999. Indole-3-carbinol and tamoxifen cooperate to arrest the cell cycle of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Research* 59 (15), 1244-1251.
- Cunha, K.S., Reguly, M.L., Graf, U., Andrade, H.H.R., 2002. Comparison of camptothecin derivatives presently in clinical trials: genotoxic potency and mitotic recombination. *Mutagenesis* 17 (2), 141-147.
- Dembitsky, V.M., 2002. Bromo- and Iodo-containing alkaloids from marine microorganisms and sponges, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 28 (3), 196-208,

- Dembitsky, V.M., 2005. Astonishing diversity of natural surfactants: Biologically active marine and terrestrial alkaloid glycosides. *Lipids* 40 (11), 26-32.
- Ferguson, L.R., Pearson, A.E., 1996. The clinical use of mutagenic anticancer drugs. *Mutation Research* 355 (1-2), 1-12.
- Fragiorgis, E.J., Spanó, M.A., Antunes, L.M.G., 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 (2), 449-455.
- Frei, H., Würigler, F. E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result, *Mutation Research* 203(1), 297-308.
- Frei, H., Würigler, F. E. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*, *Mutation Research* 334 (1) 247-258.
- Frei, H., Würigler, F.E., 1996. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis* 11 (4), 315-325.
- Garcez, W.S., Garcez, F.R., Silva, L.M.G.E Shimabukuro, A., 2005. Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. *Journal of Brazilian Chemical Society* 16 (6b), 1382-1386.
- Graf, U., Frei, H., Kägi, A., Katz, A. J., Würigler, F. E. 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research* 222, 359-373.
- Graf, U., Spanó, M. A., Rincón, J. G., Abraham, S. K., Andrade, H. H. 1996. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure

compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. African Newsletter on Occupational Health and Safety 6(1), 9-13.

Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., Kale, P.G. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environmental and Mutagenesis 6, 153-188.

Gudi, R., Sandhu, S.S., Athwal, R.S., 1990. Kinetochore identification in micronuclei in mouse bone marrow erythrocytes: an assay for detection of aneuploidy-inducing agents. Mutation Research 234 (5), 263-268.

Hande, K.R., 2006. Topoisomerase II inhibitors. Update on Cancer Therapeutics 1 (1), 3–15.

Hoet, S., Stévigny, C., Block, S., Opperdoes, F., Colson, P., Baldeyrou, B., Lansiaux, A., Bailly, C., Quetin-Leclercq, J., 2004. Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: Antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and Interaction with DNA and topoisomerases. Planta Medica 70 (3), 407-413.

Iwasa, K., Moriyasu, M., Tachibana, Y., Kim, H.S., Wataya, Y., Wiegreb, W., Bastow, K.F., Cosentino, L.M., Kozuka, M., Lee, K.H., 2001a. Simple isoquinoline and benzyloisoquinoline alkaloids as potential antimicrobial, antimalarial, cytotoxic, and anti-HIV agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry 9 (11), 2871–2884.

Iwasa, K., Moriyasu, M., Yamori, T., Turuo, T., Lee, D.U., Wiegreb, W., 2001b. In vitro cytotoxicity of the protoberberine-type alkaloids. Journal Natural Products 64 (7), 896–898.

Le, H.T., Schaldach, C.M., Firestone, G.L., 2003. Plant derived 3,3-diindolylmethane is a strong androgen antagonist in human prostate cancer cells. The Journal of Biological Chemistry 278 (23), 21136–21145.

- Lehmann, M., Vilar, K.S.P., Franco, A., Reguly, M.L., Andrade, H.H.R., 2004. Activity of Topoisomerase Inhibitors Daunorubicin, Idarubicin, and Aclarubicin in the *Drosophila* Somatic Mutation and Recombination Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 43 (4), 250-257.
- Li, T.K., Liu, L.F., 2001. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41 (1), 53-77.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. 2004. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacology Reviews* 56 (1),185-229.
- Parkin, D.R., Malejka-Giganti, D., 2004. Differences in the hepatic P450-dependent metabolism of estrogen and tamoxifen in response to treatment of rats with 3,3-diindolylmethane and its parent compound indole-3-carbinol. *Cancer Detection and Prevention* 28 (1), 72–79.
- Pérez-Chiesa, Y., Narvaez, Z., 1993. Evaluation of genotoxicity of the indenoisoquinoline analogues of fagaronine and nitidine in *Drosophila melanogaster*, *Mutation Research* 301 (4), 207–212.
- Pommier, Y., 2006. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer* 6 (1), 789-802.
- Rahman, K.M., Aranha, O., Sarkar, F.H., 2003. Indole-3-carbinol (I3C) induces apoptosis in tumorigenic but not in nontumorigenic breast epithelial cells, *Nutrition and Cancer* 45 (1), 101–112.
- Romero-Jiménez, M., Campos-Sánchez, J., Analla, M., Muñoz-Serrano, A., Alonso-Moraga, A. 2005. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutation Research* 585 (1), 147-155.

- Rupa, S., Doppalapudi, E., Riccio, S., Rausch, L.L., Shimon, J.A., PAM, S., Lee, Mortelmans, K.E., Kapetanovic, I. M., Crowell, J.A., Mirsalis, J.C., 2007. Evaluation of chemopreventive agents for genotoxic activity. *Mutation Research* 629 (2), 148–160.
- Santos, J. H., Graf, U., Reguli, M. L., Andrade, H. H. R. 1999. The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 444, 355-365.
- Singal, P. K., Li, T., Kumar, D., Danelisen, I., Iliskovic, N. 2000. Adriamycin-induced heart-failure: mechanism and modulation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 20, 77-85.
- Sinigaglia, M., Lehmann, M., Baumgardt, P., Amaral, V. S., Dihl, R. R., Reguly, M. L., Andrade, H. H. R. 2006. Vanillin as a modulator agent in SMART test: Inhibition in the steps that precede N-methyl-N-nitrosourea-, N-ethyl-N-nitrosourea-, ethylmethanesulphonate- and bleomycin-genotoxicity. *Mutation Research*, 607, 225-230.
- Sirikantaramas, S., Yamazaki, M., Saito, K., 2008. Mutations in topoisomerase I as a self-resistance mechanism coevolved with the production of the anticancer alkaloid camptothecin in plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 105 (33), 6785-6794.
- Somei, M., Yamada, F., 2005. Alkaloids and Those with a Non-rearranged Monoterpenoid Unit, *Natural Product Reports* 22 (1), 73–103.
- Spanó, M.A., Frei, H., Würigler, F.E., Graf, U., 2001. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* 16 (5), 385-394.

- Stevigny, C., Block, S., De Pauw-Gillet, M.C., Hoffmann, E., Llabres, G., Adjakidje, V., Quetin-leclereq, J., 2002. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Cassytha filiformis*. *Planta Medica* 68 (11), 1042-1044.
- Tiburi, M., Reguly, M.L., Schwartzmann, G., Cunha, K.C., Lehmann, M., Andrade, H.H.R., 2002. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 519 (1-2), 141-149.
- Torres, C., Creus, A., Marcos, R., 1998. Genotoxic activity of four inhibitors of DNA topoisomerases in larval cells of *Drosophila melanogaster* as measured in the wing spot assay. *Mutation Research / Genetic toxicology and Environmental mutagenesis* 413 (2), 191–203.
- Vogel, W., Graf, U., Frei, H., Nivard, M.M. 1999. The results of assay in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. In: *The Use of Short- and Medium-Term Tests for Carcinogenic Hazard Evaluation* (McGregor, D.B., Rice, J.M.).
- Wang, C. K., Peng, C. H. 1996. The mutagenicities of alkaloids and N-nitrosoguvacoline from etel quid. *Mutation Research*, 360, 165-171.
- Woo, S.H., Reynolds, M.C., Sun, N.J., Cassady, J.M., Snapka, R.M., 1997. Inhibition of topoisomerase II by liriodenine. *Biochemical Pharmacology* 54 (4), 467-473.
- Woo, S.H., Sun, N.J., Cassady, J.M., Snapka, R.M., 1999. Topoisomerase II Inhibition by aporphine alkaloids. *Biochemical Pharmacology* 57 (10), 1141-1145.
- Yasukawa, K., Takido, M., Ikekawa, T., Shimada, F., Takeuchi, M., Nakagawa, S., 1991. Relative inhibitory activity of berberine-type alkaloids against 12-O-tetradecanoyl- phorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 39 (6), 1462–1465.

Zanin, S.M.W., Lordello, A.L.L., 2007. Aporphine alkaloids in *Ocotea* species (Lauraceae), *Química Nova* 30 (1), 92-98.

Tabela 1. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST) após tratamento crônico com diferentes concentrações do alcalóide triptofol (TRP)

Genótipos e tratamentos (mM)	Nº Indivíduos (N)	Manchas por indiv. (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	MSG (>2 céls) ^b <i>m</i> = 2	MG <i>m</i> = 5	T M <i>m</i> = 2	
<i>mwh/flr</i> ³						
Contr. Neg.	60	0,33 (20)	0,02 (01)	0,07 (04)	0,42 (25)	25
DXR 0,2	40	2,00 (80) +	2,63 (105) +	3,40 (136) +	8,03 (321) +	309
TRP 0,1	60	0,27 (16) -	0,13 (08) +	0,02 (01) -	0,42 (25) -	24
TRP 0,2	60	0,25 (15) -	0,07 (04) i	0,07 (04) i	0,38 (23) -	23
TRP 0,4	60	0,35 (21) -	0,07 (04) i	0,02 (01) -	0,43 (26) -	26

Indivíduos trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr*³).

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei and Würzler [1988]. Teste *U*, bi-caudal; Diagnóstico estatístico: -, negativo; +, positivo; i, inconclusivo; $P \leq 0,05$ vs, controle negativo.

^b Incluindo manchas simples *flr*³ raras.

^c Considerando manchas *mwh* de manchas simples *mwh* e manchas gêmeas.

Tabela 2. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST) após tratamento crônico com diferentes concentrações dos alcalóides ocoteína e dicentrina

Genótipos e tratamentos (mM)	Nº Indivíduos (N)	Manchas por indiv. (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^a				Total de manchas <i>mwh</i> ^c (n)	Recombinação %
		MSP (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	MSG (>2 céls) ^b <i>m</i> = 2	MG <i>m</i> = 5	T M <i>m</i> = 2		
<i>mwh/flr</i> ³							
C N	30	0,47 (14)	0,03 (0,1)	0,03 (0,1)	0,53 (16)	16	
DXR 0,2	40	2,00 (80) +	2,63 (105) +	3,40 (163) +	8,03 (321) +	309	92,73
OCT 0,1	30	0,57 (17) i	0,20 (06) i	0,10 (03) i	0,87 (26) i	25	88,52
OCT 0,2	30	0,53 (16) i	0,40 (12) +	0,20 (06) i	1,13 (34) +	32	87,15
OCT 0,4	30	1,53 (46) +	0,53 (16) +	0,20 (06) i	2,27 (68) +	64	85,36
DIC 0,1	20	3,35 (67) +	1,00 (20) +	0,95 (19) +	5,80 (116) +	113	86,26
DIC 0,2	20	4,45 (89) +	1,90 (38) +	0,80 (16) +	7,15 (143) +	139	81,29
DIC 0,4	20	8,35 (167) +	4,00 (80) +	2,00 (40) +	14,35 (287) +	282	88,68
<i>mwh/TM3</i>							
C N	30	0,20 (06) i	0,00 (00) i	d	0,20 (06)	06	
DXR 0,2	60	0,65 (39) +	0,07 (4) i	d	0,72 (43) +	43	
OCT 0,2	30	0,20 (06) i	0,07 (02) i	d	0,27 (08) i	08	
OCT 0,4	30	0,34 (10) l	0,10 (03) i	d	0,43 (13) i	13	
DIC 0,1	20	0,75 (15) +	0,15 (03) i	d	0,90 (18) +	18	
DIC 0,2	20	1,05 (21) +	0,35 (07) +	d	1,40 (28) +	28	
DIC 0,4	20	1,40 (28) +	0,20 (04) +		1,60 (32) +	32	

Indivíduos trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr*³).

^a Diagnóstico estatístico de acordo com Frei and Würzler [1988]. Teste *U*, bi-caudal; Diagnóstico estatístico: -, negativo; +, positivo; i, inconclusivo; $P \leq 0,05$ vs. controle negativo.

^b Incluindo manchas simples *flr*³ raras.

^c Considerando manchas *mwh* de manchas simples *mwh* e manchas gêmeas.

^d Somente manchas simples *mwh* podem ser observadas em heterozigotos *mwh/TM3* uma vez que o cromossomo balanceador *TM3* não carrega a mutação *flr*³.

APÊNDICE D

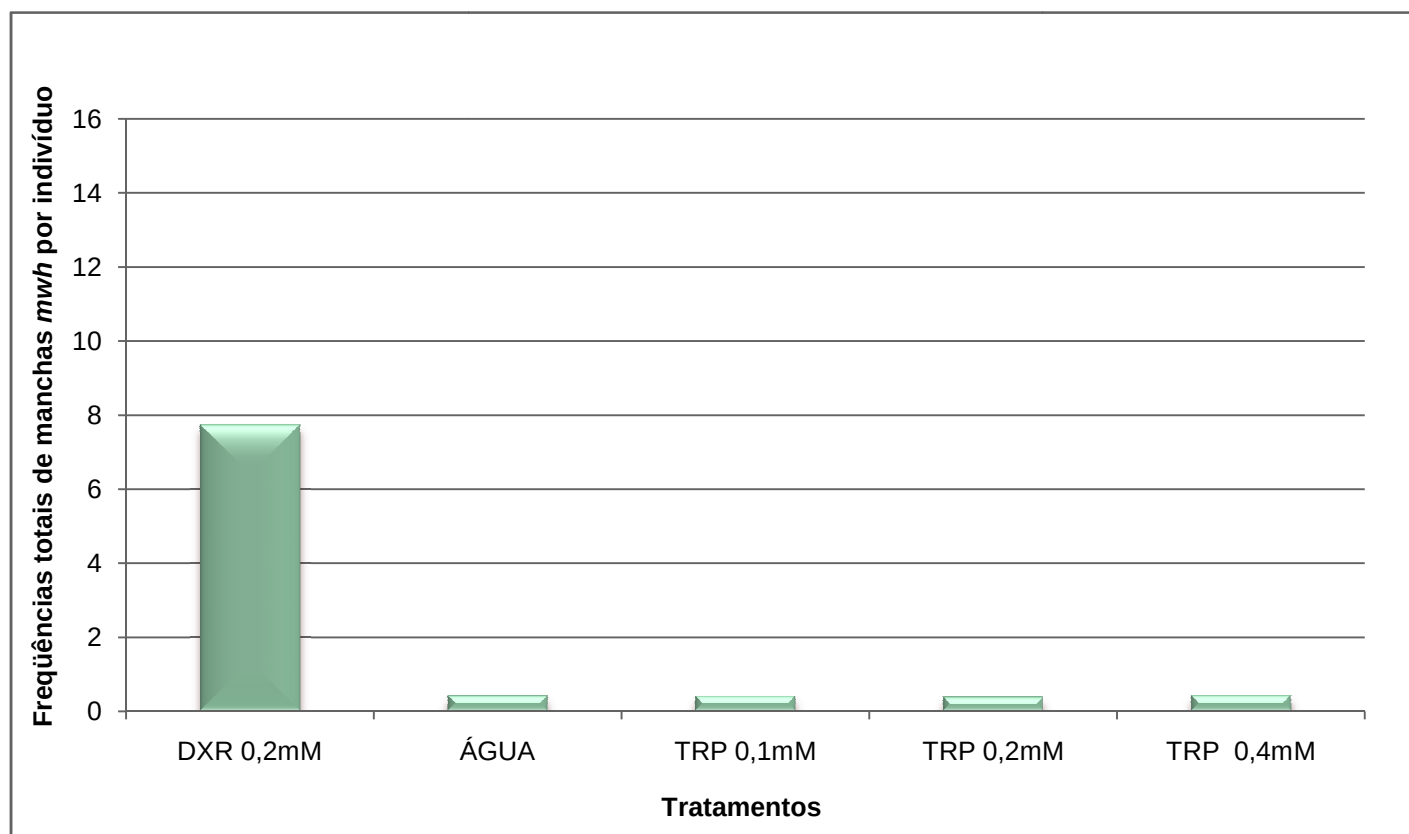


Gráfico 1: Frequências totais de manchas *mwh* observadas em células de asas de *D. melanogaster*, do cruzamento ST, após tratamento crônico com o alcalóide indólico triptofol.

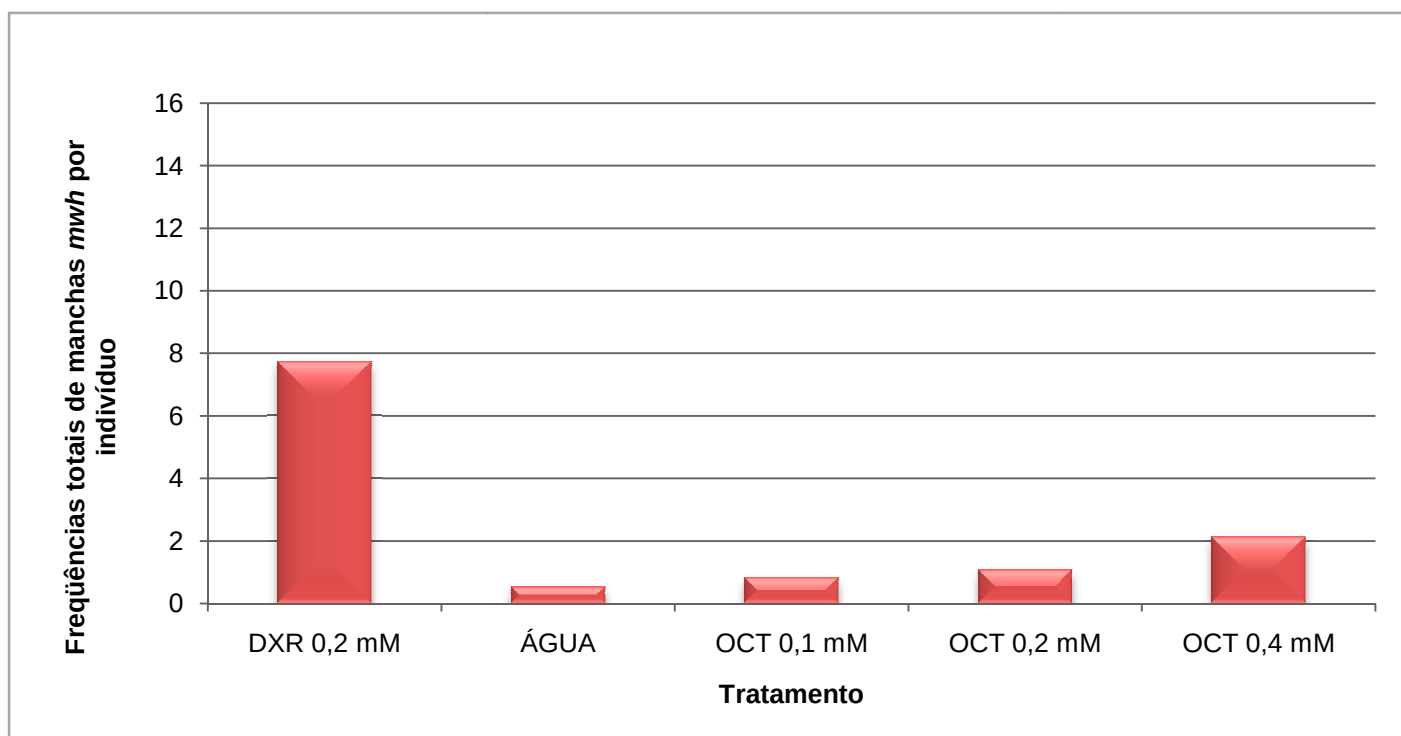


Gráfico 2: Frequências totais de manchas *mwh* observadas em células de asas de *D. melanogaster*, do cruzamento ST, após tratamento crônico com o alcalóide isoquinolínico ocoteína.

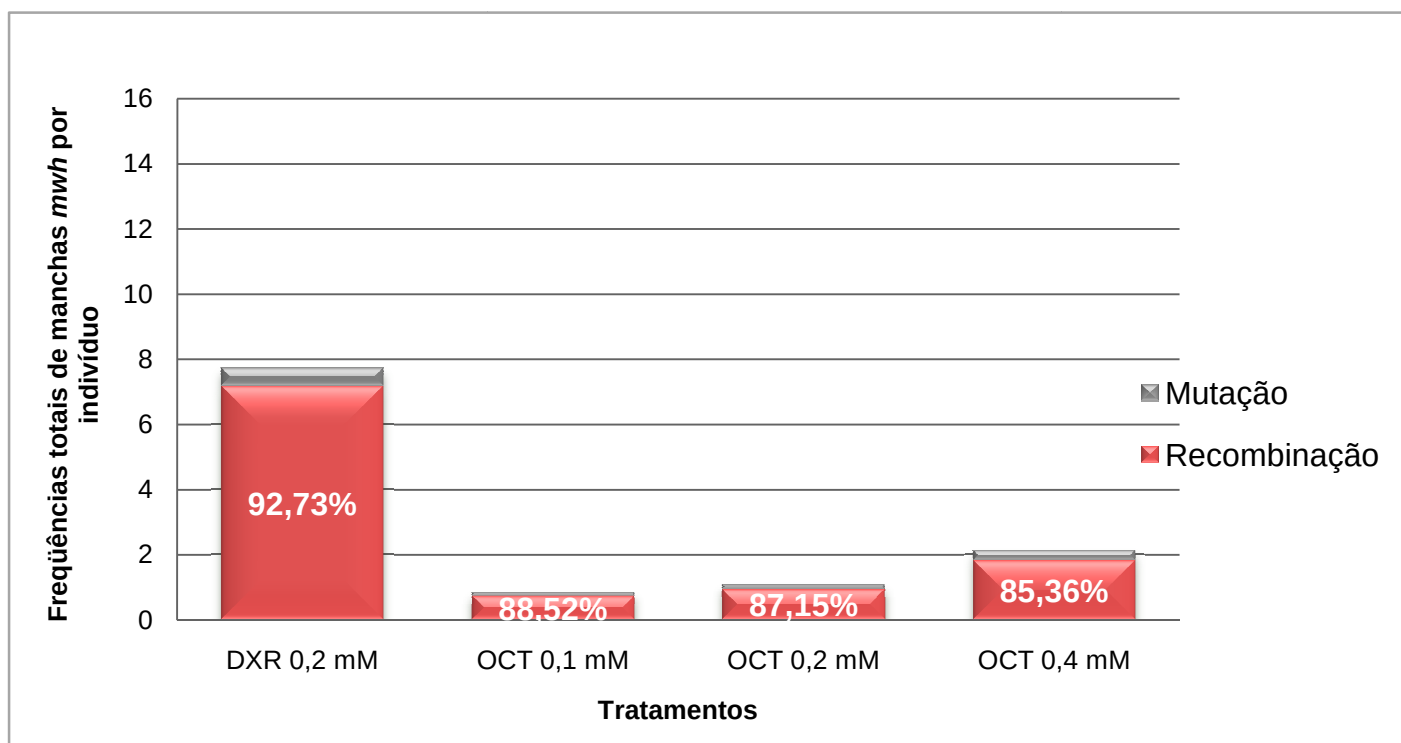


Gráfico 3: Contribuição das frequências de mutação e recombinação em relação à frequência total de manchas *mwh* por indivíduo, em células de asas de *D. melanogaster* do cruzamento ST, após tratamento crônico com ocoteína.

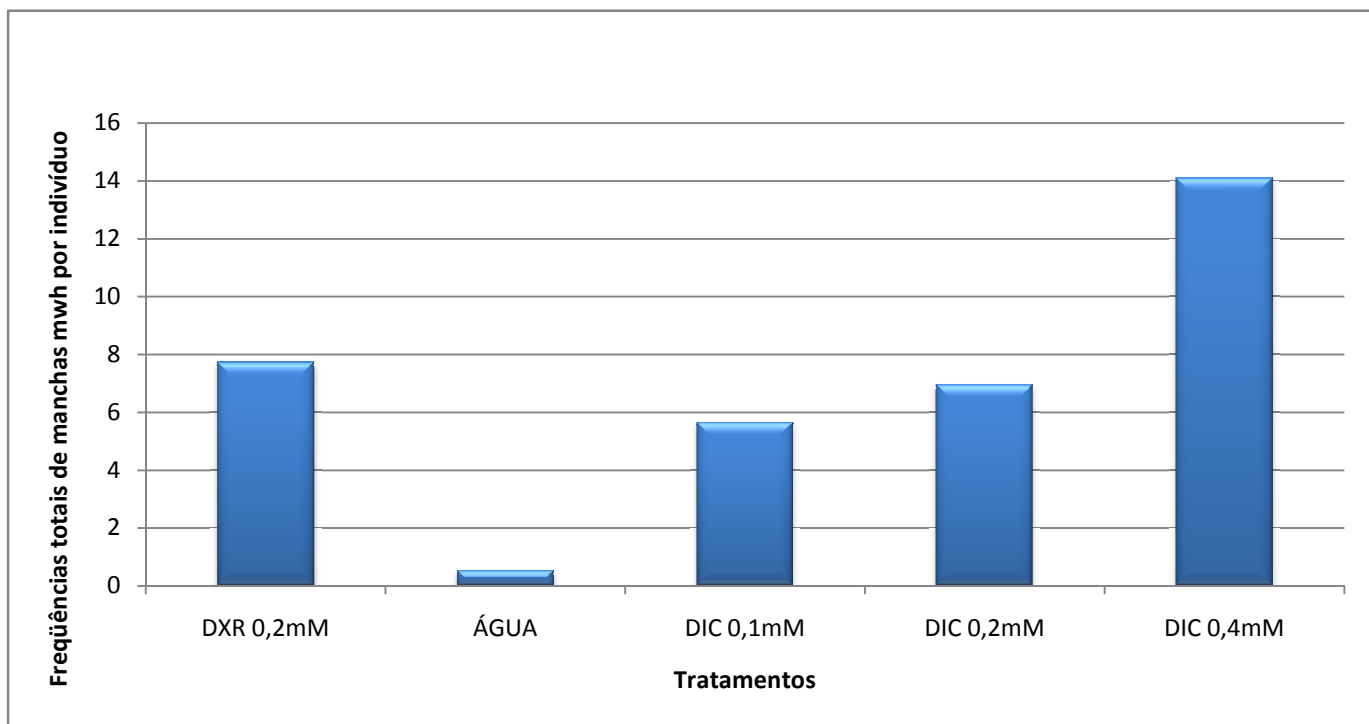


Gráfico 4: Frequências totais de manchas *mwh* observadas em células de asas de *D. melanogaster*, do cruzamento ST, após tratamento crônico com o alcalóide isoquinolínico dicentrina.

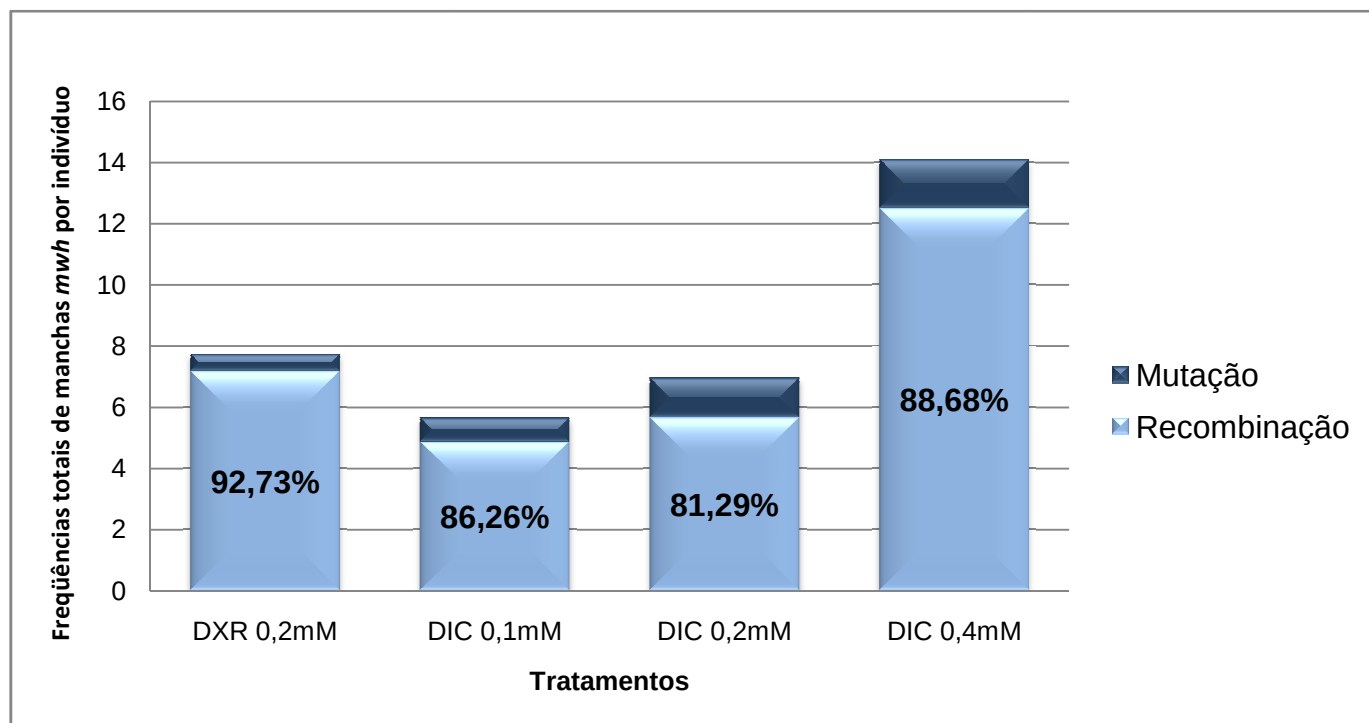


Gráfico 5: Contribuição das frequências de mutação e recombinação em relação à frequência total de manchas *mwh* por indivíduo, em células de asas de *D. melanogaster* do cruzamento ST, após tratamento crônico com dicentrina.