



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE VEGETAL

**Avaliação do potencial genotóxico e antígeno-tóxico da fração aquosa e do
isolado pedunculagina da semente de *Myrciaria cauliflora* (Mart) O. Berg em
sistemas *in vivo***

Mestrando: Rangel Moreira Silva

Orientadora: Prof^ª Dra. Lee Chen Chen

Co-orientadora: Prof^ª Dra. Suzana da Costa Santos

GOIÂNIA
2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

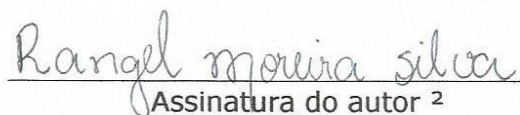
Nome completo do autor: Rangel Moreira Silva

Título do trabalho: Avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico da fração aquosa e do isolado pedunculagina da semente de *Myrciaria cauliflora* (Mart) O. Berg em sistemas *in vivo*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do autor ²

Data: 05 / 02 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE VEGETAL



**Avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico da fração aquosa e do
isolado pedunculagina da semente de *Myrciaria cauliflora* (Mart) O. Berg em
sistemas *in vivo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, sob a orientação da Prof^a Dra. Lee Chen Chen e co-orientação da Prof^a Dra. Suzana da Costa Santos para a obtenção do título de mestre em Biodiversidade Vegetal.

GOIÂNIA
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Rangel Moreira

Avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico da fração aquosa
e do isolado pedunculagina da semente de *Myrciaria cauliflora* (Mart) O.
Berg em sistemas *in vivo* [manuscrito] / Rangel Moreira Silva. - 2016.
ix, 33 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Lee Chen Chen; co-orientadora
Dra. Suzana da Costa Santos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação
em Biodiversidade Vegetal, Goiânia, 2015.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista
de tabelas.

1. Elagitaninos. 2. teste do micronúcleo. 3. ensaio cometa. 4.
ciclofosfamida e efeito antigenotóxico. I. Chen, Lee Chen, orient.
II. Título.

CDU 581

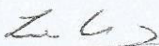


SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE VEGETAL

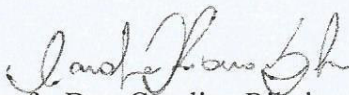
ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO
DE Nº 041

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO. – Aos trinta dias do mês de junho do ano de dois mil e dezesseis (30/06/2016), às 14h30min horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profa. Dra. Lee Chen Chen – orientadora; Profa. Dra. Carolina Ribeiro e Silva e Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no Anfiteatro do ICB II da UFG, procederem à avaliação da defesa de Dissertação intitulada “**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E ANTIGENOTÓXICO DA FRAÇÃO AQUOSA E DO ISOLADO PEDUNCULAGINA DA SEMENTE DE *Myrciaria cauliflora* (Mart) O. Berg EM SISTEMAS IN VIVO.**” em nível de mestrado, área de concentração em Botânica, de autoria de **RANGEL MOREIRA SILVA**, discente do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora Profa. Dra. Lee Chen Chen que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra a seguir foi concedida ao autor da dissertação que, em 25 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 1283/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal, a Dissertação foi Aprovada por unanimidade, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE VEGETAL, na área de concentração em Botânica pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na

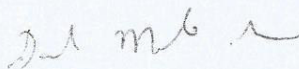
secretaria do PPGBV da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções, em trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às _____ horas e _____ min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado e para constar eu, Gleizilene Braz Pereira dos Santos, assistente administrativa do PPGBV lavrei a presente Ata, que após lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em três vias de igual teor.



Prof. Dra. Lee Chen Chen
Presidente da Banca
ICB/UFG



Prof. Dra. Carolina Ribeiro e Silva
ICB/UFG



Prof. Dra. Daniela de Melo e Silva
ICB/UFG

Não sei se estou perto ou longe demais, se peguei o rumo certo ou o errado. Sei apenas que sigo em frente, vivendo dias iguais de forma diferente. Já não caminho mais sozinho, levo comigo cada recordação, cada vivência, cada lição. E, mesmo que tudo não ande de forma que eu gostaria, saber que não sou o mesmo de ontem me faz perceber que tudo valeu a pena.

-----Marcia Duarte-----

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, a minha família pelo total apoio nessa caminhada vitoriosa, em especial minha mãe Maria do Carmo Ribeiro Silva, que mesmo distante sempre se fez presente com suas orações e nunca me deixou desanimar, pois sempre acreditou que eu seria capaz de alcançar meus objetivos. Agradeço também incondicionalmente a minha orientadora Prof^a. Dra. Lee Chen Chen pela sua dedicação na orientação do presente estudo e por ter confiado na minha capacidade para chegar até aqui.

Agradeço minha co-orientadora Prof^a. Dra. Suzana da Costa Santos, que com sua brilhante parceria contribuiu com a realização deste trabalho.

Meus agradecimentos aos colegas de laboratório que me proporcionaram uma caminhada mais amena e prazerosa, principalmente a minha grande amiga Camila Regina do Vale, que como um anjo da guarda me incentivou e me acolheu em sua vida me transformando para sempre. Agradeço também de forma especial, ao colega Jefferson Holanda Vêras que não mediu esforços para colaborar na execução deste projeto de vida.

Agradeço meu amigo Leandro Carvalho Nogueira pela sua paciência em me compreender e estar sempre ao meu lado me apoiando e me incentivando em seguir em frente.

Agradeço minha instituição e a todos que fazem a Universidade Federal de Goiás- UFG ser essa referência no ensino de qualidade, a todos o meu muitíssimo obrigado.

Agradeço à FAPEG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás), pelo apoio financeiro que muito contribuiu ao longo desse tempo.

Em fim, obrigado a todos, porque sem vocês não seria possível à realização deste sonho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ANEXOS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. Introdução.....	13
1.1 <i>Myrciaria cauliflora</i> (Mart) O. Berg	13
1.2 Taninos.....	15
1.3 Pedunculagina (2,3-4,6-(S)-hexahidroxidifenoil-D-glicose)	16
1.4 Genotoxicidade e Antigenotoxicidade	17
1.5 Teste do Micronúcleo	18
1.6 Ensaio Cometa	20
2. Objetivos.....	23
2.1. Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3. Material e Métodos	24
3.1 Controles	24
3.2 Fração Aquosa Purificada da Semente de <i>Myrciaria cauliflora</i> (Mart) O. Berg e seu composto pedunculagina.....	24
3.3 Reagentes e Soluções do Teste do Micronúcleo.....	24
3.3.1 Tampão Fosfato.....	24
3.3.2 Corante/ composição	24
3.3.3 Fixador	25
3.3.4 Solubilização das Células.....	25
3.4 Reagentes e Soluções do Ensaio Cometa.....	25
3.4.1 Solução Estoque/ Tampão Fosfato-Salino (PBS).....	25
3.4.2 Solução de Lise (estoque)	25
3.4.3 Solução de Lise (uso)	25
3.4.4 Tampão de Eletroforese	25
3.4.5 Tampão de Neutralização.....	25
3.4.6 Solução de Coloração (estoque)	26

3.2.7 Solução de Coloração (uso).....	26
3.2.8 Agarose Normal	26
3.2.9 Agarose de Baixo Ponto de Fusão (<i>low-melting</i>).....	26
4. Procedimento Experimental	26
4.1 Obtenção e Organização dos Animais	26
4.2. Teste do Micronúcleo	26
4.3 Ensaio Cometa ou <i>Single Cell Gel Electrophoresis (SGE)</i>	28
4.4 Análises Estatísticas.....	29
5. Resultados.....	30
5.1 Teste do Micronúcleo em Medula Óssea de Camundongos.....	30
5.2 Ensaio Cometa em Medula Óssea de Camundongos.....	32
6. Discussão.....	34
7. Conclusão	38
8. Referências Bibliográficas.....	39
9. Anexos.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Efeito dos tratamentos com a fração aquosa (FA) na indução da frequência de EPCMN e a razão entre EPC/ENC.....	31
Tabela 2 - Efeito dos tratamentos com Pedunculagina (Ped.) na indução da frequência de EPCMN e a razão de EPC/ENC.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- (A) Árvore com frutos e (B) sementes de jabuticaba.	14
Figura 2- Estrutura química de pedunculagina.....	17
Figura 3- Representação do processo de formação de eritrócitos micronucleados.....	19
Figura 4- Imagens de nucleóides do pós-tratamento da medula óssea de camundongos tratados com o composto pedunculagina. Figura 4-A, nucleóide sem danos no DNA e figura 4-B nucleóide com danos no DNA.....	21
Figura 5- Representação dos experimentos realizados em camundongos.....	27
Figura 6- Fotografia de eritrócito policromático micronucleado	28
Figura 7- Tela de captura do software OpenComet, versão 13. A- nucleóide sem danos no DNA e B- nucleóide com danos no DNA.....	29
Figura 8- Avaliação da antigenotoxicidade da FA pelo ensaio do cometa em medula óssea de camundongos co, pré e pós-tratados, usando o parâmetro % de DNA na cauda..	33
Figura 9- Avaliação da antigenotoxicidade da pedunculagina pelo ensaio do cometa em medula óssea de camundongos co, pré e pós-tratados, usando o parâmetro % de DNA na cauda.....	33

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1- Comprovante de submissão do manuscrito.....	45
Anexo 2- Manuscrito submetido à revista <i>Mutation Research</i>	46
Anexo 3- Autorização do comitê de ética da UFG	71

LISTA DE ABREVIATURAS

cm	Centímetro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
MN	Micronúcleo
EPC	Eritrócito Policromático
FA	Fração Aquosa
CP	Ciclofosfamida
mg	Miligrama
kg	Quilograma
p.c.	Peso Corporal
g	Grama
mL	Mililitro
i.p.	Intraperitoneal
ENC	Eritrócito Normocromático
µL	Micro litro
mM	Milimolar
M	Mol
EPCMN	Eritrócito Policromático Micronucleado
Ped.	Pedunculagina

RESUMO

Myrciaria cauliflora (Mart), comumente conhecida como jabuticaba, ocorre em toda América do Sul e especialmente no Brasil. Esta espécie apresenta propriedades medicinais e é popularmente usada para tratar diarreia e doenças respiratórias. A essa espécie já foram atribuídas várias atividades biológicas, tais como: antioxidante, antimutagênica e antiproliferativa. A análise fitoquímica de *M. cauliflora* detectou a presença de vários compostos, incluindo o elagitanino pedunculagina. Devido ao grande uso desta espécie para fins terapêuticos e alimentícios, este estudo teve como objetivo avaliar as ações genotóxica, antigenotóxica, citotóxica e anticitotóxica da fração aquosa (FA) e do composto pedunculagina da semente de *M. cauliflora* pelo teste do micronúcleo e ensaio do cometa em células da medula óssea de camundongos. A fim de avaliar a atividade da FA e da pedunculagina frente aos efeitos genotóxicos da CP, os animais foram co, pré e pós-tratados com essas substâncias. Os resultados mostraram que a FA no tempo de 24 horas não apresentou efeitos genotóxico e citotóxico no teste do micronúcleo e no ensaio do cometa. No tempo de 120 horas, pelo teste do micronúcleo, a FA não mostrou ação genotóxica, porém exibiu efeito citotóxico e pelo ensaio do cometa, a frequência de quebras de DNA foi menor, quando comparada ao controle negativo. Na avaliação dos efeitos da antigenotoxicidade e anticitotoxicidade, em ambos os ensaios, a FA e a pedunculagina mostraram atividades antigenotóxica e anticitotóxica, porém, no pós-tratamento, o composto pedunculagina potencializou o efeito citotóxico da CP. De modo geral, nossos resultados indicaram que a FA e a pedunculagina foram capazes de proteger as células da medula óssea de camundongos contra os danos no DNA induzidos pela CP no teste do micronúcleo e no ensaio do cometa. Esses resultados indicaram que a FA e a pedunculagina podem ser prováveis candidatos para o desenvolvimento de novas drogas.

Palavras- chave: Elagitaninos, teste do micronúcleo, ensaio cometa, ciclofosfamida e efeito antigenotóxico.

ABSTRACT

Myrciaria cauliflora (Mart), commonly known as “Jabuticaba” (Brazilian Grape) occurs in all of South America, especially in Brazil. This species presents medicinal properties and it is popularly used to treat diarrhea and respiratory diseases. It has already been proven several biological activities such as antioxidant, antimutagenic and anti-proliferative. The phytochemical analysis of *M. cauliflora* detected the presence of several compounds, including the ellagitannin pedunculagin. Due to the widespread use of this species for therapeutic and food purposes, this study aimed to evaluate the genotoxic, antigenotoxic, cytotoxic and anticytotoxic actions of the aqueous fraction (AF) and pedunculagin from *M. cauliflora* seed, by micronucleus (MN) test and the comet assay in mice bone marrow cells. In order to analyze AF and pedunculagin activities prior to CP's toxic effects, the animals were co-, pre- and post-treated with these substances. The results showed that AF at 24 h treatment did not show genotoxic or cytotoxic effects in the MN test and comet assay. However, AF showed cytotoxic action, but did not show genotoxic effect at 120 h treatment in the MN test. In the comet assay it was able to significantly reduce the frequency of DNA breaks when compared to the negative control. In the evaluation of the antigenotoxic and anticytotoxic effects, it was observed that in all treatments, in both assays, AF and pedunculagin showed antigenotoxic and anticytotoxic activities, but in the post-treatment pedunculagin increased the cytotoxic effect of CP. In general, our results indicated that AF and pedunculagin were able to protect the mice bone marrow cells against DNA damage induced by CP in the MN test and comet assay. These findings indicated that AF and pedunculagin could be probable candidates for the development of new drugs.

Keywords: Ellagitannins, Micronucleus test, Comet assay, Cyclophosphamide and Antigenotoxic effect.

1. Introdução

A descoberta das propriedades medicinais das plantas acompanhou a evolução do homem e através dos tempos têm revelado amplo potencial no tratamento de numerosas doenças (GASPI et al., 2011). Assim, o uso de plantas medicinais pela população é uma das práticas mais antigas da humanidade e muitas vezes, representa o único recurso terapêutico de diversas comunidades e grupos étnicos (MACIEL et al., 2002). Atualmente há um crescente interesse por parte da indústria médica e farmacêutica em plantas e seus princípios ativos devido às comprovações científicas de suas ações no tratamento de várias patologias (ARNOUS; SANTOS; BREINNER, 2005).

As plantas através de seu metabolismo produzem substâncias com propriedades de cura, prevenção e tratamento de patologias (ARNOUS; SANTOS; BREINNER, 2005). Os vegetais também podem sintetizar substâncias tóxicas ao organismo e que por essa razão devem ser utilizadas com cautela, evitando seus riscos toxicológicos (RODRIGUES et al., 2011). No Brasil, numerosas espécies de plantas têm sido usadas de diferentes formas no tratamento de doenças, sem qualquer evidência ou estudos que comprovem sua atividade terapêutica (HOLETZ et al., 2002). Como pouco se conhece sobre a segurança desses compostos produzidos pelos vegetais, comparados às drogas sintéticas, os seus possíveis efeitos alérgicos e mutagênicos precisam ser investigados (ERNST, 1998). Dentre as numerosas plantas com grande poder de cura e que precisa ser investigada, destaca-se *Myrciaria cauliflora*, popularmente conhecida como jabuticaba.

1.1 *Myrciaria cauliflora* (Mart) O. Berg

Myrciaria cauliflora (Mart) O. Berg da família Myrtaceae (Figura 1) é uma árvore de pequeno porte e popularmente conhecida como jabuticaba. É amplamente distribuída na América do Sul e em especial no Brasil. Suas flores nascem diretamente do tronco e dos caules e seus frutos amadurecem no tempo de 40 a 60 dias. De pericarpo escuro e polpa esbranquiçada, eles possuem diâmetro de 2 a 2,5 cm quando maduros, com presença de 1 a 4 sementes em seu interior. Eles são consumidos tanto *in natura* como processados sob diversas formas, devido às suas características organolépticas agradáveis. Os frutos apresentam altos níveis de minerais (2.8 – 3.8%) e fibras (18 – 19%) (DE LIMA et al., 2008). Suas folhas com nervuras finamente reticuladas têm de 2 a 6 cm de comprimento (LORENZI H et al., 2006).

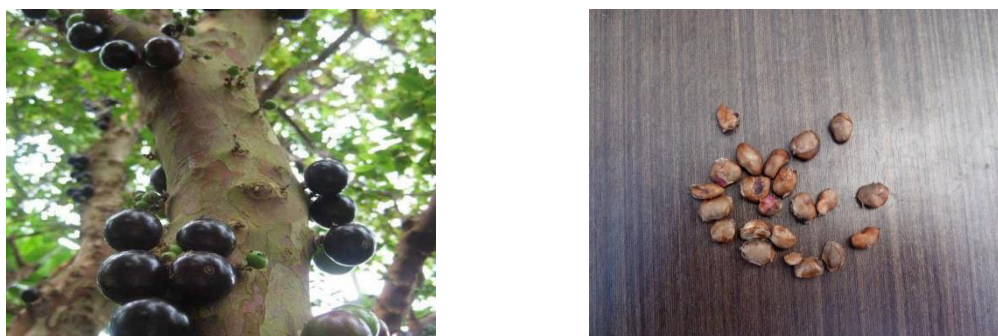


Figura 1- (A) Árvore com frutos e (B) sementes de jaboticaba.

A análise fitoquímica de jaboticaba revelou a presença de compostos voláteis, antocianinas e flavonóides (PLAGEMANN et al., 2012; REYNERTSON et al., 2006; WU et al., 2012). Elagitaninos como estrictinina, casuarina, pedunculagina, vescalagina e castalagina, entre outros, também foram identificados (PEREIRA, LUCIANE D; SANTOS, 2015; WU et al., 2012).

Nos frutos de *M. cauliflora*, os níveis de taninos condensados e hidrolisáveis variam significativamente até que eles se tornem maduros. Nos estágios seguintes essas substâncias se acumulam principalmente nas sementes e na casca, não apresentando alterações em seu conteúdo (FORTES et al., 2011).

Por muito tempo, a planta jaboticaba tem sido usada na medicina popular no Brasil, principalmente no tratamento de bronquite, asma, diarreia, disenteria e inflamação da garganta (REYNERTSON et al., 2006; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

Pesquisas tanto *in vitro* como *in vivo* têm demonstrado que o extrato liofilizado da casca do fruto de *M. jaboticaba* tem propriedades antiproliferativa, antimutagênica e antioxidante (LEITE-LEGATTI et al., 2012). Compostos fenólicos provenientes dessa espécie e de *M. cauliflora*, quando presentes na corrente sanguínea, têm a capacidade de intensificar o potencial antioxidante do plasma sanguíneo, aumentar os níveis do colesterol HDL (*High-density lipoprotein*) e em condições patológicas, diminuir o estresse oxidativo, indicando capacidade preventiva de doenças (ALEZANDRO et al., 2013; LEITE et al., 2011; LEITE-LEGATTI et al., 2012; LENQUISTE et al., 2012; WU; LONG; KENNELLY, 2013). Dentre os principais compostos fenólicos que a espécie *M. cauliflora* produz estão os metabólitos secundários conhecidos como taninos hidrolisáveis (WU et al., 2012).

1.2 Taninos

Os taninos, metabólitos secundários vegetais polifenólicos, estão divididos em duas classes de acordo com sua estrutura química: taninos condensados e hidrolisáveis. Os taninos condensados também conhecidos como proantocianidinas pelo fato de serem decompostos em antocianinas em solução ácida de etanol aquecida, têm procianidina e prodelfinidina como monômeros. Os taninos hidrolisáveis são agrupados em galotaninos e elagitaninos, formados por ésteres de ácido gálico ou de ácido hexa-hidroxidifenoila, respectivamente (KRAUS; DAHLGREN; ZASOSKI, 2003). Enquanto os taninos condensados são biossintetizados em muitas espécies de plantas superiores, os hidrolisáveis estão restritos às angiospermas dicotiledôneas. Elagitaninos foram encontrados apenas nas famílias Myrtaceae, Lythraceae, Onagraceae, Melastomataceae e Combretaceae (OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 1993). Frequentemente, a composição química de taninos hidrolisáveis em uma espécie vegetal é inalterada durante todo o ano. No entanto, alterações sazonais podem modificar as concentrações desses taninos, como foi o caso dos elagitaninos tellimagrandina II, casuarictina e pedunculagina, encontrados em folhas da planta *Liquidambar formosana* (OKUDA et al., 1983).

Os taninos são responsáveis pela adstringência do fruto antes de seu amadurecimento (AKAGI et al., 2010), em virtude da complexação com enzimas salivares (BRESLIN et al., 1993). São substâncias encontradas na casca, nas folhas, sementes, além de outras partes da planta e são armazenadas nos vacúolos das células que se diferenciam durante o desenvolvimento dos órgãos vegetais (YONEMORI; OSHIDA; SUGIURA, 1997).

Plantas ricas em taninos têm sido usadas na medicina popular devido às suas propriedades adstringentes que agem como antidiarreico, antisséptico e impermeabilizante nas camadas expostas da pele e mucosas. Além de suprimirem hemorragias, os taninos podem agir como antídotos em casos de intoxicações. Os taninos também podem impedir o crescimento de microrganismos pela formação de uma camada protetora sobre tecidos epiteliais durante o processo de cura (HASLAM, 1996).

Estudos têm demonstrado que os taninos possuem ação anti-inflamatória e anticarcinogênica (CHUNG; WEI; JOHNSON, 1998), além de poderem inibir a ação da transcriptase reversa em HIV (NONAKA et al., 1990). A presença de grupos hidroxila confere capacidade aos taninos de se complexarem com outras moléculas e por isso podem exercer efeitos benéficos ou não dependendo de sua concentração, natureza e estado fisiológico do organismo. Eles podem se complexar prioritariamente com proteínas e em menor extensão, com íons metálicos, aminoácidos, polissacarídeos e ácidos nucleicos (MAKKAR; FRANCIS;

BECKER, 2007). Essa característica permite com que os taninos possuam várias bioatividades entre as quais a ação antioxidante (ZHENG et al., 2012).

A oxidação é um processo biológico essencial de geração de energia nos organismos vivos, no entanto, o excesso de espécies reativas de oxigênio, produzidas *in vivo* durante reações oxidativas, não estão apenas associadas com a peroxidação lipídica, mas também envolvidas no desenvolvimento de doenças como o câncer, inflamações, aterosclerose e envelhecimento (MOSKOVITZ; YIM; CHOCK, 2002). Assim, o organismo depende de uma série de sistemas antioxidantes para eliminar essas espécies reativas de oxigênio, embora esses sistemas, muitas vezes não são totalmente eficientes. Portanto, as substâncias de origem vegetal, tais como os taninos são excelentes recursos antioxidantes, que podem agir na prevenção de doenças relacionadas aos processos oxidativos (CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011; HAYTOWITZ; BHAGWAT, 2010; LEITE et al., 2011). Dentre as substâncias tânicas com poder de prevenção e cura de patologias, destaca-se o elagitanino pedunculagina (UENO et al., 2002).

1.3 Pedunculagina (2,3-4,6-(S)-hexahidroxi-difenol-D-glicose)

Pedunculagina é membro de uma ampla classe de compostos polifenólicos vegetais hidrolisáveis conhecidos como elagitaninos (FELDMAN; SMITH, 1996). Sua estrutura química consiste em duas porções de (S)-hexahidroxi-difenol (HHDP) localizadas nas posições 2,3 e 4,6-de D-glicose (LIU, 1989).

O composto pedunculagina, pelo ensaio MTT, revelou ser inibidor do crescimento de células tumorais QGY – 7703 e apresentou potente ação antioxidante *in vitro* (UENO et al., 2002), porém não foi capaz inibir o crescimento de células normais de fibroblastos (XIAO et al., 2012). Outros ensaios tanto *in vivo* como *in vitro*, demonstraram que essa molécula foi citotóxica para diversas linhagens de células tumorais, atividade que pode estar relacionada à sua estrutura hexahidroxi-difenol (HHDP), que induz apoptose celular (CHANG, 1995).

O extrato da casca do fruto de romã, contendo pedunculagina e outros elagitaninos, demonstrou efeito antitumor em ratos, atividade relacionada às ações antioxidante e anti-inflamatória, e, além disso, inibiu a ação das enzimas ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, relacionadas com a síntese das prostaglandinas e degradação de lipoproteínas respectivamente (AFAQ et al., 2005). Já o extrato de *Punica granatum*, contendo principalmente ácido elágico (37,01%), pedunculagina (6,40%), punicalagina (5,64%) e o polifenol aslumericolchicina (4,68%), inibiu o crescimento de *Aspergillus flavus*, fungo importante na produção de aflatoxinas (MOSTAFA; AL-RAHMAH; ABDEL-MEGEED, 2011). Tais substâncias que têm recebido

atenção por estarem relacionadas à elevada taxa de morte de animais domésticos e de alguns casos de intoxicações em humanos (PARK; KIM; KIM, 2004).

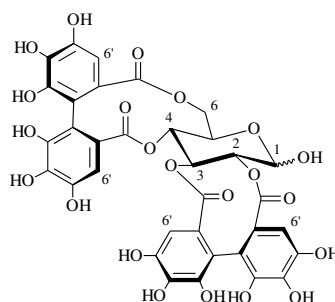


Figura 2- Estrutura química de pedunculagina.

Uma vez que pedunculagina tem potente atividade inibitória da peroxidação lipídica, ela pode constituir uma nova via de tratamento de lesões no fígado e aterosclerose (OKUDA et al., 1983). Outra função que pode estar atribuída a esse composto é sua atividade bactericida, já que, uma mistura de taninos hidrolisáveis contendo principalmente pedunculagina foi capaz de inibir o crescimento de *Helicobacter pylori*, que coloniza o epitélio gástrico humano e pode causar gastrite crônica (FUNATOGAWA et al., 2004).

Assim como a pedunculagina, os vegetais produzem várias substâncias que possuem propriedades farmacológicas e terapêuticas, bem como a possibilidade de causarem lesões no DNA. Vários compostos isolados de plantas utilizados como produtos medicinais apresentam atividades citotóxica e genotóxica e demonstram correlação com a incidência de tumores (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005). Portanto, é de suma importância, antes da utilização de um novo composto terapêutico, realizar testes que avaliem suas atividades genotóxica e citotóxica.

1.4 Genotoxicidade e Antigenotoxicidade

As informações genéticas da maioria dos organismos estão contidas na molécula de DNA, que devem ser estáveis (DENAMUR; MATIC, 2006), reproduzidas e transmitidas às células filhas sem modificações (SCHOFIELD; HSIEH, 2003). No entanto, existem agentes físicos, químicos e biológicos capazes de interagir com o DNA e alterar sua estrutura físico-química, podendo gerar lesões genéticas permanentes que, consequentemente (FELÍCIO et al., 2011) podem causar danos hereditários em células germinativas. Quando estes danos ocorrem em células somáticas e se tornam fixos, a consequência mais comum é a formação de tumores, sejam eles benignos ou malignos (RIVIÈRE et al., 2013). Existem vários tipos de lesões genotóxicas, que podem ser quebras simples, quebras duplas, ligações cruzadas entre as fitas de DNA, entre DNA e proteínas e entre DNA e xenobióticos, distorções na hélice, formação de

dímeros, pontes intercadeias, alquilações, perda e oxidações de bases, além de outras (HOUTGRAAF; VERSMISSEN; GIESSEN, 2006; PAGÈS; FUCHS, 2002; ROOS, 2006). Quando essas alterações se tornam permanentes na sequência de bases do DNA e adquirem a capacidade de serem transmitidas, são denominadas mutações (JACOBS; SCHÄR, 2012; STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2008).

As mutações nas células somáticas podem causar a perda do seu controle proliferativo, ocasionando o aparecimento de doenças degenerativas e nas células germinativas podem acarretar o desenvolvimento de defeitos teratogênicos e desordens hereditárias múltiplas. Dessa forma, a identificação de agentes genotóxicos se torna importante na validação do potencial carcinogênico, já que os mecanismos de mutagênese e carcinogênese estão diretamente relacionados. A mutação é uma consequência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (VIJG, 2000). Portanto, a ingestão de substâncias capazes de prevenir a ação de um composto mutagênico ou ainda impedir a interação do mutágeno com o DNA (BHATTACHARYA, 2011), tem importância relevante na prevenção de várias doenças relacionadas. Assim, o uso de compostos antígenotóxicos e anticarcinogênicos é uma forma de prevenir o surgimento de doenças degenerativas ou neoplásicas e a maioria deles são provenientes de plantas (DA VEIGA, 2008).

Os potenciais genotóxico e antígenotóxico de um composto podem ser avaliados em vários modelos de sistemas biológicos. Os sistemas celulares de mamíferos, utilizados para avaliar efeitos antígenotóxicos ou genotóxicos, envolvem testes *in vivo* como *in vitro* (ANTUNES; ARAÚJO, 2000). Em ambos os testes, o tratamento com agentes antígenotóxico poderá inibir ou atenuar o aparecimento de lesões no DNA causadas por agentes genotóxicos (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

1.5 Teste do Micronúcleo

Dentre os testes capazes de avaliar o potencial genotóxico ou antígenotóxico de substâncias sintéticas ou naturais *in vivo*, tem-se o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos. Este ensaio é amplamente empregado e aceito pela comunidade científica e agências reguladoras, para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (MATEUCA et al., 2006). A princípio, é um método para avaliar a habilidade que a substância teste tem de induzir danos

cromossômicos estruturais ou numéricos, ambos associados com o surgimento ou progressões de tumores (HAYASHI et al., 2007).

A base do teste do micronúcleo (MN) está na observação de células que sofrem alterações na distribuição ou quebra de suas cromátides, devido à ação de agentes genotóxicos. Quando um produto em teste promove aumento da frequência de eritrócitos micronucleados, há a indicação de que ele interfere na divisão nuclear dos eritroblastos da medula óssea, quebrando cromossomos ou interferindo no fuso mitótico (NEPOMUCENO; SILVA, 2010). Durante a anáfase, os fragmentos oriundos das quebras ou cromossomos inteiros, não acompanham a migração para as regiões polares da célula. Na fase seguinte, a telófase, os fragmentos cromatídicos não são inclusos nos núcleos das células filhas, formando um único ou múltiplos micronúcleos no citoplasma dessas células que podem ser detectados (Figura 3) (NEPOMUCENO; SILVA, 2010).

Os MN são analisados em eritrócitos policromáticos (EPC, eritrócitos jovens) de medula óssea de camundongos ou ratos (RIBEIRO; SALVADORI; FENECH, 2003), isso porque essas células têm um tempo de vida relativamente curto, assim, qualquer micronúcleo observado, foi resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente. Além da contagem de micronúcleos em EPC para a avaliação do potencial genotóxico, também é realizada a relação de eritrócitos policromáticos/normocromáticos, usada para avaliar a citotoxicidade (ZEIGER, 2001).



Figura 3- Representação do processo de formação de eritrócitos micronucleados. (RIBEIRO, 2003).

A formação do micronúcleo representa alteração cromossomal e numérica (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003), já que o aumento na frequência de micronúcleo indica aumento nas taxas de mutações, representando aumento da instabilidade genética celular (CARVALHO et al., 2002).

O estresse oxidativo, exposição a agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) ou aneugênicos (que induzem segregação cromossômica anormal), defeitos genéticos nos pontos de checagem do ciclo celular e/ou nos genes de reparo do DNA e também pela deficiência de nutrientes requeridos como co-fatores no metabolismo do DNA e erros na maquinaria da segregação cromossômica, são eventos que levam ao surgimento de MN (BONASSI et al., 2006).

Sob condições experimentais adequadas, os resultados negativos do teste do micronúcleo, mostram que a substância teste não é clastogênica nem aneugênica. Por outro lado, quando os resultados são positivos, indicam que o composto teste apresenta efeito genotóxico (RIBEIRO; SALVADORI; FENECH, 2003). A toxicidade genética não é indicativa de carcinogenicidade, porém existe uma correlação positiva entre o aumento da frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e em humanos (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003).

1.6. Ensaio Cometa

O ensaio cometa, também chamado *Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)*, é um método padrão para avaliar danos no DNA (MCKENNA; MCKEOWN; MCKELVEY-MARTIN, 2008). Este ensaio foi primeiramente descrito por Ostling e Johanson, (1984) e foi denominado como “estudo microeletroforético” de danos no DNA em células individuais e tem sido modificado ao longo dos anos. Atualmente é referido como ensaio cometa (WONG; SZETO; COLLINS, 2005). É uma técnica facilmente exequível e sensível para a detecção de lesões genômicas que podem resultar em mutações, caso não sejam corrigidas. Amplamente utilizada na genética toxicológica por ser um excelente método capaz de detectar um amplo espectro de danos no DNA, esta técnica pode ser adaptável a diversas espécies e é de baixo custo (DHAWAN; BAJPAYEE; PARMAR, 2009; TICE et al., 2000; WITTE et al., 2007).

Essa metodologia apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre as quais a utilização de um pequeno número de células que não estejam necessariamente em divisão (GONÇALVES et al., 2013). Em geral, o ensaio cometa vem sendo apresentado na literatura de maneira combinada ao teste do micronúcleo, uma vez que suas ações

se mostram complementares e úteis na avaliação do reparo do dano de DNA (SERPELONI; MERCADANTE, 2013). Devido às numerosas vantagens do ensaio cometa, essa técnica tem sido amplamente utilizada nos estudos de genotoxicidade de substâncias farmacêuticas, estudos de reparo do DNA e de ecotoxicologia, em sistemas *in vivo* e/ou *in vitro* (LIAO; MCNUTT; ZHU, 2009; PIPERAKIS, 2009).

O ensaio cometa pode detectar várias lesões no material genético, como quebras de fita simples e duplas, ligações cruzadas, sítios de reparo por excisão e/ou lesões alcali-lábeis. Nesse ensaio, as células são englobadas em gel, espalhadas sobre uma lâmina e o genoma nuclear é desenrolado e submetido a uma corrente elétrica que proporciona a migração de segmentos de DNA livres para fora do núcleo. Quebras no DNA causam um relaxamento local do material genético superenrolado, permitindo que alças de DNA sejam arrastadas durante a eletroforese (AZQUETA; SHAPOSHNIKOV; COLLINS, 2009). Dessa maneira, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, (Fig. 4A) formada pelos fragmentos de DNA, por outro lado, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais (Fig. 4B), sem dano detectável no material genético. O DNA danificado formará fragmentos de diversos tamanhos, originando forma similar à de um cometa, com a cauda correspondendo aos fragmentos que migraram (TICE et al., 2000).

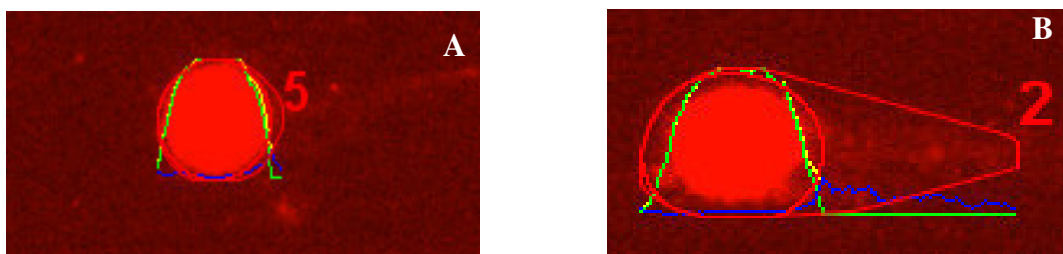


Figura 4- Imagens de nucleóides do pós-tratamento da medula óssea de camundongos tratados com o composto pedunculagina. Figura 4-A, nucleóide sem danos no DNA e figura 4-B nucleóide com danos no DNA.

A técnica do cometa avalia os danos no DNA de células individuais causados pela substância testada. Nesse teste, é verificada a corrida de fragmentos de DNA em relação ao núcleo principal, quando este é submetido a uma corrente em eletroforese (TICE et al., 2000). A identificação do dano no DNA pode ser feita medindo o comprimento da região danificada do DNA, ou ainda classificando, visualmente, em diferentes níveis de dano, as células analisadas, podendo obter valores que expressem o dano geral sofrido por uma população de células (SILVA, 2007).

Há duas versões do Ensaio Cometa: a neutra, que detecta apenas lesões de fita dupla de DNA; e a alcalina, descrita por Singh et al., (1988) que pode detectar uma maior variedade de lesões de DNA, como quebras de fita simples, lesões de sítios alcalinos lábeis, locais de reparos incompletos e crosslinks. Os cometas resultantes da corrida eletroforética do DNA necessitam passar por um processo de coloração, que pode ser feito usando substâncias como brometo de etídio, iodeto de propídio ou SYBR Gold e posteriormente as imagens são capturadas pelo microscópio de fluorescência (BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009; DUSINSKA; COLLINS, 2008).

Para a visualização do dano no DNA, em geral, são analisadas 100 células por indivíduo. As lâminas são feitas em duplicata, sendo contadas 50 células em cada lâmina. As lâminas são analisadas em aumento de 40x com microscópio de fluorescência. As principais limitações desse teste são: (i) não é um teste de mutação, pois o dano pode ser reparado; (ii) por ser muito sensível, deve-se ter cautela durante a análise dos resultados e (iii) o tempo decorrido entre exposição ao mutágeno e a preparação das lâminas, até a lise, deve ser curto (24 horas no máximo) (VILLELA et al., 2003).

O uso do ensaio cometa associado ao teste de micronúcleo é muito recomendado. Enquanto o ensaio cometa detecta lesões reversíveis, o teste do micronúcleo detecta lesões mais persistentes no DNA ou efeitos aneugênicos que não podem ser reparados (HARTMANN et al., 2003). Os danos mensurados pelo ensaio cometa aparecem mais cedo do que os micronúcleos, que requerem uma divisão celular para serem visualizados (DUSINSKA; COLLINS, 2008). Diante disso, destaca-se a importância de ter sido avaliado, no presente trabalho, a ação genotóxica e antigenotóxica da Fração Aquosa (FA) e do composto pedunculagina da semente de jabuticaba pelo teste do micronúcleo e ensaio cometa em medula óssea de camundongos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos citotóxico, anticitotóxico, genotóxico e antigenotóxico da fração aquosa da semente de *M. cauliflora* e de seu composto pedunculagina, pelo teste do micronúcleo e ensaio cometa em medula óssea de camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a atividade genotóxica e antigenotóxica da fração aquosa pelo Teste do Micronúcleo em Medula Óssea de Camundongos *in vivo*.
- ✓ Avaliar a atividade genotóxica e antigenotóxica da fração aquosa pelo Ensaio Cometa em Medula Óssea de Camundongos *in vivo*.
- ✓ Avaliar a atividade antigenotóxica do composto pedunculagina pelo Teste do Micronúcleo em Medula Óssea de Camundongos *in vivo*;
- ✓ Avaliar a atividade antigenotóxica do composto pedunculagina pelo Ensaio Cometa em Medula Óssea de Camundongos *in vivo*.

3. Material e Métodos

3.1 Controles

Tanto para o teste do micronúcleo quanto para o ensaio cometa foram utilizados como controle positivo Ciclofosfamida (CP) e como controle negativo água destilada estéril.

3.2 Fração Aquosa Purificada da Semente de *Myrciaria cauliflora* (Mart) O. Berg e seu composto pedunculagina

A fração aquosa purificada (FA) da semente *M. cauliflora* e o composto pedunculagina, usados em ambos os ensaios (micronúcleo e cometa), foram obtidos no laboratório de Bioatividade Molecular do Instituto de Química da UFG.

As doses da FA da semente de jabuticaba foram de 30 e 300mg/kg e do seu composto pedunculagina foi de 30mg/kg por peso corporal (p.c), com base em avaliações preliminares, ambos foram pesados e diluídos em água destilada, em seguida, as soluções foram administradas via gavagem.

3.3 Reagentes e Soluções do Teste do Micronúcleo

3.3.1 Tampão Fosfato

Solução A

- ✓ Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) - 17,9g
- ✓ Água destilada (H_2O) – 100 mL

Solução B

- ✓ Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) - 34,5g
- ✓ Água destilada (H_2O) – 500 mL

Foram adicionados 74 mL da solução A (fosfato de sódio dibásico) a 426 mL da solução B (Fosfato de sódio monobásico) acrescentando 1500 mL de água destilada pH = 6,8.

3.3.2 Corante/ composição

- ✓ Giemsa – 9 mL
- ✓ Tampão fosfato – 100 mL
- ✓ Água destilada – 100 ml

Após preparação esta solução foi filtrada em papel filtro e usada imediatamente.

3.3.3 Fixador

- ✓ Metanol (CH_4O)

3.3.4 Solubilização das Células

- ✓ Soro fetal bovino

3.4 Reagentes e Soluções do Ensaio Cometa

3.4.1 Solução Estoque/ Tampão Fosfato-Salino (PBS)

- ✓ Água deionizada – 1000 mL
- ✓ Cloreto de sódio (NaCl) – 0,2g
- ✓ Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) – 8g
- ✓ Tris – 1,15g
- ✓ Hidróxido de sódio (NaOH) – 0,2g

3.4.2 Solução de Lise (estoque)

- ✓ Água deionizada - 890 mL
- ✓ Cloreto de sódio (NaCl) - 146,1g
- ✓ Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) - 37,2g
- ✓ TRIS - 1,2g
- ✓ Hidróxido de sódio (NaOH) - 8g
- ✓ Lauril - 10g

3.4.3 Solução de Lise (uso)

- ✓ TRITON X-100 - 1 mL
- ✓ DMSO - 10 mL
- ✓ Solução estoque - 89 mL

3.4.4 Tampão de Eletroforese

- ✓ Hidróxido de sódio (NaOH) - 10,8g
- ✓ Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) - 4,5 mL
- ✓ Água deionizada - 900 mL

3.4.5 Tampão de Neutralização

- ✓ TRIS - 24, 25g
- ✓ Água deionizada - 475 mL

3.4.6 Solução de Coloração (estoque)

- ✓ Brometo de Etídio - 10 mg
- ✓ Água deionizada - 50 mL

3.2.7 Solução de Coloração (uso)

- ✓ Solução estoque - 1 mL
- ✓ Água deionizada - 9 mL

3.2.8 Agarose Normal

- ✓ Agarose - 1,5g
- ✓ PBS - 100 mL

3.2.9 Agarose de Baixo Ponto de Fusão (*low-melting*)

- ✓ Agarose LMR - 0,1g
- ✓ PBS - 20 mL

4. Procedimento Experimental

4.1 Obtenção e Organização dos Animais

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-PRPPG-UFG, protocolo nº. 115/14.

Foram utilizados 65 camundongos *Mus musculus* “Swiss Webster” “out bred”, machos, de 7 – 12 semanas de idade, pesando entre 30 e 40 g, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás, divididos em 13 grupos. Antes da realização do experimento, os animais permaneceram por 5 dias no laboratório, onde foram mantidos em gaiolas de polipropileno de dimensão de 40 x 30 x 16 cm com 5 animais em cada, forradas com maravalha autoclavada, trocada diariamente, e alimentados com ração comercial e água filtrada, ambos oferecidos *ad libitum*. Os animais foram mantidos a temperatura ambiente de 25 °C, umidade 50 ± 20 % e um ciclo de luz 12 h claro/12 h escuro.

4.2. Teste do Micronúcleo

Para investigar os efeitos genotóxico e antigenotóxico da FA e do composto pedunculagina, pelo teste do MN *in vivo*, seguiu-se o protocolo de MacGregor et al., (1987). Os animais foram divididos em 13 grupos com cinco animais cada e pesados antes da administração dos compostos. Os animais do grupo 1, controle negativo foram tratados apenas com água destilada via gavagem (0.15mL), que foi usada como diluente. O grupo 2, controle positivo recebeu via intraperitoneal (i.p), uma dose de 50mg/Kg por peso corporal de ciclofosfamida.

O experimento foi realizado de acordo com a distribuição dos grupos de animais em cada tratamento a seguir:

Co-tratamento: animais do grupo 3 foram tratados com 300 mg/Kg da FA para a avaliação da genotoxicidade, e os animais dos grupos 5, 6 e 11 receberam, respectivamente 30 e 300 mg/kg da FA e 30 mg/kg de pedunculagina juntamente com a CP para a avaliação da antigenotoxicidade.

Pré-tratamento: os animais do grupo 4 receberam 300 mg/kg da FA por cinco dias para a avaliação da genotoxicidade, já os animais dos grupos 7 e 8 receberam 30 e 300 mg/Kg da FA e os do grupo 12, uma dose de 30 mg/kg de pedunculagina durante 5 dias. No quinto dia, 2 horas depois da administração dos compostos teste, os animais dos grupos 7, 8 e 12 foram tratados com CP para a avaliação da antigenotoxicidade.

Pós-tratamento: animais dos grupos 9, 10 e 13 foram tratados com CP e depois de 2 horas, eles receberam doses de 30 e 300 mg/kg da FA e dose de 30 mg/kg do composto pedunculagina, respectivamente, também para a avaliação da antigenotoxicidade.

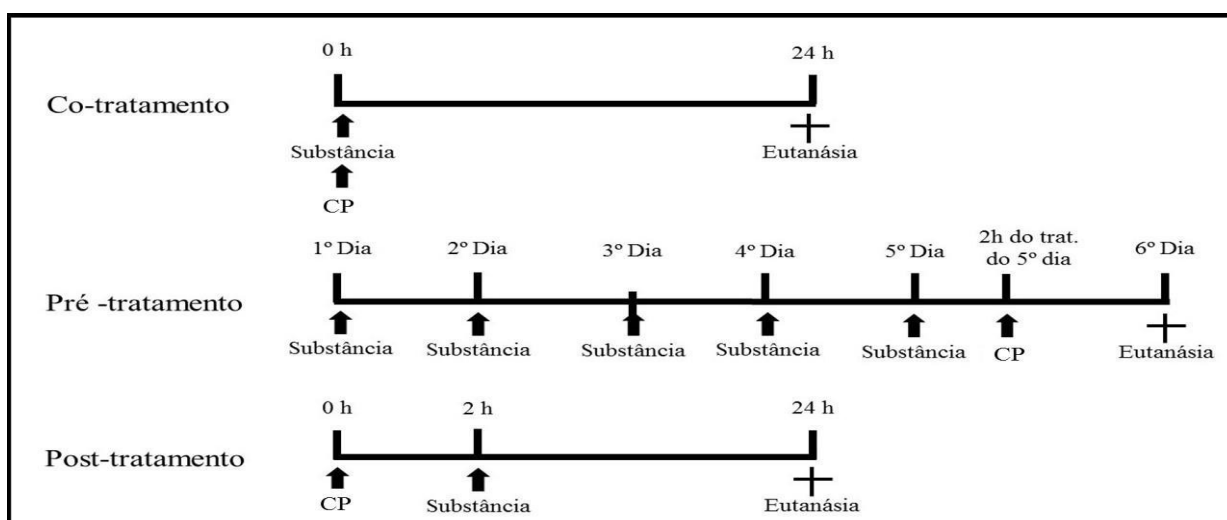


Figura 5- Representação dos experimentos realizados em camundongos.

Todos os grupos de animais foram sacrificados pelo deslocamento cervical após vinte e quatro horas (24h) de tratamento (Figura 5) e os fêmures foram então retirados. As epífises dos fêmures foram cortadas e a medula óssea lavada com 1,0 mL de soro fetal bovino. Após homogeneização da medula no soro, esta foi centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi parcialmente descartado. O precipitado de células foi homogeneizado com pipeta Pasteur. Uma gota de suspensão celular foi transferida para a lâmina de vidro onde foi feito o esfregaço celular. Após secagem das lâminas, estas foram fixadas em metanol absoluto durante 5 minutos e coradas em soluções de Giemsa tamponada com pH 6,8 por um período de

15 minutos. Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar em condições ambientais.

Para a avaliação da frequência de micronúcleos, duas lâminas por animal foram examinadas de acordo com o método de Macgregor et al., 1987. A análise citogenética foi realizada em microscópio de luz com a objetiva de 1000x, usando óleo de imersão. Em cada lâmina foram contabilizados 1000 eritrócitos policromáticos (EPC), totalizando 2000 por animal com a finalidade de detectar micronúcleos nesse tipo de célula (Figura 4). O número de eritrócitos normocromáticos (ENC) também foi contabilizado, com o objetivo de avaliar a citotoxicidade pela relação de EPC/ENC, que é indicada pela redução significativa na porcentagem de EPC.



Figura 6- Fotografia de eritrócito policromático micronucleado (seta) (ROLL, 2005)

4.3 Ensaio Cometa ou *Single Cell Gel Electrophoresis* (SGE)

O ensaio cometa foi feito usando o método alcalino baseado nos métodos de Singh et al. (1988) e Attia et al. (2014) com algumas modificações.

Lâminas de pré-cobertura foram preparadas por imersão em solução contendo 100 mL de PBS (tampão fosfato-salino) e 1,5 g de agarose padrão e posteriormente foram deixadas para solidificação durante 24 horas em temperatura ambiente. As células da medula óssea dos camundongos do teste do micronúcleo foram também utilizadas para a realização do ensaio do cometa. Após a centrifugação (1000 rpm por 5 minutos) dessas células, 10 μ L da solução da medula óssea foram homogeneizados com 120 μ L de agarose *low-melting* (0,5%) e imediatamente espalhados sobre as lâminas de pré-cobertura e acrescidas de lamínulas.

Essas lâminas foram mantidas a 4°C por 5 minutos para solidificação da solução da medula óssea. Após este período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram incubadas em uma solução de lise (2,5M NaCl, 10mM Tris, 100mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA),

1% Triton X-100 e 10% dimetilsulfóxido (DMSO), pH 10) e colocadas a 4°C por 24 horas para remover proteínas e membranas. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em tampão de eletroforese (300mM NaOH, 1mM EDTA, pH > 13,0) por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a corrida de eletroforese por 25 minutos, a 0,9 V/cm e 300 mA e a 4°C. Todo o procedimento foi feito no escuro para evitar danos ao DNA. Após a corrida eletroforética, as lâminas foram mergulhadas em solução de neutralização (0,4M Tris, pH 7,5), lavadas com água destilada e secas a temperatura ambiente.

Para a captura das imagens, as lâminas foram coradas com 20 µL de brometo de etídio (0,02 mg/mL), 5 minutos antes da análise. Foram preparadas duas lâminas por animal e 100 nucleóides foram analisados (50 nucleóides para cada lâmina), utilizando microscópio de fluorescência Axioplan - Imaging® usando o *software* Isis com um filtro de excitação de 510-560 nm e um filtro barreira de 590 nm no aumento de 200 X.

Os nucleóides foram avaliados pelo *software* OpenComet, versão 1.3 (Figura 7) que fornece 17 parâmetros para avaliação da genotoxicidade. Dentre estes, foi selecionado a porcentagem de DNA na cauda, que está entre os parâmetros mais utilizados (TRIPATHI et al., 2008).

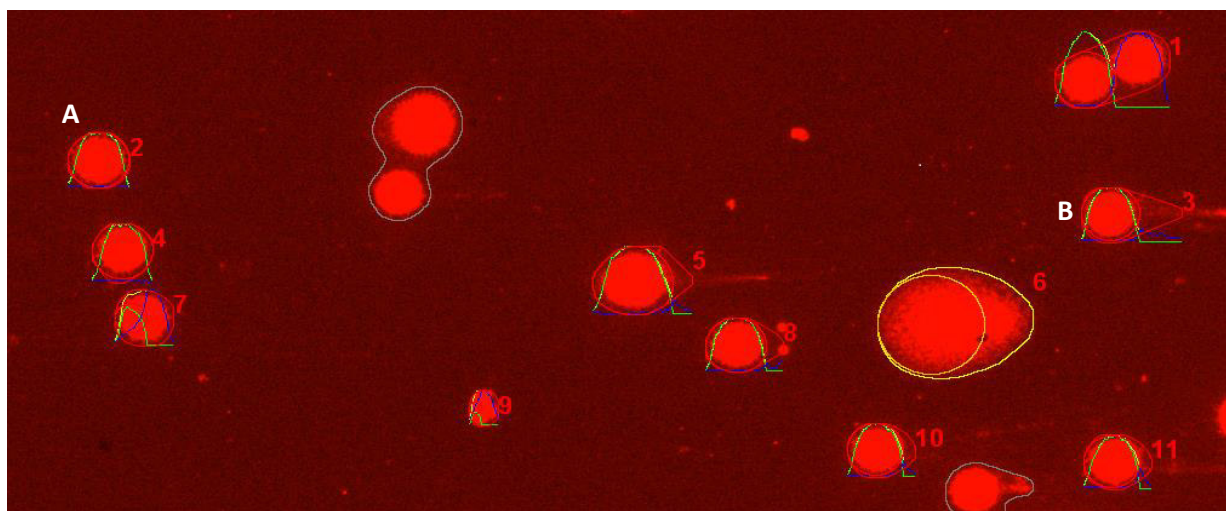


Figura 7- Tela de captura do software OpenComet, versão 1.3. A- nucleóide sem danos no DNA e B- nucleóide com danos no DNA.

4.4 Análises Estatísticas

Para análise estatística do teste do micronúcleo, a avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade foi realizada por meio da comparação das frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) dos grupos tratados, em relação ao grupo controle negativo (genotoxicidade) ou positivo (antigenotoxicidade) pelo teste ANOVA. Em seguida, foi

utilizado o teste de comparação múltipla (teste de Tukey). Para a avaliação da citotoxicidade e anticitotoxicidade as frequências de EPC/ENC de cada grupo foram comparadas pelo teste Qui-quadrado. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa SigmaStat 3.5.

A porcentagem de redução da antigenotóxicidade da fração e do composto pedunculagina, no teste do micronúcleo, foi calculada de acordo com Waters et al. (1990), usando a seguinte fórmula:

$$\text{Redução (\%)} = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

- A: corresponde a média de EPCMN observada no tratamento com a CP (controle positivo);
- B: corresponde a média de EPCMN observada no tratamento (FA ou pedunculagina + CP);
- C: corresponde a média de EPCMN do controle negativo (água destilada).

5. Resultados

5.1 Teste do Micronúcleo em Medula Óssea de Camundongos

A tabela 1 mostra as médias das frequências de EPCMN, a razão de EPC/ENC e a porcentagem de redução de EPCMN em medula óssea de camundongos co-, pré- e pós-tratados com FA.

Na investigação da genotoxicidade da fração aquosa na dose de 300mg/kg, expressa pela média das frequências de EPCMN, não foi constatada diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle negativo nos tratamentos de 24 e 120 horas.

Para a análise dos resultados da citotoxicidade da fração aquosa (dose 300mg/kg) foi realizado o teste do qui-quadrado. A razão entre EPC/ENC para a AF, no tempo de 24 horas, não foi significativamente diferente em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$), já no tempo de 120 horas, essa mesma dose comparada ao controle negativo, mostrou efeito citotóxico ($p < 0,05$).

As frequências de EPCMN nos co-, pré- e pós-tratamentos para as doses de 30 e 300 mg/kg da FA, foram significativamente menores ($p < 0,05$) em relação à frequência de EPCMN do controle positivo (CP), revelando ação antigenotóxica de ambas as doses nos diferentes tipos de tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1-Efeito dos tratamentos com a fração aquosa (FA) na indução da frequência de EPCMN e a razão entre EPC/ENC.

Grupo	Tratamentos (mg/kg)	EPCMN/ 2,000 PCE (Média ± SD)	Redução de MNPCE (%)	PCE/NCE (Média ± SD)
1	Controle Negativo (H ₂ O)	4,2 ± 0,45	-	1,03 ± 0,03
2	Controle Positivo (CP)	27,2 ± 1,3 ^a	-	0,71 ± 0,02 ^a
<i>Genotoxicidade e citotoxicidade</i>				
3	FA 300 (24 hours)	4,8 ± 0,83	-	1,16 ± 0,04
4	FA 300 (120 hours)*	5,4 ± 1,14	-	0,80 ± 0,21 ^a
<i>Co-tratamento</i>				
5	FA 30 + CP	4,8 ± 0,83 ^b	97 %	0,91 ± 0,32 ^b
6	FA 300 + CP	6,0 ± 1,41 ^b	92 %	0,91 ± 0,27 ^b
<i>Pré-tratamento</i>				
7	FA 30 + CP	6,0 ± 0,70 ^b	92 %	1,01 ± 0,11 ^b
8	FA 300 + CP	7,4 ± 1,14 ^b	86 %	1,07 ± 0,10 ^b
<i>Pós-tratamento</i>				
9	FA 30 + CP	4,4 ± 0,89 ^b	99%	0,90 ± 0,13 ^b
10	FA 300 + CP	5,0. ± 1,00 ^b	97%	0,83 ± 0,15 ^b

Todos os valores são médias ± desvio padrão de 5 camundongos. Um total de 2000 EPCs foram contados por animal para o teste do micronúcleo. A FA e CP foram diluídos em água destilada e administrados via gavage e intraperitonal respectivamente.

* Animais que foram tratados com a dose de 300 mg/kg durante cinco dias consecutivos.

^a Diferença significativa do controle negativo (H₂O) ($p < 0,001$).

^b Diferença significativa da ciclofosfamida (CP) ($p < 0,001$).

As razões entre EPC/ENC, da FA nas doses de 30 e 300 mg/kg, foram significativamente maiores em relação ao grupo controle positivo ($p < 0,05$). Isso demonstrou que ambas as doses apresentaram efeito anticitotóxico, reduzindo o efeito tóxico da CP sobre as células, em todos os tipos de tratamentos realizados.

Os resultados da avaliação das ações antigenotóxica e anticitotóxica da pedunculagina, na dose de 30mg/Kg, podem ser observados na tabela 2. Os resultados obtidos para a atividade antigenotóxica para os co, pré e pós-tratamentos demonstraram que esse composto foi antigenotóxico quando comparado ao controle positivo ($p < 0,05$) e teve redução significativa de 99, 94 e 102% de EPCMN nos co, pré e pós-tratamentos.

Tabela 2- Efeito dos tratamentos com Pedunculagina (Ped.) na indução da frequência de EPCMN e a razão de EPC/ENC.

Grupo	Tratamentos (mg/kg)	EPCMN/ 2,000 PCE (Mean $\pm$ SD)	MNPCE Redução (%)	EPC/ENC (Mean $\pm$ SD)
1	Controle Negativo (H ₂ O)	4,2 $\pm$ 0,45	-	1,03 $\pm$ 0,03
2	Controle Positivo (CP)	27,2 $\pm$ 1,30 ^a	-	0,71 $\pm$ 0,02 ^a
	<i>Co-tratamento</i>			
11	Ped. 30 + CP	4,4 $\pm$ 0,54 ^b	99 %	0,91 $\pm$ 0,34 ^b
	<i>Pré-tratamento</i>			
12	Ped. 30 + CP	5,6 $\pm$ 0,84 ^b	94 %	0,90 $\pm$ 0,30 ^b
	<i>Pós-tratamento</i>			
13	Ped. 30 + CP	3,8 $\pm$ 0,83 ^b	102 %	0,59 $\pm$ 0,26 ^b

Todos os valores são médias $\pm$ desvios padrão de cinco animais. Um total de 2000 EPC foram contados por animal para o teste de micronúcleo. Pedunculagina e ciclofosfamida (CP) foram diluídos em água destilada e administrados via gavagem e intraperitoneal respectivamente. Os testes ANOVA, Tukey's e Qui-square foram realizados para a análise estatística dos resultados.

^a Significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,001$).

^b Significativamente diferente do controle positivo (CP) ($p < 0,001$).

Nos co- e pré-tratamentos para a análise da anticitotoxicidade da pedunculagina, foi observado aumento significativo da razão de EPC/ENC, quando comparado com os resultados da ciclofosfamida, sendo, portanto, anticitotóxica. No entanto, no pós-tratamento a razão entre esses dois tipos de células (EPC/ENC), foi significativamente reduzida, mostrando um alto grau de citotoxicidade.

5.2 Ensaio Cometa em Medula Óssea de Camundongos

Os resultados obtidos da avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica da FA pelo ensaio do cometa, estão mostrados na figura 8.

Na investigação do efeito genotóxico da FA, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre a dose de 300mg/kg e o controle negativo, no tratamento de 24 horas. Por outro lado, essa mesma dose apresentou redução significativa de danos no DNA no tratamento de 120 horas (cinco dias consecutivos), comparado ao controle negativo ($p < 0,001$).

Os resultados da avaliação da ação antigenotóxica da pedunculagina na dose de 30 mg/Kg (Fig. 9) e da FA nas doses de 30 e 300 mg/Kg (Fig. 8), demonstraram que houve redução

significativa ($p < 0,001$) no número de células com DNA lesionado em comparação ao controle positivo nos co-, pós- e pré-tratamentos. Entre esses tratamentos, o pré-tratamento foi o mais efetivo em reduzir os danos no DNA induzidos pela CP, tanto para a FA como para a pedunculagina.

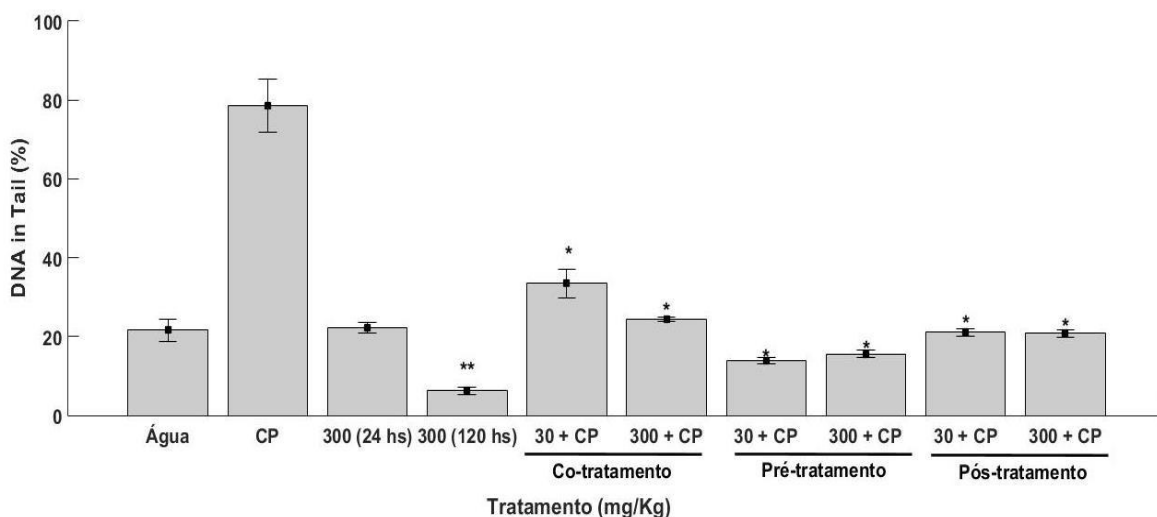


Figura 8- Avaliação da antigenotoxicidade da FA pelo ensaio do cometa em medula óssea de camundongos co, pré e pós-tratados, usando o parâmetro % de DNA na cauda. Água destilada (controle negativo); CP (controle positivo) (50mg/kg). * $p < 0,001$ comparado ao controle positivo; ** $p < 0,05$ comparado ao controle negativo.

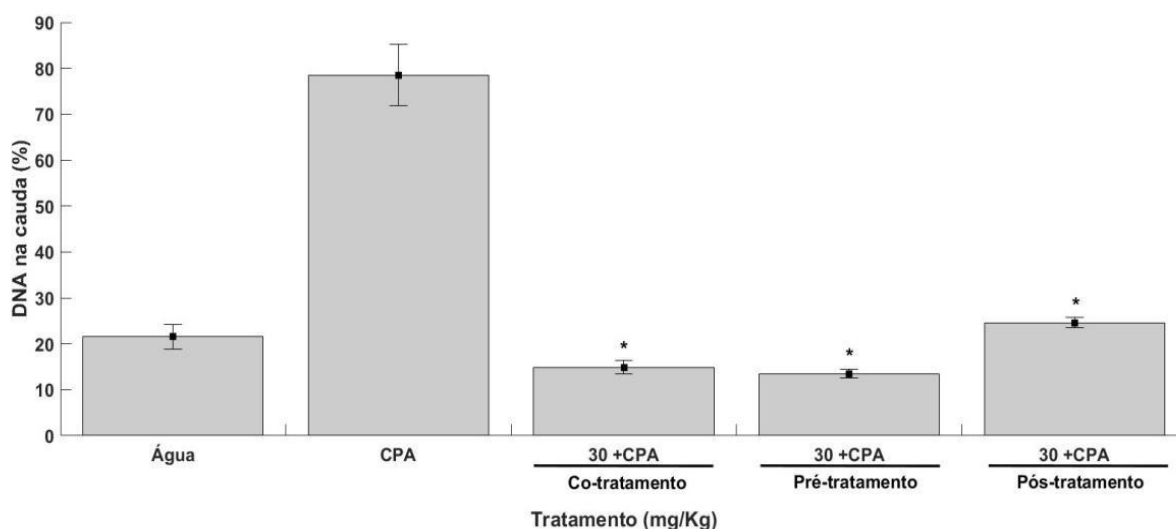


Figura 9- Avaliação da antigenotoxicidade da pedunculagina pelo ensaio do cometa em medula óssea de camundongos co, pré e pós-tratados, usando o parâmetro % de DNA na cauda. Água destilada (controle negativo); CP (controle positivo) (50mg/kg). * $p < 0,001$ comparado ao controle positivo.

6. Discussão

Os testes aplicados na genética toxicológica são ensaios utilizados para detectar compostos que induzem danos genéticos direta ou indiretamente e também são utilizados para identificar substâncias antigenotóxicas. Assim, a identificação de efeitos genotóxicos, antigenotóxicos, citotóxicos e anticitotóxicos de qualquer substância é importante para avaliar o risco/benefício de seu potencial uso em humanos (ALVES et al., 2014). Com esta finalidade, no presente estudo, foram realizados testes *in vivo* com abordagens diferentes, para avaliar a toxicidade genética e o possível efeito quimioprotetor da fração aquosa (FA) da semente de jabuticaba e de seu composto, o elagitanino pedunculagina (2,3-4,6-Di-(S)-hexahidroxi-difenil-D-glicose), contra danos causados no DNA pelo agente ciclofosfamida.

Para avaliar a ação antigenotóxica e genotóxica da FA e do elagitanino pedunculagina, foram utilizados o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa em medula óssea de camundongos. O teste do micronúcleo é empregado para detectar efeitos de agentes clastogênicos, aneugênicos e citotóxicos de substâncias naturais ou sintéticas (VILAR et al., 2008). Além disso, este teste é usado para avaliar a genotoxicidade de poluentes ambientais, agrotóxicos e outros possíveis agentes indutores de lesões, já que os micronúcleos são facilmente visualizados nos eritrócitos e são indicativos de aberrações cromossômicas (CAMPANA et al., 2003). O ensaio do cometa é usado para quantificar quebras ocasionadas por substâncias que lesionam o material genético, além de possibilitar, indiretamente, inferências sobre os mecanismos de reparo no DNA (SILVA, 2007).

No teste do micronúcleo e ensaio do cometa, a FA na dose de 300mg/Kg, não foi capaz de induzir genotoxicidade e citotoxicidade no tratamento de 24 horas. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que relataram a ausência de ação genotóxica de taninos e outros compostos fenólicos usando o teste de mutagenicidade de Ames em bactérias, o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa em camundongos (HANUSCH et al., 2015; OKUDA, 2005; SILVA et al., 2014). Por outro lado, no tratamento de 120 horas (cinco dias consecutivos) com dose diária de 300mg/Kg, pelo teste do micronúcleo, a FA não apresentou ação genotóxica, porém foi citotóxica, possivelmente devido ao seu efeito cumulativo. Este mesmo tratamento no ensaio do cometa mostrou uma redução significativa na porcentagem de quebras no DNA, que foi até menor do que no grupo controle negativo. Este efeito está de acordo com estudo que mostrou ação citotóxica de substâncias tânicas quando administradas em altas concentrações por longos períodos (SILVA et al., 2014). Outros estudos também relataram ação citotóxica de

taninos, quando administrados oralmente, possivelmente devido ao acúmulo de produtos de sua hidrólise no trato gastrointestinal (LABIENIEC; GABRYELAK, 2003).

Para avaliar a atividade antigenotóxica tanto da FA, como do composto pedunculagina, foi utilizado ciclofosfamida, um agente alquilante capaz de dar origem a eventos clastogênicos e aneugênicos. Esse agente pertencente ao grupo das mostardas nitrogenadas, que atua incorporando um grupamento alquila ao DNA, formando ligações cruzadas nas cadeias, resultando em quebra cromossomal ou morte celular (HEGARAT et al., 2010). Como esperado, no teste do micronúcleo, os animais tratados apenas com a ciclofosfamida (CP) mostraram alta frequência de EPCMN (Tabela 1) e no ensaio do cometa, um alto índice de células com material genético danificado (Fig. 8 e 9), quando comparados aos grupos controles negativos de ambos os testes.

Os resultados obtidos da antigenotoxicidade e anticitotoxicidade mostraram que a FA foi capaz de reduzir os efeitos da CP em todos os tratamentos (Tab. 1). Uma possível explicação para este efeito protetor pode estar relacionado à interação da FA com a CP, que possivelmente impediu que metabólitos genotóxicos da CP interagissem com o DNA, já que os taninos têm demonstrado grande capacidade de interagir com muitas moléculas (MAKKAR; FRANCIS; BECKER, 2007). Estudos também têm relatado que muitos elagitânicos e produtos de sua hidrólise, como o ácido gálico, apresentam potencial antimutagênico, provavelmente ligando-se diretamente ao mutágeno (BERNI et al., 2012; OKUDA; MORI; HAYATSU, 1984; OKUDA, 2005) ou de forma indireta, reduzindo a interação do mutágeno com a molécula de DNA (BHATTACHARYA, 2011).

No co-tratamento (CP + FA), pelo ensaio do cometa, a FA mostrou ação antigenotóxica, porém efeito relativamente menor que os demais tratamentos. Estes resultados estão de acordo com os de Alves et al. (2014), que ao realizarem a administração concomitante do extrato etanólico, contendo principalmente substâncias tânicas com o mutágeno CP pelo teste do micronúcleo, também observaram redução significativa na frequência de EPCMN.

No pré-tratamento, pelo ensaio do cometa, a FA mostrou um menor número de quebras de DNA e no teste do MN a porcentagem de redução de EPCMN foi maior que 80%. Provavelmente estes resultados podem estar relacionados ao efeito protetor da FA quando administrada por longo período de tempo. De acordo com Berni et al. (2012), a administração oral de ácido elágico durante cinco dias, também não foi capaz de induzir a formação de micronúcleo em medula óssea de camundongos. Da mesma forma o extrato de *Eugenia stipitata*, contendo principalmente substâncias fenólicas, mostrou potente ação antigenotóxica contra os

efeitos genotóxico e citotóxico da ciclofosfamida pelo teste do micronúcleo, quando os animais foram pré-tratados (NERI-NUMA et al., 2013).

A FA no pós-tratamento, pelo ensaio cometa apresentou uma diminuição significativa na porcentagem de quebras no DNA e pelo teste do micronúcleo foi capaz de reduzir mais de 90% a frequência de EPCMN, mesmo depois de uma exposição prévia das células da medula óssea de camundongos à CP. Este efeito protetor da FA pode ser explicado principalmente pela indução ou ativação direta ou indireta de enzimas de reparo do DNA (BHATTACHARYA, 2011) pelos elagitaninos presentes na FA (CHAKRABORTY; ROY; BHATTACHARYA, 2004).

O composto pedunculagina, tanto no teste do micronúcleo como no ensaio do cometa nos co e pré-tratamentos foi capaz de reduzir significativamente a ação genotóxica da CP, quando comparado ao controle positivo (Tab. 2 e Fig. 2). Essa capacidade pode estar relacionada ao poder antioxidante dos taninos, que é importante para proteger a célula contra danos oxidativos (CHUNG et al., 1998). Leite et al. (2011) relataram que o potencial antioxidante no plasma sanguíneo de ratos aumentou em 1,7 vezes, mensurado pelo ensaio TEAC (*total radical trapping antioxidant parameter assay*) e 1,3 vezes pelo ensaio ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*), após a administração oral do extrato liofilizado da casca de jabuticaba, contendo principalmente substâncias tânicas.

No teste do micronúcleo, no pós-tratamento, a substância pedunculagina, demonstrou expressiva ação antigenotóxica e significativo efeito citotóxico (Tab. 2). Pelo ensaio do cometa, também mostrou ação de proteção contra danos na molécula de DNA induzidos pela CP (Fig. 9). Estes resultados sugerem uma alta eficiência do sistema de reparo do DNA na presença desse composto. Similarmente, o ácido elágico, produto da hidrólise de elagitaninos foi capaz de recuperar danos no DNA induzidos pelo mutágeno MNNG em células de fibroblastos do pulmão de Hamster, possivelmente também pela indução do sistema de reparo do DNA (CHAKRABORTY; ROY; BHATTACHARYA, 2004).

Em estudos realizados anteriormente por Chan et al. (1995), foi demonstrado que o composto pedunculagina apresentou atividade antitumoral contra vários tipos de células cancerígenas, tanto em testes *in vivo* como *in vitro*. Além disso, pedunculagina foi capaz de inibir o crescimento de células cancerígenas de fígado humano, porém não interferiu no crescimento celular de fibroblastos normais (XIAO et al., 2012).

Substâncias citotóxicas, utilizadas na quimioterapia, como a CP, apresentam mecanismos de ação com base em seus efeitos genotóxicos, que representam risco em potencial para os pacientes. Os nossos resultados mostraram que FA foi antigenotóxica e anticitotóxica em todos

os tratamentos, atenuando os efeitos nocivos desse quimioterápico sobre as células da medula óssea de camundongos, tanto no teste do micronúcleo como no ensaio cometa. No entanto, o composto pedunculagina, apesar de ter sido antigenotóxico em todos os tratamentos em ambos os ensaios, no pós-tratamento, no teste do micronúcleo potencializou os efeitos tóxicos da CP, possivelmente pela sua associação com a CP (outro antitumor), levando um aumento no efeito citotóxico pela maior indução da apoptose (KANO et al., 2000; NASTOUPIL; SINHA; FLOWERS, 2013).

7. Conclusão

Nossos estudos demonstraram que tanto no teste do micronúcleo como no ensaio cometa a FA e a pedunculagina mostraram atividades antígenotóxica e anticitotóxica, porém, no pós-tratamento, no teste do micronúcleo, o composto pedunculagina demonstrou efeito citotóxico. No entanto, o aspecto mais relevante no presente estudo é que estes compostos não somente protegeram danos no DNA, como também atuaram na recuperação de lesões nas células danificadas. A possível aplicação da fração aquosa purificada da semente de jabuticaba e de seu composto pedunculagina como agentes terapêuticos, ainda necessita de mais estudos.

8. Referências Bibliográficas

- AFAQ, F. et al. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF- κ B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. **International Journal of Cancer**, v. 113, n. 3, p. 423–433, 20 jan. 2005.
- AKAGI, T. et al. Condensed Tannin Composition Analysis in Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) Fruit by Acid Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 79, n. 3, p. 275–281, 2010.
- ALEZANDRO, M. R. et al. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 468–477, 2013.
- ALVES, A. B. C. R. et al. Genotoxic assessment of *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract in vivo and its potential chemoprevention against cyclophosphamide-induced DNA damage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, n. 3, p. 694–700, 2014.
- ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade E Antimutagenicidade Dos Principais Corantes Para Alimentos. **Rev. Nutr.**, v. 13, n. 2, p. 81–88, 2000.
- ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BREINNER, R. P. C. Plantas Medicinais De Uso Caseiro - Conhecimento Popular E Interesse Por Cultivo Comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, v. 6, p. 1–6, 2005.
- ATTIA, S. M. et al. Genotoxic evaluation of chloroacetonitrile in murine marrow cells and effects on DNA damage repair gene expressions. **Mutagenesis**, v. 29, n. 1, p. 55–62, 1 jan. 2014.
- AZQUETA, A.; SHAPOSHNIKOV, S.; COLLINS, A. R. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. **Mutation research**, v. 674, n. 1-2, p. 101–8, 2009.
- BERNI, A. et al. Protective effect of ellagic acid (EA) on micronucleus formation induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in mammalian cells, in in vitro assays and in vivo. **Mutation Research**, v. 746, n. 1, p. 60–65, 2012.
- BHATTACHARYA, S. **Natural Antimutagens: A Review** *Research Journal of Medicine Plant*, 2011.
- BONASSI, S. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625–631, 18 ago. 2006.
- BRESLIN, P. A. . et al. Psychophysical evidence that oral astrigency is a tactile sensation. **Chemical Senses**, v. 18, n. 4, p. 405 – 417, 1993.
- BRIANEZI, G.; CAMARGO, J.; MIOT, H. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 4, p. 325–334, 2009.
- CAMPANA, M. A. et al. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 99–103, 2003.
- CARVALHO, M. B. DE et al. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 4, p. 317–322, 2002.

- CHAKRABORTY, S.; ROY, M.; BHATTACHARYA, R. K. Prevention and repair of DNA damage by selected phytochemicals as measured by single cell gel electrophoresis. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 23, n. 3, p. 215–226, 2004.
- CHANG, JEE HUN; CHO, JANG HYUN; KIM, HA HYUNG; LEE, KWANG PYO; MIN WON LEE, KWANG PYO; HAN, S. S.; LEE, AND LEE, D. I.; CHANG, J. H. ET AL. Antitumor Activity of Pedunculagin, one of the Ellagitannin. **Arch. Pharm. Res**, v. 18, n. 6, p. 396–401, 1995.
- CHUNG, K.-T. et al. Tannins and Human Health: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421–464, ago. 1998.
- CHUNG, K.-T.; WEI, C.-I.; JOHNSON, M. G. Are tannins a double-edged sword in biology and health? **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 4, p. 168–175, 1998.
- CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1658–1670, 2011.
- DA VEIGA, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: Aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 308–313, 2008.
- DE LIMA, A. J. B. et al. Caracterização química do fruto jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 58, n. 4, p. 416–421, 2008.
- DENAMUR, E.; MATIC, I. Evolution of mutation rates in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 820–827, maio 2006.
- DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 5–32, 2009.
- DUSINSKA, M.; COLLINS, A. R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 191–205, 17 fev. 2008.
- ERNST, E. Harmless herbs A review of the recent literature. **American Journal of Medicine**, v. 104, n. 2, p. 170–178, 1998.
- FELDMAN, K. S.; SMITH, R. S. Ellagitannin Chemistry. First Total Synthesis of the 2,3- and 4,6-Coupled Ellagitannin Pedunculagin. **The Journal of organic chemistry**, v. 61, n. 8, p. 2606–2612, 1996.
- FORTES, G. A. C. et al. Assessment of a Maturity Index in Jabuticaba Fruit by the Evaluation of Phenolic Compounds, Essential Oil Components, Sugar Content and Total Acidity. **American Journal of Food Technology**, v. 6, n. 11, p. 974–984, 1 nov. 2011.
- FUNATOGAWA, K. et al. Antibacterial Activity of Hydrolyzable Tannins Derived from Medicinal Plants against *Helicobacter pylori*. **Microbiology and Immunology**, v. 48, n. 4, p. 251–261, abr. 2004.
- GASPI, F. O. G. et al. Effects of the Topical Application of Hydroalcoholic Leaf Extract of *Oncidium flexuosum* Sims. (Orchidaceae) and Microcurrent on the Healing of Wounds Surgically Induced in Wistar Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 20, p. 1–9, 2011.

- GONÇALVES, M. W. et al. Contrasting Patterns of DNA Damage by the Comet Assay in Four Species of the Hylidae Family (Amphibia-Anura). v. 03, n. 01, p. 1–6, 2013.
- HANUSCH, A. L. et al. Genotoxicity and Cytotoxicity Evaluation of the Neolignan Analogue 2-(4-Nitrophenoxy)-1Phenylethanone and its Protective Effect Against DNA Damage. **Plos One**, v. 10, n. 11, p. e0142284, 2015.
- HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45–51, 2003.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 205–215, 1996.
- HASLAM, E. Vegetable tannins - Lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2713–2721, 2007.
- HAYASHI, M. et al. In vivo erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 627, n. 1, p. 10–30, 2007.
- HAYTOWITZ, D.; BHAGWAT, S. USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. **US Department of Agriculture**, p. 10 – 48, 2010.
- HEINONEN, M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics – a Finnish perspective. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 6, p. 684–691, jun. 2007.
- HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.
- HOUTGRAAF, J. H.; VERSMISSEN, J.; VAN DER GIESSEN, W. J. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovascular Revascularization Medicine**, v. 7, n. 3, p. 165–172, 2006.
- JACOBS, A. L.; SCHÄR, P. DNA glycosylases: In DNA repair and beyond. **Chromosoma**, v. 121, 2012.
- KANO, Y. et al. In vitro cytotoxic effects of fludarabine (2-F-ara-A) in combination with commonly used antileukemic agents by isobologram analysis. **Leukemia**, v. 14, n. 3, p. 379–88, 2000.
- KRAUS, T. E. C.; DAHLGREN, R. A; ZASOSKI, R. J. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review. **Plant and Soil**, v. 256, n. 1, p. 41–66, 2003.
- LABIENIEC, M.; GABRYELAK, T. Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 539, n. 1-2, p. 127–135, 2003.
- LANDETE, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1150–1160, 2011.
- LE HEGARAT, L. et al. Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. **Mutagenesis**, v. 25, n. 6, p. 555–560, 2010.
- LEITE, A. V. et al. Antioxidant Potential of Rat Plasma by Administration of Freeze-Dried

Jaboticaba Peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2277–2283, 23 mar. 2011.

LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 596–603, 2012.

LENQUISTE, S. A. et al. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 153–160, 2012.

LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W.-G. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, n. 1, p. 46–53, 2009.

LIU, L. F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. **Annual review of biochemistry**, v. 58, n. type I, p. 351–375, 1989.

LORENZI H et al. Brazilian fruits and cultivated exotics: from consumption in natura. **Nova Odessa: Institute Plantarum**, 2006.

MACGREGOR, J. T. et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation research**, v. 189, p. 103–112, 1987.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. **Animal**, v. 1, n. 09, p. 1371–1391, 2007.

MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1515–1531, 2006.

MCKENNA, D. J.; MCKEOWN, S. R.; MCKELVEY-MARTIN, V. J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 183–190, 17 fev. 2008.

MOSKOVITZ, J.; YIM, M. BIN; CHOCK, P. B. Free Radicals and Disease. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 397, n. 2, p. 354–359, 2002.

MOSTAFA, A. A.; AL-RAHMAH, A. N.; ABDEL-MEGEED, A. Evaluation of some plant extracts for their antifungal and antiaflatoxicogenic activities. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 17, p. 4231–4238, 2011.

NASTOUPIL, L. J.; SINHA, R.; FLOWERS, C. R. The role of chemotherapy in managing chronic lymphocytic leukemia: optimizing combinations with targeted therapy. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 13, n. 9, p. 1089–1108, set. 2013.

NEPOMUCENO, J. C.; SILVA, A. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, v. 7, n. 1, p. 167–179, 2010.

NERI-NUMA, I. A. et al. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 70–76, 2013.

NONAKA, G. et al. Anti-AIDS agents, 2: Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. **Journal of natural products**, v. 53, n.

3, p. 587–595, 1990.

OKUDA, T.; MORI, K.; HAYATSU, H. Inhibitory Effect of Tannins on Direct-Acting Mutagens. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 32, n. 9, p. 3755–3758, 1984.

OKUDA, T. et al. Tannis of Casuarina and Stachyurus species. Part 1. Structures of pendunculagin, casuarictin, strictinin, casuarinin, casuariin, and stachyurin. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 22, p. 1765–1772, 1983.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, n. 2005, p. 2012–2031, 2005.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. **Phytochemistry**, v. 32, n. 3, p. 507–521, 1993.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291–298, 1984.

PAGÈS, V.; FUCHS, R. P. How DNA lesions are turned into mutations within cells. **Oncogene**, v. 21, n. 58, p. 8957–8966, 2002.

PARK, J. W.; KIM, E. K.; KIM, Y. B. Estimation of the daily exposure of Koreans to aflatoxin B 1 through food consumption. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 1, p. 70–75, jan. 2004.

PEREIRA, LUCIANE D; SANTOS, S. C. **Isolamento e identificação de compostos fenólicos das sementes e cascas de jabuticaba (Myrciaria cauliflora)** Sociedade Brasileira de Química. **Anais...**2015

PIPERAKIS, S. M. Comet assay: A brief history. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 1–3, 2009.

PLAGEMANN, I. et al. Volatile constituents of jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg) fruits. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 1, p. 45–51, 2012.

QUIDEAU, S. et al. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586–621, 17 jan. 2011.

REYNERTSON, K. A. et al. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1228–1230, 2006.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L. R.; FÁVERO, S. D. M.; MARQUES, E. K. (Eds.). . **Mutagênese Ambiental**. 1. ed. Canoas: ULBRA, 2003. p. 173–200.

RIVIÈRE, J.-B. et al. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. **Nature Genetics**, v. 44, n. 8, p. 934–940, 2013.

RODRIGUES, H. G. et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 3, p. 359–366, 2011.

ROLL, R. J. **Avaliação da genotoxicidade das xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24 de Xanthomonas campestris pv pruni através do ensaio cometa e teste de micronúcleo.** [s.l.] Universidade Federal de Pelotas, 2005.

- ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 9, p. 440–450, 2006.
- SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: **Mutagênese Ambiental**. [s.l.: s.n.]. p. 201–220.
- SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. F.; MARQUES, E. K. (Eds.). . **Mutagênese Ambiental**. 1. ed. Canoas: ULBRA, 2003. p. 201–223.
- SCHOFIELD, M. J.; HSIEH, P. DNA Mismatch Repair: Molecular Mechanisms and Biological Function. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 579–608, 2003.
- SERPELONI, J. M.; MERCADANTE, A. Z. Effects of lutein and chlorophyll b on GSH depletion and DNA damage induced by cisplatin in vivo. **Human and Experimental Toxicology**, n. 32, p. 828 – 836, 2013.
- SILVA, C. A. C. R. et al. Genotoxicity and cytotoxicity evaluation of oenothien B and its protective effect against mitomycin C-induced mutagenic action. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 767, p. 8–12, 2014.
- SILVA, J. D. A. O Uso Do Ensaio Cometa Para O Ensino De Genética Toxicológica. **www.Sbg.Org.Br**, v. 2, n. 2, p. 30–33, 2007.
- SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.
- STEFANELLO, M. É. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties. **Chemistry and Biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 73–94, 2011.
- STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Genome Biology**, v. 458, n. 5, p. 719–724, 2008.
- TICE, R. R. et al. Single Cell Gel / Comet Assay : Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–21, 2000.
- TRIPATHI, D. N. et al. Use of the alkaline comet assay for the detection of transplacental genotoxins in newborn mice. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 653, n. 1-2, p. 134–139, 2008.
- UENO, T. U. et al. Further Characterization of Galloyl Pedunculagin as an Effective Autophosphorylation Inhibitor of C-Kinase in Vitro. **Biol. Pharm. Bull**, v. 25, n. 11, p. 1401–1404, 2002.
- VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.
- VIJG, J. Somatic mutations and aging: A re-evaluation. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 447, n. 1, p. 117–135, 2000.
- VILAR, J. B. et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian journal of biology**, v. 68, n. 1, p. 141–147, 2008.
- VILLELA, I. V., LAU, A., SILVEIRA, J., PRÁ, D., ROLLA, H. C., & SILVEIRA, J. D. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN,

B.; HENRIQUES, J. P. A. (Eds.). . **Genética Toxicológica**. 1. ed. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 140–163.

WATERS, M. D. et al. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 238, n. 1, p. 57–85, 1990.

WITTE, I. et al. Genetic Toxicity Assessment: Employing the Best Science for Human Safety Evaluation Part III: The Comet Assay as an Alternative to In Vitro Clastogenicity Tests for Early Drug Candidate Selection. **Toxicological Sciences**, v. 97, n. 1, p. 21–26, 1 maio 2007.

WONG, V. W. C., SZETO, Y. T., COLLINS, A. R., & BENZIE, I. F. F. The comet assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research. **Curr Top Nutraceutical Res**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2005.

WU, S. B. et al. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7513–7525, 2012.

WU, S. B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 148–159, 2013.

XIAO, S.-Y. et al. **Extraction and Antitumor Activity of Pedunculagin from Eucalyptus Leaves**. International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology. **Anais...IEEE**, maio 2012 Disponível em:

<<http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=6245110>>

YONEMORI, K.; OSHIDA, M.; SUGIURA, A. Fine structure of tannin cells in fruit and callus tissues of persimmon. **Acta Horticulturae**, n. 436, p. 403–416, jan. 1997.

ZEIGER, E. Genetic toxicity tests for predicting carcinogenicity. In: CHOY, W. N. (Ed.). . **Genetic toxicology and cancer risk assesment**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, Inc, 2001. p. 33–34.

ZHENG, S. et al. Synthesis and biological profiling of tellimagrandin I and analogues reveals that the medium ring can significantly modulate biological activity. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 13, p. 2590, 2012.

9. Anexos

Anexo 1- Documento de submissão

From: EviseSupport@elsevier.com
To: suzana.quimica.ufg@hotmail.com
Subject: Received resubmission MUTGEN_2016_167
Date: Sat, 2 Jul 2016 11:02:10 +0000

Ref: MUTGEN_2016_167

Title: Protective effect and induction of DNA repair by ellagitannins from jabuticaba seed on cyclophosphamide-induced micronucleus formation and DNA damage

Journal: Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

Dear Dr. Santos,

Thank you for resubmitting your manuscript for consideration for publication in Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. Your resubmission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE®

http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsx?JRNL_ACR=MUTGEN
and go to 'My Submissions'.

We appreciate your resubmitting your work to this journal.

Kind regards,

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2016 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

Anexo 2- Manuscrito submetido à revista *Mutation Research*

Protective effect and induction of DNA repair by ellagitannins from jabuticaba seed on cyclophosphamide-induced micronucleus formation and DNA damage

Rangel Moreira Silva^a, Luciane Dias Pereira^b, Jefferson Hollanda Vêras^a, Camila Regina do Vale^a, Lee Chen-Chen^a, Suzana da Costa Santos^{b*}

^a Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, 74690-900, Brazil

^b Institute of Chemistry, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, 74690-900, Brazil

* Corresponding author at: Laboratório de Bioatividade Molecular, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 74690-900, Goiânia, GO, Brazil. Tel.: + 55 62 3521 1008; Fax: + 55 62 3521 1167

E-mail address: suzana.quimica.ufg@hotmail.com (S.C. Santos)

ABSTRACT

Ellagitannins are well-known antioxidants in medicinal plants, foods, and edible fruits, particularly in *Myrciaria cauliflora* (jaboticaba). Thus, this study aimed to evaluate the protective effects of jaboticaba seed extract (JSE) and pedunculagin (**1**) using *in vivo* micronucleus test and comet assay in mouse bone marrow cells, in combination with cyclophosphamide (CP), a bioreductive alkylating agent. The ellagitannin composition of JSE was determined by HPLC/PDA, with castalagin (**2**), vescalagin (**3**), and pedunculagin (**1**) as the main compounds (124.4, 45.5, and 15.6 mg/g dw, respectively). Results from pre- and co-treatments with JSE or pedunculagin clearly showed their protective action against CP-induced micronuclei and DNA damage. The effects of both tannins in post-treatments with CP suggested they influence DNA repair systems. These findings indicate that JSE and pedunculagin possess chemopreventive as well as DNA repair-inducing properties.

Keywords

Ellagitannins

Micronucleus test

Comet assay

Jaboticaba

Antigenotoxic effect

DNA repair

1. Introduction

Vegetable tannins are plant-derived natural products that may occur in almost any part of a plant – seeds, leaves, fruits, root, bark, and wood [1]. It is believed that the regular consumption of fruits and vegetables with high levels of polyphenols is beneficial to human health because of their strong antioxidant and anti-inflammatory activities, which reduce the risk of age-related degenerations and diseases [2].

Tannins are oligomeric and polymeric polyphenols with a wide range of chemical structures, generally classified into two major groups depending on the structure of the monomer: 1) proanthocyanidins (condensed tannins) formed through the condensation of flavan-3-ols (catechins), 2) gallo- and ellagitannins (hydrolysable tannins), which are polyesters with a sugar moiety (mainly D-glucose) and organic acids, gallic acid, and hexahydroxydiphenic acid [2]. Ellagitannins possess many biological properties, including antioxidant, anticancer and anti-inflammatory activities (ALVES et al., 2014; HEINONEN, 2007; KRAUS; DAHLGREN; ZASOSKI, 2003; LANDETE, 2011)[3,4,5,6]. Several species belonging to the Myrtaceae family are a rich source of ellagitannins [7], among them *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg., a Brazilian tree that bears an edible, purplish-black sweet fruit known as jabuticaba [8]. It has a slightly acid taste and is consumed *in natura* or processed as jam, juice, liqueur, and wine [9]. The sun-dried jabuticaba peel is used in popular medicine as a treatment for hemoptysis, cough, bronchitis, asthma, diarrhoea, and dysentery, as well as a rinse for chronic throat inflammation [10]. Several phenolic compounds, such as flavonoids, anthocyanins, depsides, and phenolic acids have been previously isolated from the jabuticaba fruit [9]. Seven ellagitannins were detected and tentatively identified by LC-TOF-MS, and only two of them, iso-oenothein C and oenothein C, were isolated from the fruits [11,12].

Since there is an increasing interest in ellagitannins' beneficial effects on human health and on preventing age-related diseases, the investigation of their antigenotoxic potential may provide information to subsidize the development of new chemopreventive compounds [1,2].

Many tests assess the genotoxicity and antigenotoxicity of compounds, among them the micronucleus (MN) test and the comet assay in mouse bone marrow cells, both widely used and accepted by international regulatory agencies to evaluate new chemicals and pharmaceuticals [13]. The MN test assesses compounds' clastogenic and aneugenic actions, as well as their cytotoxic potential. The comet assay is a suitable method for detecting a wide range of DNA breaks in eukaryotic cells, for it measures single- and double-strand breaks, incomplete excision repair sites, and alkali-labile sites [14,15,16].

Thus, the aim of this study was to evaluate the genotoxic and cytotoxic activities of the jabuticaba seed extract (JSE) via the MN test and the comet assay in mouse bone marrow cells. In addition, both tests assessed the chemopreventive effects of JSE and pedunculagin isolated from the jabuticaba seed against cyclophosphamide-induced micronuclei and DNA damage, using pre-, co-, and post-treatments.

2. Materials and Methods

2.1. General experimental information

Column chromatography was run using Diaion HP-20 (Supelco) or Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich). Analytical TLC was carried out with Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) plates, using formic acid-ethyl formate-toluene (1:7:1) as the mobile phase. TLC spots were visualized by spraying plates with a 1% ethanolic solution of ferric chloride in HCl (0.1%) and UV light. All NMR experiments were recorded on a Bruker Avance III 500 spectrometer operating at 500.13 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C, using TMS as internal reference. ESI-TOF MS spectra were recorded on a Bruker microTOF instrument.

2.2. Chemicals

Cyclophosphamide (CP) was purchased from Hera Medicamentos (Belo Horizonte, Brazil). Fetal calf serum was obtained from Laborclin (Campinas, Brazil), and dibasic sodium phosphate, monobasic sodium phosphate and Giemsa were purchased from Doles (Goiânia, Brazil). Agarose normal melting, agarose low melting, phosphate buffered saline (PBS), Triton X-100, dimethyl sulfoxide (DMSO), Stock Lysis solution, Tris-HCl buffer and ethidium bromide, reagents used in the comet assay, were purchased from Genética Brasil (Brasília, Brazil) and Life Technologies (São Paulo, Brazil).

2.3. Plant material and preparation of JSE

M. cauliflora ripe fruits were collected in Jabuticabal Farm (S 16°49'53'', W 49°14'45''), Goiás State, Brazil, in October 2011. Fresh seeds (1.8 kg) were homogenized in a blender with water, then were exhaustively extracted with 50% acetone, using an overhead stirrer apparatus at room temperature. The acetone was removed under reduced pressure and the suspended aqueous extract was filtered. Following, a liquid-liquid extraction with ethyl acetate (14 x 50 mL) was carried out. The combined organic phase was evaporated to yield an ethyl acetate extract (0.63 g). The aqueous layer was freeze-dried to yield a 57.1 g extract (JSE).

2.4. Isolation and identification of pedunculagin

Part of JSE (52.1 g) was dissolved in methanol (2.0 L) to separate soluble (21.5 g) and insoluble (7.1 g) methanolic extracts. The soluble methanolic extract was subjected to Diaion HP-20 column chromatography (200 g) and eluted with a decreasing polarity gradient of H₂O/MeOH. Seven main fractions were combined, and fraction JSM 4 (1.1 g) was subjected to Sephadex LH-20 CC (eluting with an increasing polarity gradient of CHCl₃/EtOH followed by EtOH/MeOH) to give pedunculagin as pure compound (321 mg).

2.5. Quantification of ellagitannins in JSE and isolation of castalagin/vescalagin (HPLC/PDA)

The chromatographic system used was a Shimadzu LC-10AVP with two LC-10ADvp solvent delivery units (Shimadzu Corp., Japan) connected to an SPD-10AVvp ultraviolet photodiode array detector. Chromatographic separations were performed using a LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m), 25 cm x 0.4 cm i.d. (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). The mobile phase consisted of acetonitrile (solvent A) and 0.01 M H₃PO₄: 0.01 M KH₂PO₄ (solvent B) with the following gradient profile: 0-15 min, 7-10% A in B; 15-40 min, 10-50% A in B, then followed by a 5 min re-equilibration. Analyses were conducted using a 1.0 mL/min flow rate, detector wavelength at 216 nm, and sample injection volume of 20 μ L.

Identification of compounds was made by comparing their RT values and UV spectra against those of standards (pedunculagin, vescalagin and castalagin). Vescalagin and castalagin were purified from JSE by semi-preparative HPLC (Shim-pack PREP-ODS(H) column, 25 x 2 cm, 5 μ m, Shimadzu Corp., Japan, and injection volume of 2 ml) using the same eluent gradients as the analytical program. Quantification was based on the measured integration area applying the calibration equation of the corresponding standard. The concentrations used for the calibration were 2.5–100, 1–264 and 4–936 μ g/mL for pedunculagin, vescalagin and castalagin, respectively.

2.6. Spectral data of the isolated compounds

Pedunculagin (**1**) is a mixture of α -anomer and β -anomer. Light brown amorphous powder, ESI-TOF MS: m/z 783.0671 [M-H]⁻ (calc. for C₃₄H₂₃O₂₂, 783.0686). ¹H-NMR (acetone-*d*₆, 500 MHz), δ : 3.79 (1H, dd, J = 13, 2 Hz, H-6 α), 3.85 (1H, dd, J = 13, 1 Hz, H-6 β), 4.22 (1H, dd, J = 10, 6 Hz, H-5 β), 4.61 (1H, dd, J = 10, 7 Hz, H-5 α), 4.86 (1H, dd, J = 9, 8 Hz, H-2 β), 5.06 (1H,

d, $J = 8$ Hz, H-1 β), 5.07 (1H, dd, $J = 10$, 4 Hz, H-2 α), 5.08 (1H, t, $J = 10$ Hz, H-4 α), 5.08 (1H, t, $J = 10$ Hz, H-4 β), 5.24 (1H, dd, $J = 10$, 9 Hz, H-3 β), 5.26 (1H, dd, $J = 13$, 7 Hz, H-6 α), 5.30 (1H, dd, $J = 13$, 6 Hz, H-6 β), 5.46 (1H, d, $J = 4$, H-1 α), 5.47 (1H, t, $J = 10$ Hz, H-3 α), 6.33 and 6.52 (2H, s, HHDP-6''/6'' β), 6.34 and 6.57 (2H, s, HHDP-6''/6'' α), 6.60 and 6.67 (2H, s, HHDP-6''/6'' β), 6.61 and 6.66 (2H, s, HHDP-6''/6'' α). ^{13}C -NMR (acetone- d_6 , 125 MHz), δ : 63.6 (2C, C-6 α/β), 67.5 (C-5 α), 69.7 (C-4 β), 69.9 (C-4 α), 72.6 (C-5 β), 75.6 (C-2 α), 75.9 (C-3 α), 77.7 (C-3 β), 78.5 (C-2 β), 91.8 (C-1 α), 95.4 (C-1 β), 107.3, 107.4, 107.6, 107.7, 107.8, 107.9, 108.4 and 108.5 (8C, HHDP-6''/6'' α/β).

Castalagin (**2**) white amorphous powder, ESI-TOF MS: m/z 933.0631 [M-H] $^-$ (calc. for $\text{C}_{41}\text{H}_{25}\text{O}_{26}$, 933.0640). ^1H -NMR (acetone- d_6 , 500 MHz), δ : 4.01 (1H, d, $J = 13$ Hz, H-6), 5.03 (1H, dd, $J = 7.0$, 1.4 Hz, H-3), 5.04 (1H, dd, $J = 4.7$, 1.4 Hz, H-2), 5.10 (1H, dd, $J = 13$, 2.6 Hz, H-6), 5.24 (1H, dd, $J = 7.4$, 7.0 Hz, H-4), 5.62 (1H, ddd, 7.4, 2.6, 1.0 Hz, H-5), 5.74 (1H, d, $J = 4.7$ Hz, H-1), 6.64 (1H, s, H-6', HHDP B), 6.79 and 6.91 (2H, s, H-6' HHDP A and Flavogaloil C). ^{13}C -NMR (acetone- d_6 , 125 MHz), δ : 64.5 (C-6), 65.6 (C-3), 66.7 (C-1), 68.6 (C-4), 70.4 (C-5), 73.3 (C-2).

Vescalagin (**3**) white amorphous powder, ESI-TOF MS: m/z 933.0562 [M-H] $^-$ (calc. for $\text{C}_{41}\text{H}_{25}\text{O}_{26}$, 933.0642). ^1H -NMR (acetone- d_6 , 500 MHz), δ : 4.01 (1H, d, $J = 13$ Hz, H-6), 4.58 (1H, dd, $J = 7.0$, 1.5 Hz, H-3), 4.92 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-1), 5.10 (1H, dd, $J = 13$, 2.6 Hz, H-6), 5.22 (1H, dd, $J = 7.4$, 7.0 Hz, H-4), 5.24 (1H, dd, $J = 2.3$, 1.5 Hz, H-2), 5.65 (1H, ddd, 7.4, 2.6, 1.0 Hz, H-5), 6.63 (1H, s, H-6', HHDP B), 6.79 and 6.79 (2H, s, H-6' HHDP A and Flavogaloil C). ^{13}C -NMR (acetone- d_6 , 125 MHz), δ : 64.5 (C-6), 64.6 (C-1), 67.7 (C-3), 68.6 (C-4), 70.4 (C-5), 77.0 (C-2).

2.7. Animal testing

2.7.1. General

This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of the Goiás, Goiânia (protocol no. 115/14). The experiments followed national and international standards of management and experimentation with animals [17,18]. Healthy, young, male adult outbred mice (*Mus musculus*, Swiss Webster), between 7 and 12 weeks old, weighing 30–40 g, obtained from the animal facilities of the same university, were randomly allocated to treatment groups. All animals were brought to the laboratory five days before the experiments and housed in polyethylene cages (40 cm × 30 cm × 16 cm), lined with wood shavings, in groups of five animals at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and $50 \pm 10\%$ relative humidity, with a 12-h light/dark natural cycle.

Standard food pellets and water were provided *ad libitum*.

2.7.2. Protocol in vivo

The mice were randomized into control and experimental groups, divided in thirteen groups of five animals each and weighed before chemical administration. Diluted JSE and pedunculagin, and the negative control (water) were given by gavage, whereas CP was administrated intraperitoneally (i.p.). Animals in group 1 received 0.15 mL of water that was used as negative control, and animals in group 2 received 50 mg/kg of CP according to body weight (bw) by single administration and served as positive control.

2.7.2.1. Co-treatment: animals in group 3 were treated with 300 mg/kg of JSE in order to evaluate the genotoxicity. Animals in groups 4 and 5 were respectively treated with JSE at doses 30 and 300 mg/kg concomitant with CP. Animals in group 11 were treated with 30 mg/kg of pedunculagin concomitant with CP.

2.7.2.2. Pre-treatment: animals in groups 7, 8 and 12 were treated for five days with 30 and 300 mg/Kg JSE and 30 mg/Kg of pedunculagin, respectively, followed by CP 2 hours after the final feeding. Animals in group 6 received only JSE at 300 mg/kg for five days to evaluate the genotoxicity.

2.7.2.3. Post-treatment: animals in group 9, 10 and 13 were firstly treated with CP, then after 2 hours they received doses of JSE at 30 and 300 mg/kg, and pedunculagin at 30 mg/kg.

All groups of animals treated with CP were euthanized by cervical dislocation 24 hours after administration of CP while the animals that received JSE alone were euthanized 24 hours after the its last administration. Both femurs were immediately removed and processed for the micronucleus test and comet assay. Bone marrow cells from both femurs were flushed using foetal calf serum, centrifuged at 300 x g for 5 min, and the supernatant was discarded. The pellet was resuspended in a drop of calf serum and used to prepare the slides. The slides were air-dried and fixed with absolute methanol for 5 minutes at room temperature. The slides were stained with Giemsa, dibasic sodium phosphate, and monobasic sodium phosphate.

2.7.3. Micronucleus test

The micronucleus test was carried out according to MacGregor et al. [19]. Slides were analysed through optical microscope (Olympus BH-2 10 x 100, Tokyo, Japan), and 2000 polychromatic erythrocytes (PCE) were counted per animal to determine the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs). Genotoxicity and antigenotoxicity were assessed by the frequency of MNPCEs, whereas cytotoxicity and anticytotoxicity were evaluated by the ratio between PCE and normochromatic erythrocytes (NCE).

2.7.4. Comet assay

The alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) assay, also known as comet assay was carried out under alkaline conditions using the method described by Attia et al. (2014)[20] and

Singh et al.[21]. Fifteen μL of bone marrow cells were suspended in 120 μL of 0.5% low melting point agarose, then layered on slides previously coated with 1.5% normal melting point agarose. Slides were then kept in cuvettes (protected from light) containing cold lysis solution (Triton X-100, DMSO and Stock Lysis Solution) for 4 hours. Electrophoresis was carried out for 30 minutes (25 V, 300 mA). Following electrophoresis, the slides were placed in a staining tray, covered with a neutralizing buffer (0.4 M, Tris-HCl, pH 7.5), and kept in the dark for 5 minutes. For analysis, slides were stained with 20 μL of ethidium bromide solution (0.02 mg/mL) and covered with a cover slip. One hundred nucleoids were analysed per sample by a fluorescence microscopy system Axioplan-Imaging® using the Isis software, with a 510-560 nm excitation filter and a 590 nm barrier filter, at an increase of 200 X. The TriTek CometScore™ software (version 1.3) was used to assess genomic damage. In this software, pixel intensity provides values corresponding to genomic damage estimates, which are given as arbitrary units. Nucleoids with completely fragmented heads were not taken into account. Among seventeen parameters provided by the software, the percentage of DNA in the tail was selected.

2.8. Statistical analysis

Initially, tests of normality and homoscedasticity were applied to data. In the MN test, genotoxic and antigenotoxic activities were assessed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test, and cytotoxicity and anticytotoxicity were analyzed by χ^2 test, using the SigmaStat 3.2 software.

The percentage reduction of MNPCEs induced by CP was calculated according to Alves et al. [3]:

$$\text{Reduction (\%)} = \left[\frac{A - B}{A - C} \right] \times 100$$

- A: corresponds to the MNPCE mean observed in the treatment with CP (positive control);
- B: corresponds to the MNPCE mean observed in the treatments (JSE/pedunculagin + CP);

- C: corresponds to the MNPCE mean in the negative control.

Statistical tests were used to compare the treatments and control groups and results were considered statistically significant if p was < 0.05 .

3. Results

3.1. Chemical characterization of JSE

The methanol fraction obtained from JSE was submitted to column chromatography over Diaion HP 20 and Sephadex LH-20 to yield pedunculagin (**1**). Castalagin (**2**) and vescalagin (**3**) were isolated from JSE by semi-preparative HPLC. Structural elucidation of pure compounds was determined by spectroscopic methods (ESI-TOF MS, 1D, and 2D NMR) and by comparison with data from the literature [22,23,24].

Figure 1

The HPLC chromatographic profile of JSE revealed the presence of two major compounds in the extract: castalagin and vescalagin. Quantification was based on standard curves obtained from the HPLC analysis, and results are presented in Table 1.

Table 1

Quantitative analysis of JSE by HPLC.

Compound	Retention time (min)	PDA - λ max (nm)	Concentration*
Vescalagin	7.0	200, 221	45.50
Pedunculagin	8.2 and 13.7	196, 219	15.60
Castalagin	10.2	200, 221	124.40

*Expressed as mg of compound/ g of extract dry weight (dw).

3.2. Mouse bone marrow MN test

Results for the frequencies of MNPCE, PCE/NCE, and % MNPCE reduction for all treatments with JSE are shown in Table 2. In the genotoxicity analysis, the co-treatment with JSE 300 mg/Kg alone had no effect on MNPCEs compared to the negative control ($p < 0.05$); the same finding was observed for the five-day pre-treatment with JSE alone. Both treatments failed to show genotoxic action of JSE on mouse bone marrow cells. As regards cytotoxicity, only JSE's five-day treatment and pre-treatment significantly reduced the PCEs/NCEs ratio ($p < 0.05$), hence demonstrating a cytotoxic effect.

Table 2

Mean values of MNPCE frequency, PCE/NCE ratio and reduction rate with two doses of the JSE in mice bone marrow cells for genotoxic, antigenotoxic, cytotoxic and anticytotoxic evaluation.

Group	Treatments (mg/kg bw)	MNPCE/ 2,000 PCE (Mean $\pm$ SD)	MNPCE Reduction (%)	PCE/NCE (Mean $\pm$ SD)
1	Negative Control ¹	4.2 $\pm$ 0.45	-	1.03 $\pm$ 0.03
2	Positive Control ²	27.2 $\pm$ 1.3 ^a	-	0.71 $\pm$ 0.02 ^a
<u>Co-treatment</u>				
3	JSE 300	4.8 $\pm$ 0.83	-	1.16 $\pm$ 0.04
4	JSE 30 + CP	4.8 $\pm$ 0.83 ^b	97 %	0.91 $\pm$ 0.32 ^b
5	JSE 300 + CP	6.0 $\pm$ 1.41 ^b	92 %	0.91 $\pm$ 0.27 ^b
<u>Pre-treatment</u>				
6	JSE 300	5.4 $\pm$ 1.14	-	0.80 $\pm$ 0.21 ^a

7	JSE 30 + CP	6.0 ± 0.70^b	92 %	1.01 ± 0.11^b
8	JSE 300 + CP	7.4 ± 1.14^b	86 %	1.07 ± 0.10^b
<i>Post-treatment</i>				
9	JSE 30 + CP	4.4 ± 0.89^b	99%	0.90 ± 0.13^b
10	JSE 300 + CP	5.0 ± 1.00^b	97%	0.83 ± 0.15^b

CP: cyclophosphamide. All values are means $\pm$ standard deviation (SD) from five mice. Group 1 - distilled water 0.1 mL/10 g body weight (bw) by gavage (negative control), Group 2 - 50 mg/kg CP bw (positive control). Group 3 - 300 mg/kg JSE, Groups 4 and 5 - 30 and 300 mg/kg JSE, respectively, concomitant with CP. Group 6 - JSE at 300 mg/kg during five days, Groups 7 and 8 - JSE at 30 and 300 mg/kg, respectively, for five days, followed by CP, 2 hours after the final feeding. Groups 9 and 10 - CP, and after 2 hours - JSE at 30 and 300 mg/kg, respectively. Groups 3 and 6 were compared with negative control; Groups 4, 5, 7, 8, 9, and 10 were compared with positive control. A total of 2,000 PCEs were scored per animal for the MN test. JSE and CP were diluted in saline solution and administrated by gavage and intraperitoneally (i.p.), respectively. ANOVA, Tukey's test and qui-square. ^aSignificant difference from the negative control (water) ($p < 0.05$); ^bSignificant difference from the positive control (CP) ($p < 0.001$).

In the antigenotoxicity evaluation, pre-, co-, and post-treatments of JSE doses of 30 and 300 mg/kg with CP showed significant decreases ($p < 0.001$) in MNPCE frequency compared to the positive control. These treatments presented MNPCE reductions equal to or higher than 86% in all groups treated with CP (groups 4, 5, 7, 8, 9, and 10). In addition, anticytotoxic action was also observed in all three treatments, as PCE/NCE ratios were significantly different from the positive control ($p < 0.001$).

Results of the antigenotoxic and anticytotoxic effects of pedunculagin are shown in Table 3. Pre-, co-, and post-treatments with pedunculagin and CP exhibited a significant reduction in MNPCE frequency compared to the positive control ($p < 0.001$). This compound induced MNPCE reductions of 99%, 94%, and 102% in the co-, pre-, and post-treatments, respectively. In co- and pre-treatments, pedunculagin was able to protect mouse bone marrow cells from the CP-induced cytotoxic effect. In contrast, during post-treatment the PCE/NCE ratio was significantly reduced ($p < 0.001$), demonstrating a synergistic cytotoxic effect of pedunculagin with CP.

Table 3

Mean values of MNPCE frequency, PCE/NCE ratio and reduction rate with one dose of the pedunculagin (Ped) in mice bone marrow cells for antigenotoxic and anticytotoxic evaluation.

Group	Treatments (mg/kg bw)	MNPCE/ 2,000 PCE (Mean $\pm$ SD)	MNPCE Reduction (%)	PCE/NCE (Mean $\pm$ SD)
1	Negative Control ¹	4.2 $\pm$ 0.45	-	1.03 $\pm$ 0.03
2	Positive Control ²	27.2 $\pm$ 1.30 ^a	-	0.71 $\pm$ 0.02 ^a
<u>Co-treatment</u>				
11	Ped 30 + CP	4.4 $\pm$ 0.54 ^b	99 %	0.91 $\pm$ 0.34 ^b
<u>Pre-treatment</u>				
12	Ped 30 + CP	5.6 $\pm$ 0.84 ^b	94 %	0.90 $\pm$ 0.30 ^b
<u>Post-treatment</u>				
13	Ped 30 + CP	3.8 $\pm$ 0.83 ^b	102 %	0.59 $\pm$ 0.26 ^b

CP: cyclophosphamide. All values are means $\pm$ standard deviation (SD) from five mice. Group 1 - distilled water 0.1 mL/10 g body weight (bw) by gavage (negative control), Group 2 - 50 mg/kg bw of CP (positive control). Group 11 - 30 mg/kg pedunculagin (Ped) concomitant with CP. Group 12 - Ped at 30 mg/kg, for five days, followed by CP, 2 hours after the final feeding. Group 13 - CP, and after 2 hours - Ped at 30 mg/kg. Groups 11, 12 and 13 were compared with positive control. A total of 2,000 PCEs were scored per animal for the MN test. Ped and CP were diluted in saline solution and administrated by gavage and i.p., respectively. ANOVA, Tukey's test and qui-square. ^aSignificant difference from the negative control (water) ($p < 0.05$); ^bSignificant difference from the positive control (CP) ($p < 0.001$).

3.3. Comet assay

Results of the comet assay, which was applied to verify the levels of primary DNA damage in mouse bone marrow cells treated with JSE, with or without CP, are shown in Figure 2. The JSE dose of 300 mg/Kg alone, co-treatment, did not present any significant difference ($p > 0.05$) compared to the negative control. On the other hand, pre-treatment for five days with JSE alone significantly decreased the extent of DNA damage verified by the comet assay (DNA in tail) compared to the respective negative control ($p < 0.001$).

Figure 2

In the antigenotoxic evaluation, JSE and pedunculagin were able to significantly reduce CP-induced DNA damage in all treatments tested by the comet assay –co-, pre-, and post-treatments –in comparison with animals treated with CP alone ($p < 0.05$) (Fig. 2 and 3).

Figure 3

4. Discussion

Exotic tropical fruits have received considerable attention from researchers in the last few decades because of their potential use in preventing degenerative diseases. They have in common high polyphenol contents, viewed as having the capacity to scavenge oxidatively-generated free radicals. Jabuticaba, for instance, a member of the Myrtaceae family, is an edible fruit with several medicinal applications and high polyphenol content, including phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, depsides, galloyl esters, and ellagitannins [8,9,11]. Most studies on jabuticaba have been conducted on the whole fruit or on peels and have focused mainly on flavonoid and anthocyanin compounds [9]. Seeds and peels are co-products generated during the jabuticaba's juice and wine processing and are discarded, even though they contain most of the fruit's bioactive compounds [25]. There are clear differences in the chemical composition of the fruit's seeds and peels, as has been demonstrated by previous reports in which seeds displayed the highest concentrations of ellagitannins and proanthocyanidins and the greatest antioxidant capacity, whereas skin exhibited the highest amounts of anthocyanins and quercetin derivatives [26].

In this study, the ellagitannins isolated from JSE are composed mainly of castalagin and vescalagin, *C*-glycosidic ellagitannins with an open-chain glucose core; and, in lower amounts, of pedunculagin, a simple ellagitannin with ⁴C₁-glucopyranose core and two hexahydroxydiphenoyl (HHDP) units (Table 1, Fig. 1). Both types of ellagitannins possess the capacity to complex with metal ions, proteins/enzymes, and basic compounds, in addition to their antioxidant and antitumour activities (HASLAM, 2007; QUIDEAU et al., 2011)[1,2].

In the MN test and the comet assay, JSE alone in both co- and pre- treatments did not induce an increase in the MNPCE frequency or in DNA in the tail (Table 2), showing no genotoxic effects. Similarly, previous studies have reported the absence of genotoxic action in several hydrolysable

tannins and their hydrolysed products e.g. ellagic acid, gallic acid, and propyl gallate using in vitro Ames test and in vivo MN test [27,28].

Mild cytotoxic effects of JSE were observed on animals treated for five days; it is noteworthy that the same treatment resulted in a lower percentage of DNA in the tail than the negative control (Fig. 2). Ellagitannins present in JSE have already shown selective cytotoxicity against tumour cell lines [29,30], and oenothein B, a dimeric ellagitannin, also significantly decreased the PCEs/NCEs ratio by oral and i.p. routes in the MN test on mouse bone marrow cells [27]. Contrary to our results, Leite-Legatti et al. [31] previously reported no cytotoxic effects on mouse bone marrow cells for the 15-day treatment with jabuticaba peel extract at 300 mg/kg bw. Differently from the seeds, jabuticaba peel revealed the presence of two anthocyanins as major compounds: delphinidin 3-glucoside and cyanidin 3-glucoside [31].

Given that the ageing of the world population has led to an increase in age-related degenerations and diseases such as cancer, much effort has been made to develop new antitumour drugs, and the identification of dietary constituents with chemopreventive properties becomes an alternative to preventing these diseases. Antigenotoxic and antimutagenic compounds can be used as cancer chemopreventive agents against clastogens. The potential protective agent may act through different mechanisms, e.g. chemical or enzymatic inactivation of mutagens, inhibition of metabolic activation of promutagens, scavenging of free radicals produced by mutagens, modification of repair system activity, direct interaction with clastogen, and thus prevention of its interaction with DNA [32]. Several ellagitannins and their hydrolysed product, ellagic acid, exhibit antimutagenic activity on Trp-P-1, Trp-P-2 (mutagens in burned meat) and MNNG (N-methyl-N⁰-nitro-N-nitrosoguanidine), as well as against direct-acting mutagens 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (*N*-OH-Trp-P-2), ($\pm$)-7b,8a-dihydroxy-9a,10a-epoxy-7,8,9,10-tetra-hydrobenzo-[a]pyrene (B[a]P diol epoxide), and mitomycin C to various extents [27,28,32,33].

Chemotherapeutic agent CP was used in the present study to assess antigenotoxic and anticytotoxic effects of JSE and pedunculagin in mouse bone marrow cells via the MN test and the comet assay. It is an alkylating agent that exerts its cytotoxic effects through chemically reactive metabolites phosphoramidate mustard, which is associated with therapeutic effects, and acrolein, which is linked to toxic side effects. Acrolein has been described as being mutagenic to mammalian cells, interfering with the antioxidant defence system and producing cellular toxicity through the generation of reactive oxygen species (ROS) [34].

Pre-, co-, and post-treatment in mice with JSE at all doses and pedunculagin at 30 mg/kg bw led to a significant decrease in the frequency of CP-induced MNs and percentage of DNA in the tail, which confirmed the antigenotoxic properties of these ellagitannins. These results are in accordance with studies performed with pedunculagin using the Ames test, which showed antimutagenic activity against mutagens MNNG, Trp-P-1(+S9), Trp-P-2 (+S9), and *N*-OH-Trp-P-2 (-S9) [33]. Moreover, experiments with outer bark (cork) extracts of *Quercus suber* L., which are rich in castalagin and vescalagin, and UV radiation on L929 fibroblast cell culture led to intracellular reduction of ROS and prevention of DNA fragmentation. Thus, significant UV-induced cell death was avoided by pre-incubation with cork extracts [35].

In contrast to the present results, pre-treatment on mice with jabuticaba peel extract at 30, 100, and 300 mg/kg bw had not been able to reduce CP-induced chromosomal damage in immature erythrocytes (MNPCE), hence showing no antigenotoxic properties for jabuticaba peel [31]. These results confirm that the protective action against CP-induced DNA damage is mainly due to the ellagitannins in the seeds, which act as scavengers against physiological radicals $\text{ROO}\cdot$, $\text{OH}\cdot$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$ produced by acrolein, the CP metabolite [36]. Another mechanism for antioxidant activity is tannins' capacity to complex with metal ions, such as Fe^{3+} and Fe^{2+} , which stabilize these ions' pro-oxidative activity and hence prevent $\text{OH}\cdot$ production by Fenton reaction [37].

Post-treatments with JSE and pedunculagin showed significant effects in the recovery of DNA damage, suggesting that these ellagitannins have a stimulatory action on DNA repair systems. Reduction in the percentage of DNA in the tail, detected by the comet assay, indicates repair of the initial CP-induced DNA damage, such as adduct formation and DNA single-strand breaks. This rapid repair avoided the outcome of mis-repaired DNA lesions expressed as chromosome damage, i.e. micronuclei, as confirmed by the high percentages of reduction of CP-induced MNPCEs (Tables 2 and 3), hence demonstrating an increased efficiency of DNA repair systems in the presence of JSE and pedunculagin. Similarly, ellagic acid, a hydrolysed product of ellagitannins, helped in the recovery of MNNG-induced DNA damage by accelerating DNA repair efficiency in damaged Chinese hamster lung fibroblast cells [38].

As regards the degree of anticytotoxicity observed in post-treatments, there were strong differences between *C*-ellagitannin isomers castalagin and vescalagin, major compounds in JSE and pedunculagin. *C*-ellagitannins counter-attacked CP-induced cytotoxic effects, whereas pedunculagin, a simple ellagitannin with $^4\text{C}_1$ -glucopyranose core, significantly reduced the PCE/NCE ratio, demonstrating its synergistic cytotoxic effect with CP.

Ellagitannins may differ in biological activities due to their chemical structures, as seen in previous studies in which pedunculagin showed greater cytotoxicity against solid tumour cancer cells, such as human hepatocellular and breast carcinoma cells Hep-G2 and MCF-7, as well as human HCT-116 colon cancer cells, when compared to castalagin [36].

5. Conclusion

Castalagin, vescalagin, and pedunculagin were the major compounds isolated from jaboticaba seeds. These ellagitannins showed no genotoxic activity via the MN test and the comet assay. Antigenotoxic effects were induced by pre- and co-treatments of JSE or pedunculagin with CP. However, the most noteworthy finding by the present study is that these compounds not only

protect DNA from injury, but also help to repair DNA damage by accelerating DNA repair efficiency in damaged cells.

Funding: This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq, #470655/2012-7], Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) [scholarships]; and Conselho de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES) [scholarships].

Conflict of interest statement

None declared.

References

- [1] E. Haslam, Vegetable tannins - Lessons of a phytochemical lifetime. *Phytochemistry* 68 (2007) 2713–2721.
- [2] S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, L. Pouységu, Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis, *Angew. Chem. Int. Edit.* 50 (2011) 586–621.
- [3] A.B. AFAQ, F. et al. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. **International Journal of Cancer**, v. 113, n. 3, p. 423–433, 20 jan. 2005.
- AKAGI, T. et al. Condensed Tannin Composition Analysis in Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) Fruit by Acid Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 79, n. 3, p. 275–281, 2010.
- ALEZANDRO, M. R. et al. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboticaba: *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 468–477, 2013.
- ALVES, A. B. C. R. et al. Genotoxic assessment of *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract in vivo and its potential chemoprevention against cyclophosphamide-induced DNA damage. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, n. 3, p. 694–700, 2014.
- ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade E Antimutagenicidade Dos Principais Corantes Para Alimentos. **Rev. Nutr.**, v. 13, n. 2, p. 81–88, 2000.
- ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BREINNER, R. P. C. Plantas Medicinais De Uso Caseiro - Conhecimento Popular E Interesse Por Cultivo Comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, v. 6, p. 1–6, 2005.

ATTIA, S. M. et al. Genotoxic evaluation of chloroacetonitrile in murine marrow cells and effects on DNA damage repair gene expressions. **Mutagenesis**, v. 29, n. 1, p. 55–62, 1 jan. 2014.

AZQUETA, A.; SHAPOSHNIKOV, S.; COLLINS, A. R. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. **Mutation research**, v. 674, n. 1-2, p. 101–8, 2009.

BERNI, A. et al. Protective effect of ellagic acid (EA) on micronucleus formation induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in mammalian cells, in in vitro assays and in vivo. **Mutation Research**, v. 746, n. 1, p. 60–65, 2012.

BHATTACHARYA, S. **Natural Antimutagens: A Review** *Research Journal of Medicine Plant*, 2011.

BONASSI, S. et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 625–631, 18 ago. 2006.

BRESLIN, P. A. . et al. Psychophysical evidence that oral astrigency is a tactile sensation. **Chemical Senses**, v. 18, n. 4, p. 405 – 417, 1993.

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J.; MIOT, H. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 4, p. 325–334, 2009.

CAMPANA, M. A. et al. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 99–103, 2003.

CARVALHO, M. B. DE et al. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 4, p. 317–322, 2002.

CHAKRABORTY, S.; ROY, M.; BHATTACHARYA, R. K. Prevention and repair of DNA damage by selected phytochemicals as measured by single cell gel electrophoresis. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 23, n. 3, p. 215–226, 2004.

CHANG, JEE HUN; CHO, JANG HYUN; KIM, HA HYUNG; LEE, KWANG PYO; MIN WON LEE, KWANG PYO; HAN, S. S.; LEE, AND LEE, D. I.; CHANG, J. H. ET AL. Antitumor Activity of Pedunculagin, one of the Ellagitannin. **Arch. Pharm. Res**, v. 18, n. 6, p. 396–401, 1995.

CHUNG, K.-T. et al. Tannins and Human Health: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 421–464, ago. 1998.

CHUNG, K.-T.; WEI, C.-I.; JOHNSON, M. G. Are tannins a double-edged sword in biology and health? **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 4, p. 168–175, 1998.

CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1658–1670, 2011.

DA VEIGA, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: Aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população.

Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 18, n. 2, p. 308–313, 2008.

DE LIMA, A. J. B. et al. Caracterização química do fruto jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 58, n. 4, p. 416–421, 2008.

DENAMUR, E.; MATIC, I. Evolution of mutation rates in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 820–827, maio 2006.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 5–32, 2009.

DUSINSKA, M.; COLLINS, A. R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 191–205, 17 fev. 2008.

ERNST, E. Harmless herbs A review of the recent literature. **American Journal of Medicine**, v. 104, n. 2, p. 170–178, 1998.

FELDMAN, K. S.; SMITH, R. S. Ellagitannin Chemistry. First Total Synthesis of the 2,3- and 4,6-Coupled Ellagitannin Pedunculagin. **The Journal of organic chemistry**, v. 61, n. 8, p. 2606–2612, 1996.

FORTES, G. A. C. et al. Assessment of a Maturity Index in Jabuticaba Fruit by the Evaluation of Phenolic Compounds, Essential Oil Components, Sugar Content and Total Acidity. **American Journal of Food Technology**, v. 6, n. 11, p. 974–984, 1 nov. 2011.

FUNATOGAWA, K. et al. Antibacterial Activity of Hydrolyzable Tannins Derived from Medicinal Plants against *Helicobacter pylori*. **Microbiology and Immunology**, v. 48, n. 4, p. 251–261, abr. 2004.

GASPI, F. O. G. et al. Effects of the Topical Application of Hydroalcoholic Leaf Extract of *Oncidium flexuosum* Sims. (Orchidaceae) and Microcurrent on the Healing of Wounds Surgically Induced in Wistar Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 20, p. 1–9, 2011.

GONÇALVES, M. W. et al. Contrasting Patterns of DNA Damage by the Comet Assay in Four Species of the Hylidae Family (Amphibia-Anura). v. 03, n. 01, p. 1–6, 2013.

HANUSCH, A. L. et al. Genotoxicity and Cytotoxicity Evaluation of the Neolignan Analogue 2-(4-Nitrophenoxy)-1-Phenylethanone and its Protective Effect Against DNA Damage. **Plos One**, v. 10, n. 11, p. e0142284, 2015.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45–51, 2003.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 205–215, 1996.

HASLAM, E. Vegetable tannins - Lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2713–2721, 2007.

HAYASHI, M. et al. In vivo erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 627, n. 1, p. 10–30, 2007.

- HAYTOWITZ, D.; BHAGWAT, S. USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2. **US Department of Agriculture**, p. 10 – 48, 2010.
- HEINONEN, M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics – a Finnish perspective. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 6, p. 684–691, jun. 2007.
- HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.
- HOUTGRAAF, J. H.; VERSMISSEN, J.; VAN DER GIESSEN, W. J. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovascular Revascularization Medicine**, v. 7, n. 3, p. 165–172, 2006.
- JACOBS, A. L.; SCHÄR, P. DNA glycosylases: In DNA repair and beyond. **Chromosoma**, v. 121, 2012.
- KANO, Y. et al. In vitro cytotoxic effects of fludarabine (2-F-ara-A) in combination with commonly used antileukemic agents by isobologram analysis. **Leukemia**, v. 14, n. 3, p. 379–88, 2000.
- KRAUS, T. E. C.; DAHLGREN, R. A; ZASOSKI, R. J. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review. **Plant and Soil**, v. 256, n. 1, p. 41–66, 2003.
- LABIENIEC, M.; GABRYELAK, T. Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 539, n. 1-2, p. 127–135, 2003.
- LANDETE, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1150–1160, 2011.
- LE HEGARAT, L. et al. Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cells by the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. **Mutagenesis**, v. 25, n. 6, p. 555–560, 2010.
- LEITE, A. V. et al. Antioxidant Potential of Rat Plasma by Administration of Freeze-Dried Jaboticaba Peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2277–2283, 23 mar. 2011.
- LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 596–603, 2012.
- LENQUISTE, S. A. et al. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 153–160, 2012.
- LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W.-G. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, n. 1, p. 46–53, 2009.
- LIU, L. F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. **Annual review of biochemistry**, v. 58, n. type I, p. 351–375, 1989.

LORENZI H et al. Brazilian fruits and cultivated exotics: from consumption in natura. **Nova Odessa: Institute Plantarum**, 2006.

MACGREGOR, J. T. et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation research**, v. 189, p. 103–112, 1987.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. **Animal**, v. 1, n. 09, p. 1371–1391, 2007.

MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1515–1531, 2006.

MCKENNA, D. J.; MCKEOWN, S. R.; MCKELVEY-MARTIN, V. J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 183–190, 17 fev. 2008.

MOSKOVITZ, J.; YIM, M. BIN; CHOCK, P. B. Free Radicals and Disease. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 397, n. 2, p. 354–359, 2002.

MOSTAFA, A. A.; AL-RAHMAH, A. N.; ABDEL-MEGEED, A. Evaluation of some plant extracts for their antifungal and antiaflatoxicogenic activities. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 17, p. 4231–4238, 2011.

NASTOUPIL, L. J.; SINHA, R.; FLOWERS, C. R. The role of chemotherapy in managing chronic lymphocytic leukemia: optimizing combinations with targeted therapy. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 13, n. 9, p. 1089–1108, set. 2013.

NEPOMUCENO, J. C.; SILVA, A. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM**, v. 7, n. 1, p. 167–179, 2010.

NERI-NUMA, I. A. et al. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh - Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 70–76, 2013.

NONAKA, G. et al. Anti-AIDS agents, 2: Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. **Journal of natural products**, v. 53, n. 3, p. 587–595, 1990.

OKUDA, T.; MORI, K.; HAYATSU, H. Inhibitory Effect of Tannins on Direct-Acting Mutagens. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 32, n. 9, p. 3755–3758, 1984.

OKUDA, T. et al. Tannis of Casuarina and Stachyurus species. Part 1. Structures of pendunculagin, casuarictin, strictinin, casuarinin, casuariin, and stachyurin. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, v. 22, p. 1765–1772, 1983.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, n. 2005, p. 2012–2031, 2005.

- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. **Phytochemistry**, v. 32, n. 3, p. 507–521, 1993.
- OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291–298, 1984.
- PAGÈS, V.; FUCHS, R. P. How DNA lesions are turned into mutations within cells. **Oncogene**, v. 21, n. 58, p. 8957–8966, 2002.
- PARK, J. W.; KIM, E. K.; KIM, Y. B. Estimation of the daily exposure of Koreans to aflatoxin B 1 through food consumption. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 1, p. 70–75, jan. 2004.
- PEREIRA, LUCIANE D; SANTOS, S. C. **Isolamento e identificação de compostos fenólicos das sementes e cascas de jaboticaba (Myrciaria cauliflora)** Sociedade Brasileira de Química. **Anais...**2015
- PIPERAKIS, S. M. Comet assay: A brief history. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 1–3, 2009.
- PLAGEMANN, I. et al. Volatile constituents of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg) fruits. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 1, p. 45–51, 2012.
- QUIDEAU, S. et al. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586–621, 17 jan. 2011.
- REYNERTSON, K. A. et al. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1228–1230, 2006.
- RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L. R.; FÁVERO, S. D. M.; MARQUES, E. K. (Eds.). . **Mutagênese Ambiental**. 1. ed. Canoas: ULBRA, 2003. p. 173–200.
- RIVIÈRE, J.-B. et al. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. **Nature Genetics**, v. 44, n. 8, p. 934–940, 2013.
- RODRIGUES, H. G. et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 3, p. 359–366, 2011.
- ROLL, R. J. **Avaliação da genotoxicidade das xantanas produzidas pelas cepas 06 e 24 de Xanthomonas campestris pv pruni através do ensaio cometa e teste de micronúcleo**. [s.l.] Universidade Federal de Pelotas, 2005.
- ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 9, p. 440–450, 2006.
- SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: **Mutagênese Ambiental**. [s.l.: s.n.]. p. 201–220.
- SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. F.; MARQUES, E. K. (Eds.). .

Mutagênese Ambiental. 1. ed. Canoas: ULBRA, 2003. p. 201–223.

SCHOFIELD, M. J.; HSIEH, P. DNA Mismatch Repair: Molecular Mechanisms and Biological Function. **Annual Review of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 579–608, 2003.

SERPELONI, J. M.; MERCADANTE, A. Z. Effects of lutein and chlorophyll b on GSH depletion and DNA damage induced by cisplatin in vivo. **Human and Experimental Toxicology**, n. 32, p. 828 – 836, 2013.

SILVA, C. A. C. R. et al. Genotoxicity and cytotoxicity evaluation of oenothien B and its protective effect against mitomycin C-induced mutagenic action. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 767, p. 8–12, 2014.

SILVA, J. D. A. O Uso Do Ensaio Cometa Para O Ensino De Genética Toxicológica. **www.Sbg.Org.Br**, v. 2, n. 2, p. 30–33, 2007.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

STEFANELLO, M. É. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties. **Chemistry and Biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 73–94, 2011.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Genome Biology**, v. 458, n. 5, p. 719–724, 2008.

TICE, R. R. et al. Single Cell Gel / Comet Assay : Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–21, 2000.

TRIPATHI, D. N. et al. Use of the alkaline comet assay for the detection of transplacental genotoxins in newborn mice. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 653, n. 1-2, p. 134–139, 2008.

UENO, T. U. et al. Further Characterization of Galloyl Pedunculagin as an Effective Autophosphorylation Inhibitor of C-Kinase in Vitro. **Biol. Pharm. Bull**, v. 25, n. 11, p. 1401–1404, 2002.

VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

VIJG, J. Somatic mutations and aging: A re-evaluation. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 447, n. 1, p. 117–135, 2000.

VILAR, J. B. et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian journal of biology**, v. 68, n. 1, p. 141–147, 2008.

VILLELA, I. V., LAU, A., SILVEIRA, J., PRÁ, D., ROLLA, H. C., & SILVEIRA, J. D. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. P. A. (Eds.). . **Genética Toxicológica**. 1. ed. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 140–163.

WATERS, M. D. et al. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation**

Research/Reviews in Genetic Toxicology, v. 238, n. 1, p. 57–85, 1990.

WITTE, I. et al. Genetic Toxicity Assessment: Employing the Best Science for Human Safety Evaluation Part III: The Comet Assay as an Alternative to In Vitro Clastogenicity Tests for Early Drug Candidate Selection. **Toxicological Sciences**, v. 97, n. 1, p. 21–26, 1 maio 2007.

WONG, V. W. C., SZETO, Y. T., COLLINS, A. R., & BENZIE, I. F. F. The comet assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research. **Curr Top Nutraceutical Res**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2005.

WU, S. B. et al. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7513–7525, 2012.

WU, S. B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 148–159, 2013.

XIAO, S.-Y. et al. **Extraction and Antitumor Activity of Pedunculagin from Eucalyptus Leaves**. International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology. **Anais...IEEE**, maio 2012. Disponível em:
<<http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=6245110>>

YONEMORI, K.; OSHIDA, M.; SUGIURA, A. Fine structure of tannin cells in fruit and callus tissues of persimmon. **Acta Horticulturae**, n. 436, p. 403–416, jan. 1997.

ZEIGER, E. Genetic toxicity tests for predicting carcinogenicity. In: CHOY, W. N. (Ed.). . **Genetic toxicology and cancer risk assesment**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, Inc, 2001. p. 33–34.

ZHENG, S. et al. Synthesis and biological profiling of tellimagrandin I and analogues reveals that the medium ring can significantly modulate biological activity. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 10, n. 13, p. 2590, 2012.

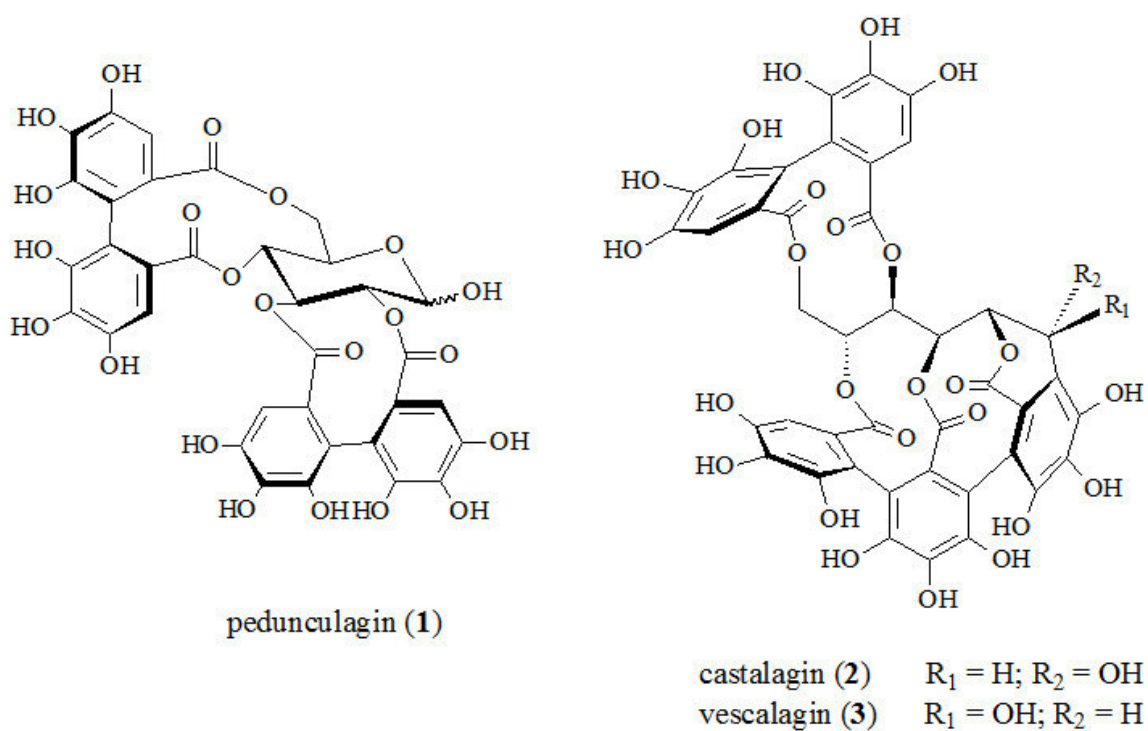


Figure 1

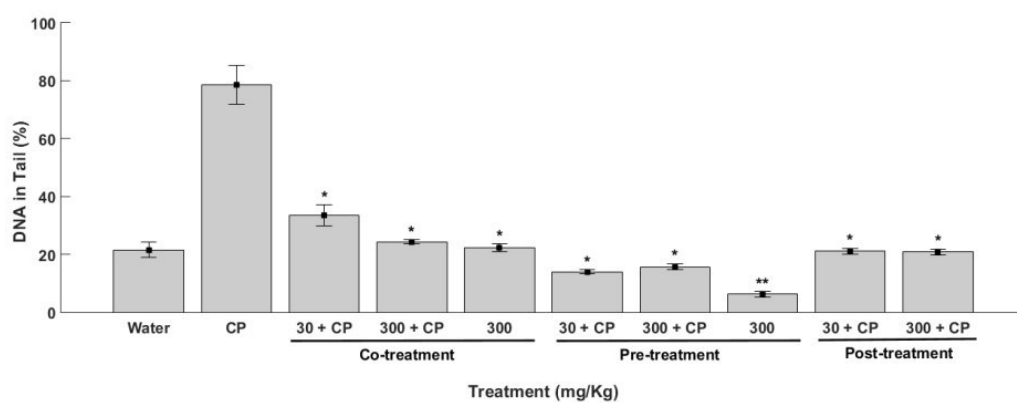


Figure 2

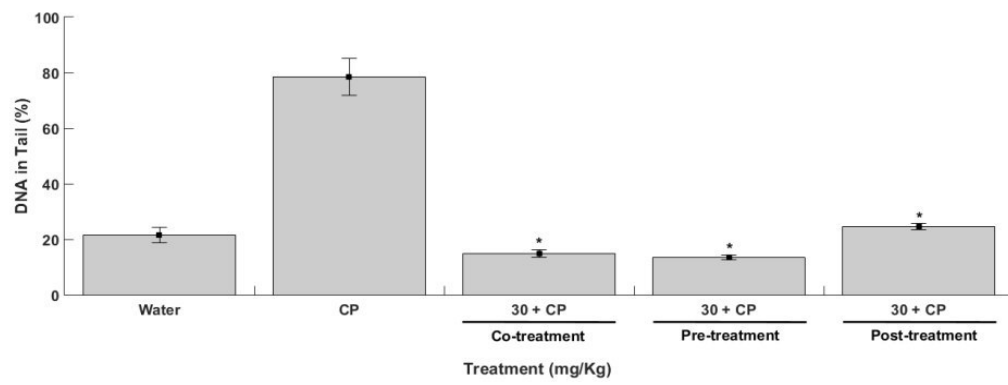


Figure 3

Anexo 3- Autorização da comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UFG



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 08 de dezembro de 2014.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 115/14

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pesquisa

II Título do projeto: Avaliação da atividade genotóxica, antigenotóxica e anticitotóxica da fração purificada da semente e do isolado pedunculagina de *Myrciaria cauliflora* (Jabuticaba Assu) em Camundongos e *Drosophila melanogaster*.

Identificação:

- ☐ Pesquisador Responsável/ Unidade: Lee Chen Chen- Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese-ICB-UFG
- ☐ Pesquisadores Participantes: Suzana da Costa Santos- Co-orientadora; Rangel Moreira Silva- Mestrando
- ☐ Unidade onde será realizado: Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese-ICB-UFG
- ☐ Data de apresentação a CEUA: 26/11/2014

III - Objetivos e justificativa do projeto:

IV - Sumário do projeto:

- ☐ Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:
São feitos testes in vitro, primeiramente, porém é necessária a confirmação em animais.
- ☐ Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):
Serão utilizados 65 camundongos, Swiss Webster, machos, de 7-12 semanas, com 30-40g.
- ☐ Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:
Os animais serão alojados em racks ventilados, maravalha autoclavada, 3-5 animais em cada mini isolador. Condições ambientais controladas, 24 °C, 50 mais ou menos 10, 12 hs luz/12 hs escuro. Limpeza feita a cada 2 dias. Ração Labina e água à vontade. Animais adaptados por 5 dias.
- ☐ Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos: Não há agente infeccioso. Riscos inerentes ao manejo, pessoal treinado. EPIs usados durante o procedimento.
- ☐ Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:
Os animais em número de 65 serão divididos em 13 grupos de 05 animais cada um. Primeiramente serão usados 50 animais onde o extrato será administrado por gavagem, e serão feitos diferentes tratamentos com

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP: 74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com

diferentes concentrações mais um grupo controle positivo (receberá ciclofosfamida 50 mg/kg de peso corporal) e outro grupo controle negativo que receberá água por gavagem. Serão usados mais 15 animais para avaliar os efeitos genotóxico e antigenotóxico de uma única dose do extrato sendo 5 para o pré tratamento, 5 para o co-tratamento e 5 para o pós tratamento.

- ☐ **Método de eutanásia:** Eutanásia será realizada por deslocamento cervical
- ☐ **Destino do animal:** Os animais envoltos em papel alumínio, estocados no freezer e recolhidos posteriormente pela empresa INCINERA.

IV – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- ☐ **Quanto a documentos:** Todos os documentos exigidos foram apresentados, cronograma correto, financiamento, etc.
- ☐ **Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:** Sem óbices éticos

V - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**. O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPPG-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 30/06/2015.

VI - Data da reunião: 08/12/2014


Dra. Marina Pacheco Miguel
 Vice-coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
 CEP: 74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
 Email: ceua.ufg@gmail.com