



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



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

**Avaliação da Atividade Tóxica, Genotóxica e Antigenotóxica de *Hymenaea
courbaril* L. em Camundongos e *Drosophila melanogaster***

CAMILA REGINA DO VALE

Goiânia - GO

Maio de 2012



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

CAMILA REGINA DO VALE

**Avaliação da Atividade Tóxica, Genotóxica e Antigenotóxica de *Hymenaea
courbaril* L. em Camundongos e *Drosophila melanogaster***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lee Chen Chen

Co-orientação: Prof. Dr. Salvador de Carvalho

Goiânia - GO

Maio de 2012

GRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração de algumas pessoas que contribuíram de forma relevante para a execução do mesmo, daí que não poderia deixar de prestar um agradecimento sincero:

Agradeço a Deus por ter me dado a vida e todas as possibilidades para que pudesse concluir mais essa etapa em minha vida.

À minha Orientadora Profa. Dra. Lee Chen Chen, por todo carinho, sabedoria e disposição em me orientar.

Ao Prof. Dr. Salvador de Carvalho que além de co-orientar esse trabalho, sempre se mostrou amigo para todos os momentos.

Aos professores Dra. Kênya Silva Cunha e Dr. Mario Antônio Spanó por gentilmente aceitar a participar da banca de minha defesa de mestrado.

À Profa. Dra. Cecília Maria Alves de Oliveira por ter fornecido as amostras aqui avaliadas.

À minha querida amiga para todos os momentos, Débora Cristina da Silva Lima pelo companheirismo, amizade e ajuda em todos os momentos.

Às estagiárias do laboratório de Mutagênese com *Drosophila* Alinny Nayara Vidal e Silva e Ana Flávia dos Santos pela amizade e grande ajuda com o teste SMART/asa.

Aos amigos e companheiros do laboratório de Radiobiologia e Mutagênese, Cristiene Costa Carneiro, Carolina Ribeiro e Silva e Flávio Borges por todos os momentos juntos, pelo apoio e pela colaboração que tornou o laboratório mais alegre e produtivo.

Aos estagiários Priscila Zei, Lidyanne Silva, Jeferson Hollanda, Renata Agra e Brenda Raquel por toda colaboração nas atividades do laboratório, pelo companheirismo e dedicação.

À professora Wanderlene Blanco Nunes, pela colaboração na análise estatística do teste SMART/asa.

À Elayne Silva Miguel e Leandro Prado Felício pela amizade e colaboração no teste SMART/asa.

Ao meu querido namorado, Cleiber Caetano Martins pelo amor, paciência, respeito e por tornar esse momento ainda mais feliz.

À minha família, minhas tias Zélia Maria do Vale, Maria Madalena do Vale e a minha querida mãe Florentina Santos do Vale pelo incentivo e por todo carinho a mim dedicados.



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

çoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal de Goiás (UFG) pelo auxílio financeiro.



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

**õMas os que esperam no Senhor renovarão suas forças, subirão com asas como águias,
correrão e não se cansarão, caminharão e não se fatigarãoõ**

Isaías 40:31

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Plantas Medicinais	1
1.1.1. Uso de Plantas Medicinais no Brasil.....	2
1.1.2. Componentes químicos de Plantas Medicinais.....	3
1.1.3. Propriedades Tóxicas, Mutagênicas e Antimutagênicas de Plantas Medicinais.....	4
1.2. <i>Hymenaea courbaril</i> L.	6
1.2.1. Seiva de <i>Hymenaea courbaril</i>	10
1.2.2. Composição Química de <i>Hymenaea courbaril</i>.....	11
1.2.3. Atividades Biológicas de <i>Hymenaea courbaril</i>.....	12
1.3. Mutagenicidade/ Genotoxicidade	13
1.4. Antimutagenicidade/ Antigenotoxicidade	16
1.5. Testes Para Avaliação dos Efeitos Mutagênicos e Antimutagênicos de Compostos .	17
1.5.1. Teste do Micronúcleo em Medula Óssea de Camundongos.....	18
1.5.2. Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation and Recombination Test- SMART).....	22
1.6. Compostos Usados em Testes Para Avaliação dos Efeitos Mutagênicos e Antimutagênicos de Substâncias	27
1.6.1. Mitomicina C (MMC)	28
1.6.2. Doxorrubicina (DXR).....	29
2. OBJETIVOS	30
2.1. Geral.....	30
2.2. Específicos	30
3. REFERÊNCIAS.....	31

Capítulo I

Avaliação da Atividade Citotóxica, Genotóxica e Antigenotóxica de *Hymenaea courbaril* L. em Medula Óssea de Camundongos

1. INTRODUÇÃO.....	52
2. MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1. Material Botânico.....	53
2.2. Camundongos.....	53
2.3. Reagentes Químicos e Soluções.....	54
2.3.1. Tampão Fosfato.....	54
2.3.2. Corante	54
2.3.3. Fixador.....	54
2.3.4. Homogeneização das Células	54
2.3.5. Controles.....	55
2.4. Procedimento Experimental	55
2.5. Análise Citogenética.....	55
2.6. Análise Estatística	56
3. RESULTADOS	56
4. DISCUSSÃO	65
5. CONCLUSÃO.....	67
6. REFERÊNCIAS.....	68

Capítulo II

Interferência da Seiva de *Hymenaea courbaril* L. sobre a mutagenicidade e recombinogenicidade induzida pelo Cloridrato de Doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

1. INTRODUÇÃO.....	75
2. MATERIAL e MÉTODOS.....	76
2.1. Material Botânico.....	76
2.2. Linhagens de <i>Drosophila melanogaster</i>	76
2.3. Agentes Químicos.....	77
2.3.1. Controles.....	77
2.4. Cruzamentos	77
2.5. Meios de Cultura e Condições de Cultivo	77
2.6. Procedimento Experimental - Tratamento Crônico	78
2.7. Preparação e Análise das Lâminas	79
2.8. Análise Estatística	79
3. RESULTADOS	80
4. DISCUSSÃO	86
5. CONCLUSÃO.....	88
7. REFERÊNCIAS.....	889

Capítulo III

Assessment of the toxic, genotoxic, antigenotoxic and recombinogenic, activities of the *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae) in *Drosophila melanogaster* and mice

1. Introduction	95
2. Materials and methods.....	96
2.1. Plant material.....	96
2.2. Mouse bone marrow micronucleus test.....	96
2.2.1. Animals.....	96
2.2.2. Experimental procedure	97
2.2.3. Statistical analysis	98
2.3. Somatic mutation and recombination test (SMART).....	98
2.3.1. <i>Drosophila</i> strains and crosses	98
2.3.2. Experimental procedure	99
2.3.3. Statistical analysis	100
3. Results	100
3.1. Mouse bone marrow micronucleus test.....	100
3.2. Somatic mutation and recombination test (SMART).....	103
4. Discussion.....	107
5. Conclusion.....	109
References	110
COSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	116

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: A planta, <i>Hymenaea courbaril</i>	8
Figura 2: Fruto de <i>Hymenaea courbaril</i>	9
Figura 3: Flor e folhas de <i>Hymenaea courbaril</i>	9
Figura 4: Tronco e madeira de <i>Hymenaea courbaril</i>	10
Figura 5: Seiva de <i>Hymenaea courbaril</i>	11
Figura 6: Processo de maturação das células da linhagem eritrocitária	21
Figura 7: Formação de micronúcleos em eritrócitos da medula óssea	21
Figura 8: Fenótipos dos pelos de <i>D. melanogaster</i>	24
Figura 9: Asas dos indivíduos trans-heterozigotos e heterozigotos balanceados	25
Figura 10. Fotomicrografia mostrando pelos múltiplos observados em microscópio óptico de luz	26
Figura 11. Fotomicrografia mostrando pelos mutantes do tipo flare e pelos normais observados em microscópio óptico de luz.....	26
Figura 12. Fotomicrografia mostrando mancha gêmea contendo pelos múltiplos e pelos flare adjacentes observada em microscópio óptico de luz	27
Figura 13. Fórmula estrutural do quimioterápico Mitomicina C	28
Figura 14: Fórmula estrutura do quimioterápico Doxorubicina	29

Capítulo I

Avaliação da Atividade Citotóxica, Genotóxica e Antigenotóxica de *Hymenaea courbaril* L. em Medula Óssea de Camundongos

Figura 1. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) após 24 horas de tratamento com a seiva de <i>Hymenaea courbaril</i> (SHyc) e controles.....	58
Figura 2. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) após 48 horas de tratamento com a seiva de <i>Hymenaea courbaril</i> (SHyc) e controles.....	59
Figura 3. Razão de EPC/ENC após 24 horas de tratamento com a seiva de <i>Hymenaea courbaril</i> (SHyc) e controles.....	60
Figura 4. Razão de EPC/ENC após 48 horas de tratamento com a seiva de <i>Hymenaea courbaril</i> (SHyc) e controles.....	60
Figura 5. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) após 24 horas de tratamento com a seiva de <i>Hymenaea courbaril</i> (SHyc) concomitantemente com MMC e controles .	63
Figura 6. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) após 48 horas de tratamento com a seiva de <i>Hymenaea courbaril</i> (SHyc) concomitantemente com MMC e controles .	63
Figura 7. Razão de EPC/ENC após 24 horas de tratamento com a seiva de <i>Hymenaea courbaril</i> (SHyc) comcomitantemente com MMC e controles.....	64
Figura 8. Razão de EPC/ENC após 48 horas de tratamento com a seiva de <i>Hymenaea courbaril</i> (SHyc) comcomitantemente com MMC e controles.....	64

Capítulo II

Interferência da Seiva de *Hymenaea courbaril* L. sobre a mutagenicidade e recombinogenicidade induzida pelo Cloridrato de Doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

- Figura 1.** Curva de sobrevivência dos descendentes de *Drosophila melanogaster* provenientes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB) tratadas com doses diferentes da seiva de *Hymenaea courbaril* (SHyc) **81**
- Figura 2.** Contribuição das frequências de mutação e recombinação em relação à frequência total de manchas mwh por indivíduo, do cruzamento ST, após tratamento crônico com a seiva de *Hymenaea courbaril* associado à Doxorrubicina..... **85**
- Figura 3.** Contribuição das frequências de mutação e recombinação em relação à frequência total de manchas mwh por indivíduo, do cruzamento HB, após tratamento crônico com a seiva de *Hymenaea courbaril* associado à Doxorrubicina..... **85**

Capítulo III

Assessment of toxic, genotoxic, antigenotoxic and recombinogenic, activities of *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae) in *Drosophila melanogaster* and mice

- Figure 1.** Survival curves of descendants of *Drosophila melanogaster* from standard (ST) and high bioactivation (HB) crosses fed with different doses of *Hymenaea courbaril* sap (Hycs); nc: negative control..... **105**

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Avaliação da Atividade Citotóxica, Genotóxica e Antigenotóxica de *Hymenaea courbaril* L. em Medula Óssea de Camundongos

- Tabela 1.** Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) e relação de eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) em medula óssea de camundongos após a administração de diferentes doses da seiva de *Hymenaea courbaril* (SHyc) **58**
- Tabela 2.** Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) e relação de eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) em medula óssea de camundongos após a administração de diferentes doses da seiva de *Hymenaea courbaril* (SHyc) co-tratadas com Mitomicina C **62**

Capítulo II

Interferência da Seiva de *Hymenaea courbaril* L. sobre a mutagenicidade e recombinogenicidade induzida pelo Cloridrato de Doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

- Tabela 1.** Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento padrão (ST) tratados com diferentes doses da seiva *Hymenaea courbaril* (SHyc) e co-tratados com Doxorrubicina **82**
- Tabela 2.** Frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) de *Drosophila melanogaster*, do cruzamento de alta bioativação (HB) tratados com diferentes doses da seiva *Hymenaea courbaril* (SHyc) e co-tratados com Doxorrubicina **84**

Capítulo III

Assessment of toxic, genotoxic, antigenotoxic and recombinogenic activities of *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae) in *Drosophila melanogaster* and mice

Table 1: Frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes and polychromatic and normochromatic erythrocyte ratio observed in bone marrow of mice treated with *Hymenaea courbaril* sap and co-treated with Mitomycin C and their respective controls **102**

Table 2: Frequency of mutant spots observed in marker-heterozygous trans-heterozygous (MH) and balancer-heterozygous (BH) descendants of *Drosophila melanogaster* from standard (ST) cross treated with *Hymenaea courbaril* sap (Hycs) co-treated with Doxorubicin í í í í í **105**

Table 3: Frequency of mutant spots observed in marker-heterozygous trans-heterozygous (MH) and balancer-heterozygous (BH) descendants of *Drosophila melanogaster* from high bioactivation (HB) cross treated with *Hymenaea courbaril* sap (Hycs) co-treated with Doxorubicin..... **106**

LISTA DE ABREVIATURAS

- °C:** graus celsius
- 40x:** quarenta vezes
- BdS:** beaded serrate
- BH:** heterozigotos para o cromossomo balanceador TM3
- cm:** centímetro
- DL:** dose letal
- D. melanogaster:*** *Drosophila melanogaster*
- DNA:** ácido desoxirribonucléico
- DXR:** doxorrubicina
- ENC:** eritrócitos normocromáticos
- EPC:** eritrócitos policromáticos
- EPCMN:** eritrócitos policromáticos micronucleados
- flr³:** flare³
- g:** grama
- HB:** high bioactivation
- i.p.:** intraperitoneal
- kg:** quilogramas
- mg:** miligramas
- MH:** trans-heterozigotos
- mL:** mililitro
- MMC:** mitomicina C
- MN:** micronúcleos
- mwh:** multiple wing hairs
- ORR:** oregon resistance
- p.c.:** peso corpóreo
- RNA:** ácido ribonucléico
- SMART:** somatic mutation and recombination test
- ST:** standard
- SHyc:** seiva de *Hymenaea courbaril*
- TM3:** third multiple 3
- ²:** qui-quadrado

RESUMO

Hymenaea courbaril L. (família Fabaceae), popularmente conhecida no Brasil como jatobá, é uma espécie tropical que ocorre na floresta semi-decídua da América do Sul. A espécie tem sido utilizada no Brasil para fins culinários e na medicina popular para tratar artrite, disfunção gástrica, inflamação e doenças respiratórias. Devido ao uso generalizado dessa planta como um recurso terapêutico e alimentar, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos, genotóxicos, recombinogênicos e antígenotóxicos da seiva de *Hymenaea courbaril* (SHyc), usando o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongo e o teste de recombinação e mutação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Para avaliar a ação clastogênica e aneugênica pelo ensaio do micronúcleo, os animais foram tratados com 3 concentrações de SHyc (5, 10 e 15 mL/kg de peso corporal). Para avaliar a atividade anticlastogênica e antianeugênica, os animais foram tratados simultaneamente com SHyc e mitomicina C (4mg/kg de peso corporal). Para avaliar as atividades mutagênica e recombinagênica pelo teste SMART, larvas de terceiro estágio provenientes dos cruzamentos padrão (ST) e alta bioativação (HB) foram tratadas com 3 doses de SHyc (0,3; 1,5 ou 3 mL), por aproximadamente 48 horas. Para avaliar a atividade antimutagênica e anti-recombinogênica, larvas provenientes de ambos os cruzamentos foram co-tratadas com 3 doses de SHyc (0,3, 1,5 ou 3 mL) e doxorubicina (0,125 mg/mL). Nossos resultados para o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos mostraram que SHyc não apresentou efeitos citotóxicos, clastogênicos e/ou aneugênicos, mas apresentou atividade anticlastogênica e antianeugênica em medula óssea de camundongos. Os resultados para o teste SMART/asa não demonstraram efeitos mutagênicos e recombinogênicos, mas a ação antimutagênica e anti-recombinogênica foi evidenciado em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

Palavras-chave: jatobá, antianeugênese, anticlastogênese, antimutagênese, anti-recombinogênese.

ABSTRACT

Hymenaea courbaril L. (Family Fabaceae), popularly known in Brazil as jatobá, is a tropical species that occurs in semi-deciduous forest of the South America. The species has been used in Brazil for culinary purposes and in folk medicine to treat arthritis, gastric dysfunction, inflammation and respiratory diseases. Due to the spreading use of this plant as a therapeutic resource and food, the present study aimed to evaluate the toxic, genotoxic, recombinogenic and antigenotoxic effects of *Hymenaea courbaril* sap (Hycs) using the mouse bone marrow micronucleus test and somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. To evaluate the clastogenic and aneugenic activities by micronucleos test the animals were treated with 3 concentrations of Hycs (5, 10 and 15 mL/kg body weight). To evaluate the anti-clastogenic and anti-aneugenic activities, the animals were simultaneously treated with Hycs and mitomycin C (4mg/kg body weight). To evaluate the mutagenic and recombinogenic activities by SMART, three-day-old larvae derived from standard (ST) and high bioactivation (HB) crosses were treated with 3 doses of Hycs (0.3, 1.5 or 3 mL) for approximately 48 hours. To evaluate the antimutagenic and antirecombinogenic activities, larvae derived from both crosses were cotreated with 3 doses of Hycs (0.3, 1.5 or 3 mL) and doxorubicin (0.125 mg/mL). Our results in the mouse bone marrow micronucleus test showed that SHyc exhibited no cytotoxic, clastogenic and/or aneugenic effects, but showed anticytotoxic, anti-clastogenic and /or anti-aneugenic activities in mouse bone marrow. The results for the SMART test showed no mutagenic and recombinogenic effects, but antimutagenic and anti-recombinogenic activities were found in both crosses in somatic cells of *Drosophila melanogaster*.

Key words: jatobá, anti-aneugenic, anti-clastogenic, antimutagenic, anti-recombinogenic.

1.1. Plantas Mediciniais

A utilização de plantas para prevenção, tratamento ou cura de doenças é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade. As civilizações remotas muito contribuíram com o conhecimento das propriedades terapêuticas dos vegetais (Almassy Júnior *et al.*, 2005). Foi através da observação e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas de plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular (Elvin-Lewis, 2001).

Fragments de papiros médicos contendo instruções e receitas de como preparar medicamentos a partir de plantas medicinais datam de cerca de 2600 a.C. (Almassy Júnior *et al.*, 2005). Na Mesopotâmia, cerca de 2400 a.C., escritos antigos relatavam o uso de plantas para fins terapêuticos. Entre essas estavam *Cedrus sp.*, *Culressus sempervirens*, *Glycyrrhia glabra*, *Commiphora sp.* e *Papaver sommiferum* (Andrade, 2007).

Civilizações chinesas, indianas, árabes, egípcias e incas conheciam a ação de várias plantas sobre o organismo humano e deixaram evidências escritas do uso de plantas para o tratamento de uma grande variedade de enfermidades. Os egípcios documentaram em papiros o uso de aproximadamente 700 produtos extraídos de plantas. Na Índia (1000 a.C.), foram documentadas mais de 1000 ervas medicinais (Phillipson, 2001).

Na Grécia, Hipócrates (460-361 a.C.), considerado o pai da medicina em seu tratado *Corpus hipocratum* reuniu a síntese de conhecimentos sobre o uso de plantas para terapia (Silva, 2005) e Teofrasto (Grécia-372 a 285 a.C.) catalogou cerca de 500 espécies vegetais. Posteriormente, Crateus, que viveu no século I a.C., publicou o livro *Rhizotomikon*, a primeira obra que se tem conhecimento sobre plantas medicinais da Grécia. Já no século I d.C., Dioscórides publicou, também na Grécia, um livro com uma lista de 600 plantas medicinais. Nesse mesmo período, Galeno o pai da farmacêutica estudou preparações de plantas com solventes (Balbach, 1980).

Na idade média, mosteiros europeus faziam uso rotineiro de plantas que já eram descritas pela literatura. Existem relatos que os povos árabes, em suas migrações, difundiram diversas plantas medicinais no Mediterrâneo. Após esse período, já no século XVII, Samuel Hahnemann lançou as bases da homeopatia na Alemanha e Maximilian Oskar Bircher-Brener, médico sueco, demonstrou a importância dos alimentos crus e naturais para a manutenção e combate a doenças (Silva, 2005).

... são amplamente utilizados em diversos países. Por volta de 1970, a Organização Mundial de Saúde reconheceu os benefícios da medicina baseada em extratos de plantas, onde começaram a surgir pesquisas e desenvolvimento de medicamentos obtidos de fontes naturais (Sixel e Pecinalli, 2002, Newman *et al.*, 2003). Na África, 80% da população dependem do uso de produtos naturais para alívio de enfermidades, os quais representam alternativas frente ao alto custo dos fármacos sintéticos (Aschwanden, 2001).

1.1.1. Uso de Plantas Medicinais no Brasil

No Brasil, o conhecimento do uso das plantas medicinais é o resultado de uma miscigenação cultural envolvendo africanos, europeus e indígenas, com introdução de espécies exóticas pelos colonizadores e escravos (Engelke, 2003). Na época do descobrimento, os índios já faziam uso de plantas medicinais. Os negros africanos trouxeram informações sobre o uso de fitoterápicos e os imigrantes de diversas partes do mundo contribuíram na ampliação dos conhecimentos sobre as plantas medicinais (Costa e Nepomuceno, 2003; Silva, 2005).

A utilização de plantas para fins terapêuticos no Brasil se deve principalmente à diversidade de espécies consideradas medicinais, alta prevalência e variedade de doenças infecciosas e parasitárias encontradas na maioria das regiões (Martins *et al.*, 2000; Brandão *et al.*, 2008). O alto custo dos medicamentos também incita a população a procurar o apoio na medicina alternativa, onde o uso de remédios preparados com plantas medicinais é de fácil acesso e mais econômicos (Almassy Júnior *et al.*, 2005; Junior *et al.*, 2005).

A expansão da fitoterapia no Brasil pode ser atribuída a diversos fatores, tais como os efeitos adversos de fármacos sintéticos, a preferência dos consumidores por tratamentos naturais, a validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, o desenvolvimento de novas formas de preparações e administrações de produtos fitoterápicos e um melhor conhecimento químico, farmacológico e clínico das drogas vegetais e seus derivados (Junior *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2007).

As plantas medicinais brasileiras ainda são comercializadas em feiras livres, mercados populares e são encontradas em quintais residenciais em todas as regiões do país (Dourado *et al.*, 2005; Morais *et al.*, 2005). As raízes, caules, folhas e frutos de planta são em algumas comunidades, as únicas fontes disponíveis de recursos terapêuticos (Luna *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2005). As plantas são utilizadas na forma de infusão, macerado, unguentos, pomadas, xaropes, cápsulas e também *in natura* (Schimitz *et al.*, 2005). As observações

plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das atividades terapêuticas dos vegetais, mantendo, dessa maneira, o hábito do consumo dessas preparações naturais.

1.1.2. Componentes Químicos de Plantas Medicinais

As plantas produzem, a partir de seu metabolismo, diferentes tipos de substâncias, aparentemente para sua defesa contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores (Rodrigues e Lopes, 2001). Tais substâncias vêm sendo estudadas e caracterizadas, pois estão intimamente relacionadas com os efeitos biológicos desencadeados pelas plantas (Junior *et al.*, 2005; Cavalcanti *et al.*, 2006).

Compostos químicos presentes em plantas podem ser resultantes do metabolismo primário e secundário. O primeiro grupo de compostos engloba as substâncias indispensáveis a sua sobrevivência e que se formam graças ao processo fotossintético. O segundo grupo, oriundo do metabolismo secundário, aparentemente sem atividades essenciais, são denominados princípios ativos ou metabólitos secundários (Di Stasi, 1996).

Os metabólitos secundários embora não sejam produtos essenciais para o organismo e não participem da sua rota bioquímica primária, apresentam funções ecológicas importantes, tais como atração de polinizadores, proteção contra predadores, microrganismos e competidores, evitam a perda de água e aumento de temperatura, atuam como inibidores da germinação, regulam o crescimento, a fertilização e o ambiente da rizosfera garantindo vantagens para a sobrevivência e para a perpetuação da espécie em seu ecossistema (Santos, 2004; Molyneux *et al.*, 2007).

Dentre os metabólitos secundários de plantas estão os compostos fenólicos (flavonóides e taninos), alcalóides, terpenos, óleos essenciais e resinas (Cowan 1999, Duarte, 2006). Os compostos fenólicos, alcalóides e os terpenos são ativos contra vírus, bactérias e fungos. Os terpenos, divididos em diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, hemiterpenos e sesquiterpenos são utilizados contra fungos por romper a membrana lipídica do microrganismo (Cowan, 1999). Esses compostos são sintetizados e depositados em órgãos específicos ou em todas as partes da planta (Harbone, 1990).

Metabólitos secundários são os principais responsáveis pelas propriedades terapêuticas das plantas medicinais. Dessa forma, metabólitos presentes em plantas podem ser úteis para o desenvolvimento de novos agentes farmacêuticos (Souza, 2008).

r esses princípios ativos, evitando assim os possíveis efeitos colaterais de uma mistura heterogênea de compostos presente nas plantas. Assim, nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, visando a obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas (Silva, 2008).

No início do século XX foram isolados os primeiros princípios ativos de produtos vegetais como a morfina, estricnina e quinina (Hamburger e Hostettmann, 1991; Phillipson, 2001). Existe uma grande variedade de princípios ativos extraídos de plantas utilizados para o tratamento de diversas doenças, dentre elas, o câncer (Almeida *et al.*, 2005). Dentre esses estão os alcalóides vegetais derivados da Vinca (Vimblastina e Vincristina), o éster alcalóide derivado do teixo ocidental (*Taxus brevifolia*) e do teixo europeu (*Taxus baccata*) (Taxol) (Oliveira, 2002), Podofilotoxinas (ou epipodofilotoxinas), tendo-se como principais exemplos a Etoposida (VP-16) e Teniposida (VM-26), bem como derivados semi-sintéticos da Podofilotoxina, provenientes da raiz do podófilo (*Podophyllum peltatum*) (Salmonm, 1998; Chabner e Calabresi, 1995).

1.1.3. Propriedades Tóxicas, Mutagênicas e Antimutagênicas de Plantas Medicinais

O uso de plantas como forma medicinal vem atingindo um público cada vez maior (Zan, 2008). Apesar da ampla utilização, pouca informação encontra-se disponível sobre seus constituintes, bem como sobre os riscos que podem oferecer a saúde humana (Pavan-Fruehauf, 2000). Tal fato torna-se preocupante devido ao uso indiscriminado e sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e toxicológico das espécies (Alice *et al.*, 1995; Fonseca *et al.*, 2004).

De modo geral, a população acredita que os fitoterápicos não possuem efeitos colaterais por serem obtidos de fontes naturais. No entanto, os metabólitos secundários presentes em plantas podem apresentar tanto efeitos benéficos como também efeitos indesejáveis ou tóxicos (Simões *et al.*, 2004; Turolla *et al.*, 2006).

Muitas plantas contêm constituintes tóxicos, tais como os alcalóides pirrolizidínicos, ácido erúxico, ácido nítrico, ácido oxálico, digitálicos, flavonóides, furocumarinas, hidrazinas e as quinonas (Pereira, 1992; Chitturi e Farrel, 2000). Algumas plantas também apresentam agentes genotóxicos que provocam lesões no DNA e assim aceleram ou aumentam o aparecimento de mutações que podem estar associadas ao desenvolvimento de neoplasias (Marques *et al.*, 2002; Junior *et al.*, 2005; Sousa, 2008).

essidade de melhores políticas de regulamentação, bem como normas de comercialização e uso de produtos derivados de plantas. Neste sentido, as pesquisas relacionadas aos efeitos de plantas medicinais e seus constituintes devem ser estimuladas e intensificadas. Testes para avaliar o potencial mutagênico e/ou citotóxico de plantas, utilizadas na medicina popular, também devem ser realizados. Somente a partir destas análises torna-se possível mensurar os reais riscos da aplicação das plantas medicinais. Dessa maneira podem-se estabelecer níveis de segurança e eficiência em relação à sua utilização (Cavalcanti *et al.*, 2006; Sousa, 2008).

Por outro lado, as plantas medicinais também possuem várias classes de fitoquímicos que apresentam propriedades anticarcinogênicas, antimutagênicas, antioxidantes e imunomoduladoras (Punturee *et al.*, 2007).

Diversos compostos obtidos de plantas podem atuar como agentes protetores em relação à carcinogênese humana. Tais compostos agem inibindo estágios de iniciação, promoção ou progressão tumoral, bem como atuam bloqueando e destruindo mutágenos fora das células, evitando que estes agentes causem possíveis lesões no DNA e/ou o desencadeamento de processos tumorais (Edenharder *et al.*, 1993).

Estudos recentes, *in vitro* e *in vivo*, têm mostrado que alguns constituintes naturais de plantas exercem atividade moduladora de agentes mutagênicos (Melo *et al.*, 2001; Ohe *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2001). Yuan e colaboradores (2003) reportaram os efeitos protetores do ginseng (*P. ginseng*) contra vários tipos de tumores. Kim e colaboradores (2002) identificaram as propriedades quimiopreventivas de extratos de romã (*Punica granatum*). Muitos flavonóides isolados de plantas têm demonstrado potencial farmacológico, exibindo atividade antitumoral (Frederich *et al.*, 1999). A atividade antimutagênica também tem sido atribuída aos taninos, compostos fenólicos largamente distribuídos em plantas (Imanishi *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 1998).

Produtos naturais, de origem vegetal, apresentam atividade antioxidante relacionada com o sequestro de radicais livres, principalmente de espécies reativas de oxigênio (EROS), implicadas na ocorrência de patologias, tais como o envelhecimento precoce, inflamação crônica, doenças neurodegenerativas, *Diabetes mellitus*, arteriosclerose, doenças auto-imune, carcinogênese e mutagênese (Andrade *et al.*, 2007).

Diante disso, torna-se evidente a importância de identificação e caracterização dos compostos vegetais, bem como a avaliação de seu potencial antimutagênico e/ou anticarcinogênico. Essas medidas podem conduzir estratégias para reduzir o risco da ocorrência de diversas doenças em humanos (Dearfield *et al.*, 2002; Verschaeve *et al.*, 2004).

1.2. *Hymenaea courbaril* L.

Dentre as espécies amplamente utilizadas pela população está a *Hymenaea courbaril*, conhecida popularmente como jatobá, farinheira, fava doce, jataí, jataí vermelho, jatobá-da-caatinga, jatobá-do-cerrado, jatobá-miúdo, jetaí, jutaí, dentre outros. Pertence à família Fabaceae, subfamília Caesalpinoideae. É nativa da mata semidecídua da bacia do Paraná, Centro Oeste, floresta tropical Amazônica e México (Lorenzi, 1998; Silva *et al.*, 2001; Lorenzi e Matos, 2002).

A família Fabaceae compreende aproximadamente 650 gêneros e 18000 espécies, das quais encontram subdivididas nas subfamílias Caesalpinoideae, Faboideae e Mimosoideae (Oliveira, 2001). A subfamília Caesalpinoideae compreende 150 gêneros e 2700 espécies, com ampla distribuição (Biondo *et al.*, 2005). Dentre eles estão os gêneros: *Caesalpinia*, *Dimorphandra*, *Peltophorum*, *Cassia*, *Senna*, *Copaifera* e *Hymenaea* (Coneglian e Oliveira, 2006).

O gênero *Hymenaea* compreende 14 espécies, das quais nove são encontradas no Brasil, ocorrendo em quase todas as regiões, com distribuição uniforme na Amazônia, onde é encontrado nas matas de terra firme de solo argiloso, e algumas vezes em várzeas altas. A maioria das espécies do gênero possui algum valor econômico, fornecendo madeira, resina e fruto comestível, além de possuir variados usos na medicina popular (Melo *et al.*, 2004).

H. courbaril é uma espécie arbórea de 15 a 20 metros de altura, apresentando copas amplas, densas e troncos grossos (**Figura 1**). Suas folhas são alternas, compostas bifolioladas e pecioladas. Os frutos são do tipo vagem, cor marrom-escura e sementes duras envoltas por polpa farinácea (**Figura 2**). Flores grandes com pétalas excedentes ao cálice (**Figura 3**) (Carvalho, 2007). A casca externa do tronco tem cor cinza-clara com pequenos sulcos e espessura de até 10 mm e a casca interna é rosada apresentando uma resina cor de vinho (**Figura 4**) (Lorenzi 1992, Shanley e Medina, 2005).

Essa espécie desenvolve-se em mata de terra firme, sob solo argiloso e também nas proximidades de rios e lagos (Campos e Uchida, 2002). Floresce no período entre dezembro e março e fornece frutos de julho a novembro (Silva *et al.*, 2001).

As principais formas de uso de *H. courbaril* são a obtenção de madeira, preparo de incensos, vernizes, elaboração de produtos cosméticos e como forma alimentícia (Lorenzi e Matos, 2002). Os seus frutos possuem sementes envolvidas por uma polpa amarelo-pálida, farinácea, adocicada, comestível, de sabor e aroma característicos. A polpa é bastante

lendo ser consumida *in natura* ou como farinha para a elaboração de bolos, pães, biscoitos, mingaus, entre outras iguarias (Almeida e Silva, 1994; Silva *et al.*, 2001). Por sua beleza tem sido largamente utilizada na arborização de cidades (Almeida 2001). A resina da madeira é utilizada na indústria e na área farmacêutica (Almeida *et al.*, 1998), sendo normalmente encontrada na base da árvore e é um excelente impermeabilizador natural (Shanley e Medina, 2005).

Na medicina popular todas as partes de *H. courbaril* são utilizadas (casca, polpa dos frutos, raízes, resina e seiva), conferindo diferentes propriedades e usos (Corrêa, 1984; Vieira, 1991). A casca é usada para o tratamento de enfermidades estomacais, intestinais, inflamatórias, como antifúngico, para queimaduras e tosse (Barros, 1982). A seiva é usada para doenças respiratórias e suas folhas para problemas de próstata e cistite crônica (Aguiar, 2009; Guarim-Neto e Morais, 2003; Lorenzi e Matos, 2002).

A polpa do fruto é utilizada como laxante e a resina tida como afrodisíaca, apresentando ainda propriedades tônicas (Brandão, 1991). Outros estudos revelam seu uso em distúrbios cardio-pulmonares, como sedativa, adstringente, para hematúria, diarreia, dispepsia, disenteria, fadiga, cólica intestinal e artrites (Martins *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2001; Miyake *et al.*, 2008).

Outras espécies do gênero *Hymenaea* também são utilizadas na medicina popular no tratamento de hemoptises, infecções pulmonares, problemas estomacais, asma, laringites, hematúria, diarreia e para fraquezas em geral (Verpoorte, 1987; Vila Verde *et al.*, 2003; Gazzaneo *et al.*, 2005; Shanley e Medina, 2005; Agra *et al.*, 2007).



Figura 1: A planta, *Hymenaea courbaril* (Tamayo, 2008)



Figura 2: Fruto de *Hymenaea courbaril* (Andréa, 2011).



Figura 3: Flor e folhas de *Hymenaea courbaril* (Andréa, 2011).



Figura 4: Tronco e madeira de *Hymenaea courbaril* (Andréa, 2011).

1.2.1. Seiva de *Hymenaea courbaril*

O tronco de *H. courbaril* libera uma substância aquosa denominada de seiva ou vinho. Essa possui cores variadas, indo de laranja até marrom bem escuro (**Figura 5**). A seiva (líquido) transforma-se em resina (sólido) quando entra em contato com o ar (Andréa, 2011).

A produção de seiva pela *H. courbaril* é muito variável, apresentando de 15 a 52 litros por árvore. Em média a árvore precisa de um intervalo de seis meses entre coletas. No final do período chuvoso a produção é maior que no período seco. A comercialização da seiva de jatobá é realizada em pequenas quantidades pelos extrativistas diretamente aos consumidores finais. Nos centros urbanos a seiva é adquirida em lojas especializadas em produtos fitoterápicos (Andréa, 2011).

Análises físico-químicas dessa seiva demonstraram que o seu pH é ácido em torno de 4,2 e que essa não apresenta carboidratos, fibras, lipídeos ou proteínas (Andréa, 2011). Estudos fitoquímicos detectaram a presença de flavonóides, taninos e terpenos (Martins *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2001; Aguiar, 2009).

A seiva de *H. courbaril* vem sendo extraída e utilizada pela população para diversos fins, tais como para produção de combustível, verniz vegetal e impermeabilizador de superfícies. Como forma medicinal é utilizada pela população como tônico, para problemas respiratórios e urinários, como fortificante, energético natural, fortalecedor do sistema imunológico, estimulante e é muito utilizada pelos indígenas para melhorar o desempenho sexual (Lima *et al.*, 2007; Andréa, 2011).



Figura 5: Seiva de *Hymenaea courbaril* (Andréa, 2011).

1.2.2. Composição Química de *Hymenaea courbaril*

Estudos fitoquímicos da espécie *H. courbaril* detectaram a presença de compostos fenólicos (flavonóides, procianidinas e taninos), óleos essenciais e terpenos em extratos da casca, folhas, frutos, resina e seiva (Martins *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2001; Miyake *et al.*, 2008; Aguiar, 2009). A semente possui alto teor de fibras (85,31%), de proteínas (9,05%) e de lipídios (5,30%). A fração lipídica apresenta 75% de ácidos graxos insaturados, sendo o ácido linoleico dominante (46,9%).

Além desses compostos foram detectados na espécie a presença de ácido catívico, ácido copálico, ácido eperúico, ácido labdanólico (Nakano e Djerassi, 1961), epicatequina (Artavia *et al.*, 1995, Miyake *et al.*, 2008) e de polissacarídeos como galactose, xilose, glicose e arabinose (Omaira *et al.*, 2007).

A partir do epicarpo de *H. courbaril* foram isolados o éster(-)-zanzibarato de metila (Imamura *et al.*, 2004), e a resina presente nesse epicarpo é composta predominantemente por diterpenos ácidos como o ózoico acompanhados de alguns sesquiterpenos em menor quantidade (Caramori *et al.* 2004).

A análise fitoquímica dos seus frutos também mostrou a presença de sesquiterpenos, tais como o espatulenol, germacreno-D, -copaeno e -cariofileno (Aguiar, 2009). Além desses, outros grupos de terpenos foram isolados dos frutos de *H. courbaril*, como o ácido labdanólico e a crotomaclina (Jayaprakasam *et al.*, 2007).

ácidas isoladas de outras espécies do gênero *Hymenaea* pode-se destacar: atibilina, engelitina e eucrifina de *H. martiana* (Carneiro *et al.*, 1993), ácido gamáico de *H. oblongifolia* (Cunningham *et al.*, 1973), luteolina e tirosina de *H. palustris* (Aguiar, 2009), ácido linolênico e ácido oléico de *H. satignocarpa* (Matuda *et al.*, 2005) e ácido zanzibárico da espécie *H. verrucosa* (Cunningham *et al.*, 1973).

1.2.3. Atividades Biológicas de *Hymenaea courbaril*

Diante do amplo uso de *H. courbaril* como alternativa medicinal, diversos trabalhos relacionados com sua caracterização bioquímica, farmacológica e biológica estão sendo realizados e muitos desses já revelaram atividades antifúngica, antimicrobiana, antioxidante, larvicida e moluscicida (Buckeridge *et al.*, 1997; Abdel-Kader *et al.*, 2002; Takagi *et al.*, 2002; Imai *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2007; Aguiar, 2009).

Rosário e colaboradores (2008) avaliaram os efeitos de polissacarídeos das sementes de *H. courbaril* em macrófagos peritoneais de camundongos e demonstraram que esses provocam aumento na produção de citosinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio.

Em estudos avaliando a viabilidade e capacidade de proliferação celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7 pelo método colorimétrico do MTT e pelo método fotométrico com corante cristal violeta, foi demonstrado que o tratamento com polissacarídeos da semente de *H. courbaril* levou a diminuição da viabilidade e da proliferação celular, apresentando assim atividade citotóxica para essa célula (Silveira, 2010).

Aguiar (2009) realizou estudos avaliando a atividade do óleo essencial das cascas de frutos de *H. courbaril* sobre larvas de *Aedes aegypti* e foi demonstrado que esse óleo apresentou atividade larvicida (Aguiar, 2009). Nesse mesmo estudo, também foi avaliada a atividade alopática do extrato de *H. courbaril* sobre a espécie *Lactuca sativa* L. e os resultados mostraram inibição do crescimento de hipocótilos, indicando a presença de agentes aleloquímicos na espécie (Aguiar, 2009).

A capacidade antioxidante da casca de *H. courbaril* também foi avaliada pelo método DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) e foi observado que a espécie é eficiente em capturar radicais livres, apresentando-se assim como um agente antioxidante (Aguiar, 2009).

Em estudos avaliando a ação do extrato etanólico de *H. courbaril* contra artrite induzida por colágeno em camundongos, foi observado que esse extrato exerceu um efeito inibitório sobre o desenvolvimento de artrite reumatóide induzida (Miyake *et al.*, 2008).

na presente em *H. courbaril*, Miyake e colaboradores (2008) demonstraram que esse componente é capaz de inibir a produção de IFN- e a ativação de macrófagos, além de ter a capacidade de inibir a progressão da encefalomielite auto-imune.

Em estudos avaliando o potencial antifúngico de outra espécie do gênero *Hymenaea* Souza e colaboradores (2008) observaram que extratos das porções aéreas de *H. martiana* foram capazes de inibir o crescimento dos fungos *C. neoformans* e *T. rubrum* que são importantes parasitas em humanos, sendo que em algumas concentrações a inibição chegou a 90%. Os autores atribuíram esse efeito antifúngico a presença de grandes quantidades de triterpenóides nessa espécie. A atividade antifúngica do extrato etanólico de *H. courbaril* também foi demonstrada contra o patógeno vegetal *Pestalotia subculturalis* (Mahabir, 1995).

Atividade antibacteriana e antifúngica da resina de *H. courbaril* foi observada contra *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Mahabir, 1995). Já em ensaios realizados por Agripino e colaboradores (2004), o extrato de folhas de *H. courbaril* não apresentou atividade antibacteriana e/ou antifúngica contra *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Apesar da grande quantidade de estudos relacionados a atividade biológica de *H. courbaril*, não existem até o momento, dados na literatura sobre seu potencial mutagênico e antimutagênico, revelando dessa maneira, a importância do presente estudo.

1.3. Mutagenicidade/ Genotoxicidade

A informação genética de todos os organismos vivos está armazenada nos ácidos nucleicos (DNA e RNA), sendo codificada pelas sequências de bases nitrogenadas. Essa informação é conservada e transmitida para cada célula por sucessivas gerações através de um processo de replicação altamente fiel e preciso (Snustad e Simmons, 2001). No entanto essa transmissão pode não ser um fenômeno estático. Durante a replicação as células mostram-se mais vulneráveis e podem ocasionalmente fixar alterações presentes no DNA, passando a propagá-las como mutações (Bartek e Lukas, 2001; Kai e Wang, 2003; Liu *et al.*, 2003).

Mutações são alterações que podem ser hereditárias no material genético de um organismo. Tais alterações podem ser decorrentes de processos celulares normais (mutações espontâneas) ou podem ser induzidas pela exposição a agentes físicos (radiação ultravioleta ou ionizante), químicos (aflatoxinas B e alcalóides) ou biológicos (vírus, bactérias e parasitas) (Lewin, 2001). Outro fator que também pode levar a mutações é o estresse oxidativo

. O potencial mutagênico é diretamente proporcional ao número de lesões oxidativas no DNA que escapam do mecanismo de reparo (Valko *et al.*, 2004).

A maioria das mutações é adquirida, ou seja, induzida por agentes mutagênicos. Todos os organismos vivos estão permanentemente expostos a substâncias mutagênicas endógenas ou exógenas (ambientais) (Moustacchi, 2000). Os agentes responsáveis pelas diversas alterações genéticas podem ser basicamente classificados em autobióticos ou xenobióticos. Os autobióticos são mutágenos endógenos, a exemplo das espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas *in vivo*. Os xenobióticos são mutágenos existentes no ambiente externo, sendo, portanto, estranhos ao sistema biológico, tais como contaminantes (poluentes do ar e da água), alimentares (aminas heterocíclicas, aditivos e conservantes) e os relacionados com o estilo de vida (nitrosaminas, tabaco e álcool) (Sugimura, 1998).

Os organismos vivos estão frequentemente expostos a diversas substâncias mutagênicas que podem causar danos celulares. Os danos podem afetar processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica, bem como alterar os cromossomos, levando a processos neoplásicos e morte celular. Pelo fato de causarem lesões no material genético, essas substâncias são conhecidas como substâncias genotóxicas (Costa e Menk, 2000). No entanto, para ser mutagênico não basta ser capaz de interagir e lesionar o DNA. Um composto é dito mutagênico quando consegue aumentar a taxa de mutação em um organismo além da taxa espontânea (Gatehouse *et al.*, 1990).

Existem dois níveis de mutações: as mutações cromossômicas e as mutações gênicas. As alterações cromossômicas podem estar relacionadas à estrutura cromossômica em consequência de deleções, duplicações, inversões e translocações ou ao número de cromossomos em decorrência de falhas na citocinese, por não disjunção mitótica. As mutações gênicas são ocasionadas por substituição de bases (transições e transversões), inserções, deleções e translocações (Gatehouse *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 1992).

Um único agente mutagênico é capaz de produzir diferentes eventos mutacionais em organismos com constituição genética distintas. Contudo, a maior parte desses agentes exibe um espectro de mutações característico, que depende de vários fatores, incluindo a natureza das alterações primárias no DNA (modificações de base, de resíduos do carboidrato e fosfato ou quebras nos filamentos), e os subseqüentes efeitos secundários causados pela resposta do organismo a estas modificações. Estes efeitos secundários podem incluir a ação de várias formas de reparo do material genético e a duplicação de cromossomos sobre moldes modificados (Preston *et al.*, 1987; Zaha, 1996).

ações dependem do material genético atingido, se é o germinativo ou o somático. Recentemente foi proposto que as mutações nas células germinativas são responsáveis por produzir mudanças na hereditariedade, acarretando o desenvolvimento de efeitos teratogênicos e de desordens hereditárias múltiplas (Varanda, 2006). As mutações em células somáticas podem estar envolvidas na patogênese de algumas doenças crônico-degenerativas, tais como as cardiovasculares (arteriosclerose) e neurodegenerativas (Alzheimer). Além disso, as mutações somáticas estão intrinsecamente relacionadas com o processo de carcinogênese (De Flora *et al.*, 1996; Andreassi *et al.*, 2000; Kirsch-Volders *et al.*, 2002; Aruoma, 2003; Ross e Margolis, 2005; Scholzová *et al.*, 2006).

É bem documentado que mutações atuam em etapas do processo de carcinogênese e que ensaios que detectam componentes genotóxicos permitem identificar substâncias com risco potencial para desenvolvimento de neoplasias nos seres humanos (Butterworth, 2006). A mutação pode ser o primeiro estágio no processo inicial da formação do tumor e a literatura tem mostrado que mutações em vários genes críticos têm sido encontradas em neoplasias (Hard, 1998; Bishop, 1991; Hansen, 1990; Bridges *et al.*, 1990).

Estudos epidemiológicos mostram que há relação entre o desenvolvimento de neoplasias e hábitos alimentares, pois a dieta é uma das principais vias de exposição do organismo a diferentes componentes mutagênicos e/ou carcinogênicos (Bagatini *et al.*, 2007). Acredita-se que um terço de todos os cânceres humanos possa estar relacionado ao hábito alimentar (Ames, 1983). Trabalhos recentes têm identificado uma ampla variedade de compostos mutagênicos e/ou carcinogênicos provenientes de plantas usadas na alimentação (De Marini, 1998; Gold *et al.*, 2004).

Diante deste cenário, várias pesquisas científicas ressaltam a necessidade de mudanças nos hábitos alimentares da população na tentativa de minimizar os riscos de desenvolvimento de câncer. Para tanto, observa-se uma tendência geral de se investigar o efeito genotóxico, carcinogênico, embriotóxico e/ou teratogênico de substâncias químicas, especialmente as presentes em alimentos (Hussain *et al.*, 2001).

Atualmente, observa-se ainda grandes esforços da comunidade científica para realizar testes de genotoxicidade com plantas medicinais usadas empiricamente pela população. Busca-se com isso identificar os reais riscos mutagênicos e/ou carcinogênicos que tais substâncias vegetais podem oferecer a saúde humana (Maluf e Erdtman, 2003).

Fatores da dieta têm grande importância na metabolização e detoxificação de compostos químicos genotóxicos, podendo diminuir assim a taxa de danos acumulados no DNA e ser utilizados na prevenção de doenças (Bárta *et al.*, 2006). O consumo de componentes da dieta que podem diminuir danos no DNA constitui uma estratégia efetiva para modular e inibir processos mutagênicos, sendo esses compostos denominados agentes moduladores ou antimutagênicos (Rigo, 2009).

O termo *antimutagênico* foi usado originalmente em 1952 para descrever os agentes que reduzem a frequência de mutações espontâneas ou induzidas, independente do mecanismo envolvido (Von Borstel *et al.*, 1996). Os estudos com agentes antimutagênicos se iniciaram no ano de 1950, porém somente a partir da década de 1990 é que o interesse se concentrou na identificação de agentes antimutagênicos, principalmente os de origem natural (Wargovich, 1997).

A antimutagênese caracteriza-se como um processo genético normal, cuja função é manter a estabilidade da estrutura hereditária. Este fenômeno, considerado uma variedade do processo mutagênico, atua na redução da frequência de lesões genéticas através de um sistema multicompetente de antimutágenos endógenos que são ativados em nível molecular, celular ou fisiológico (Gancharova, 1993). Portanto, assim como a caracterização de mutágenos é uma tarefa essencial, a detecção e identificação de antimutágenos é algo igualmente importante, uma vez que estas substâncias podem oferecer grandes benefícios para a medicina e saúde pública, atuando na prevenção de mutações e das doenças a elas relacionadas (Barrai *et al.*, 1992; Karekar *et al.*, 2000).

Antimutágenos têm sido descritos, principalmente, em frutas e legumes (Block, 1992). Diversos metabólitos presentes em muitas plantas impedem ou atenuam a ocorrência de processos mutagênicos e/ou carcinogênicos. Dentre esses estão o ácido ascórbico (vitamina C), ácidos graxos, ácidos linolêicos conjugados, o ácido p-aminobenzóico (PABA), as clorofilas e seus derivados, cumarinas, flavonóides, fibras dietéticas, fitoestrógenos, as glutations, os isotiocianetos aromáticos, a N-acetil-I-cisteína, taninos, tocoferóis (vitaminas E) e outros (Ames, 1983; Ames, 1986; Odin, 1997; Lohman *et al.*, 2001; Rampazo *et al.*, 2002; Nawrot *et al.*, 2003; Erickson, 2003).

Além desses compostos, destacam-se os polifenóis, selênio e carotenóides (Haslam, 1996; Valko *et al.*, 2004). Esses são antioxidantes naturais contidos em plantas que podem ser usados na prevenção dos consequentes danos oxidativos ao DNA e, portanto, são

os (Kittis, 1994; Verhagen *et al.*, 1997; kris-etherton *et al.*, 2002).

Numerosos estudos epidemiológicos têm mostrado uma relação inversa entre a ingestão de frutos e vegetais e o risco de câncer e doenças do coração (Dias, 2008). Dessa forma, a identificação de agentes antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos em alimentos é indispensável e extremamente importante na busca de estratégias para a prevenção dessas doenças por meio de modificações do hábito alimentar (Wargovich, 1997).

A quimioproteção, através dos componentes da dieta, requer não apenas uma avaliação da segurança e eficácia dos possíveis agentes quimiopreventivos em modelos animais e em humanos, mas também um maior conhecimento dos seus mecanismos de ação (De Flora e Ferguson, 2005). Para isso, diversos sistemas testes *in vitro* e *in vivo* estão disponíveis permitindo aos pesquisadores identificar estes agentes protetores (De Flora, 1998).

1.5. Testes Para Avaliação dos Efeitos Mutagênicos e Antimutagênicos de Compostos

Para avaliar os efeitos mutagênicos e antimutagênicos de compostos naturais ou sintéticos, um grande número de testes de curta-duração estão disponíveis. Esses ensaios detectam compostos genotóxicos com potencial risco à saúde humana (Umbunzeiro e Vargas, 2003). Tais modelos são frequentemente estruturados pelos indicadores biológicos que avaliam, ou seja, detectam mutações gênicas, danos cromossômicos ou lesões no DNA. A associação íntima desses indicadores biológicos, bem caracterizados e facilmente quantificados, tem fortalecido a importância dos testes de genotoxicidade (Ribeiro e Marques, 2003).

A função primária dos testes de genotoxicidade é investigar, usando células ou organismos, o potencial de agentes químicos induzirem mutações nas células somáticas ou germinativas (Da Silva *et al.*, 2003). O impacto de materiais tóxicos na integridade e no funcionamento do DNA da célula pode ser estudado em muitos organismos sob diferentes condições (McCarthy e Shugart, 1990). Durante as últimas décadas tem sido demonstrado que nenhum teste utilizado na área de genética toxicológica é capaz de detectar todos os tipos de efeitos genotóxicos. Portanto, é importante realizar uma bateria de testes *in vivo* e *in vitro*, a fim de melhor avaliar a genotoxicidade de compostos (Witte *et al.*, 2007).

Muitos dos testes de detecção de atividades genotóxicas têm sido propostos para identificação de possíveis agentes carcinógenos (Zeiger, 1998), visto que os testes de

na carcinogenicidade. Pois, o câncer é tipicamente uma doença de organismos multicelulares e os fatores que determinam mutagenicidade nestes organismos quase sempre também induzem neoplasias (Erdtmann, 2003).

Além disso, o conhecimento de substâncias capazes de modular os efeitos genotóxicos de agentes químicos e físicos também é de grande importância, porque podem auxiliar no entendimento dos mecanismos de ação desses agentes genotóxicos e contribuir para a diminuição das alterações gênicas que possivelmente resultam no aparecimento de doenças (Takahashi *et al.*, 2001).

Dentre os diversos testes de curta-duração existentes, destaca-se o teste do Micronúcleo em Medula Óssea de Roedores e o teste de Mutação e Recombinação em Células Somáticas de *Drosophila melanogaster* (SMART), ambos selecionados para o presente trabalho.

1.5.1. Teste do Micronúcleo em Medula Óssea de Camundongos

O Teste do Micronúcleo foi proposto inicialmente por Heddle (1973) como uma alternativa simples para avaliar danos cromossômicos. É um teste amplamente utilizado para detecção de agentes clastogênicos, que promovem quebras cromossômicas e de agentes aneugênicos, que provocam a segregação cromossômica anormal, induzindo aneuploidias (Macgregor *et al.*, 1987; Hayashi *et al.*, 1994; Krishna e Hayashi, 2000; Ribeiro, 2003).

Este ensaio é internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada na avaliação do potencial mutagênico para o registro de novos produtos químicos que entram no mercado mundial e como um método de triagem no desenvolvimento de novos fármacos (Hayashi *et al.*, 2000; Ribeiro, 2003). A alta confiabilidade e o baixo custo da técnica contribuem para o sucesso mundial e adoção desse biomarcador para estudos de danos genéticos *in vivo* (Bonassi *et al.*, 2007).

A frequência de micronúcleos (MN) em células humanas ou de roedores tem se tornado um dos parâmetros citogenéticos empregados na rotina dos testes de genética toxicológica para avaliação de agentes químicos e físicos. Os MN podem ser analisados em eritrócitos, células da mucosa oral e/ou linfócitos para a estimativa de danos genéticos induzidos *in vivo* (Hayashi *et al.*, 1983).

Este teste pode ser executado praticamente em qualquer população de células que estejam constantemente em divisão, sendo a medula óssea de mamíferos uma das regiões mais adequadas, visto que suas células levam de 22 a 24 horas para completar um ciclo de

Ribeiro (2003), os eritroblastos da medula óssea sofrem duplicação e se diferenciam em eritrócitos policromáticos (**Figura 7 e 8**).

Na presença de um agente clastogênico, podem ocorrer quebras cromossômicas, gerando fragmentos acêntricos que se atrasam em relação aos elementos com centrômero, ou causar distúrbios no aparato mitótico, de modo que algumas cromátides podem também se atrasar em relação às demais. Assim, um cromossomo inteiro ou fragmentos acêntricos não conseguem migrar para os pólos da célula durante a anáfase e podem não ser incluídos nos núcleos das células filhas após a divisão celular, formando assim os chamados MN, observados no citoplasma de células policromáticas (**Figura 8**) (Ribeiro, 2003). Quando os eritroblastos expõem seu núcleo, ao se transformarem em eritrócitos, os MN permanecem no citoplasma onde são facilmente reconhecíveis (**Figura 8**) (Rabelo-Gay, 1991).

Esses MN podem ser analisados em eritrócitos policromáticos (EPC, eritrócitos imaturos) de medula óssea de camundongos ou ratos (Ribeiro, 2003). Durante um período de 10 e 24 horas, os eritrócitos imaturos são policromáticos (RNA-positivos), pois apresentam grande quantidade de RNA ribossômico. Estes EPC são facilmente corados, devido a quantidade de RNA e diferenciam-se dos eritrócitos maduros ou normocromáticos (ENC) que não contêm RNA ribossômico (Krishna e Hayashi, 2000).

Os EPC são células que ainda estão em estágio imaturo e quando sofrem maturação se transformam em ENC, os quais são lançados na corrente sanguínea. O teste do MN se caracteriza pela observação do efeito do agente testado em EPC anucleados, que têm vida curta e qualquer micronúcleo encontrado representa dano cromossômico recente (Salvadori *et al.*, 2003). Se contarmos os MN apenas em EPC, saberemos que eles se formaram na mitose anterior, na presença do agente mutagênico.

Como o período entre a última divisão e a formação do EPC é de 8 a 12 horas, só se encontram MN induzidos pelo agente cerca de 10 horas após o tratamento. Além disso, o intervalo mínimo dentro do qual os MN podem ser detectados corresponde à duração do estágio de policromático, entre 10 a 24 horas (Rabelo-Gay, 1991).

Na técnica do MN em medula óssea de roedores a avaliação do número de células micronucleadas é obtida através da contagem de 2000 EPC. Também é feita a avaliação da relação EPC/ENC em total de 1000 EPC registrando simultaneamente a frequência de ENC, para avaliar a citotoxicidade de um composto (Heddle e Salamone, 1981). Uma diminuição na proporção de EPC reflete em uma diminuição na relação EPC/ENC, dessa forma essa relação é um parâmetro de citotoxicidade ou depressão celular (Shahrim *et al.*, 2006).

formação do MN podem ser induzidos pelo estresse oxidativo, exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos, defeitos genéticos nos pontos de controle 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 na maquinaria da segregação cromossômica (MacGregor, 2005; Umegaki e Fenech, 2000; Kimura *et al.*, 2004; Rajagopalan *et al.*, 2004; Fenech *et al.*, 2005; Bonassi *et al.*, 2007).

Os compostos aneugênicos e clastogênicos têm diferentes mecanismos de ação. A aneuploidia é induzida pela interação com tubulina e inibição do processo de polimerização necessário para a formação do fuso mitótico, o que leva a perda de cromossomos inteiros. Já os compostos clastogênicos causam quebras, resultando na perda de fragmentos cromossômicos. Acredita-se que o tamanho do MN seja um parâmetro para distinguir danos causados por compostos aneugênicos (MN grandes) de compostos clastogênicos (MN pequenos) (Cammerer *et al.*, 2007).

O aumento da frequência de MN nas células é indicativo da elevação das taxas de mutações por quebras e/ou perdas cromossômicas e o teste do MN *in vivo* em célula de medula óssea de roedores fornece fortes evidências da genotoxicidade sistêmica do composto químico avaliado sob condições experimentais apropriadas (Carvalho *et al.*, 2002; Salvadori, *et al.*, 2003). É importante também ressaltar que o potencial de muitos compostos naturais de modular os efeitos genotóxicos de xenobióticos tem sido identificado utilizando-se o teste do MN como parâmetro de análise (Azevedo *et al.*, 2003).

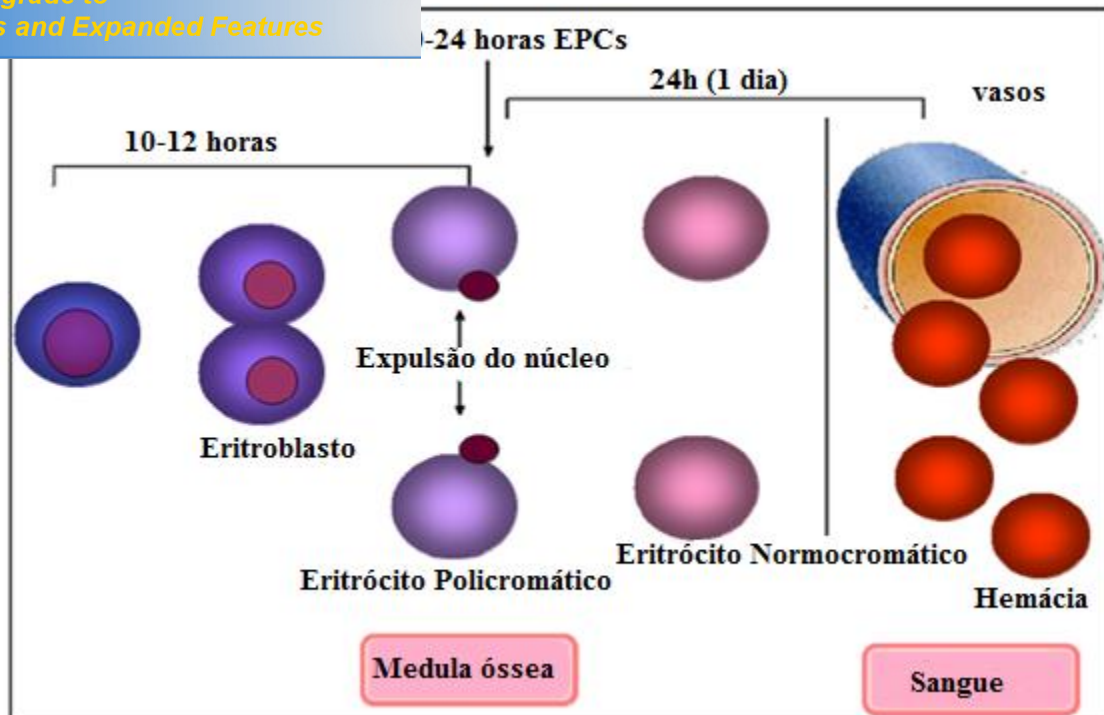


Figura 6: Processo de maturação das células da linhagem eritrocitária (Ribeiro, 2003).

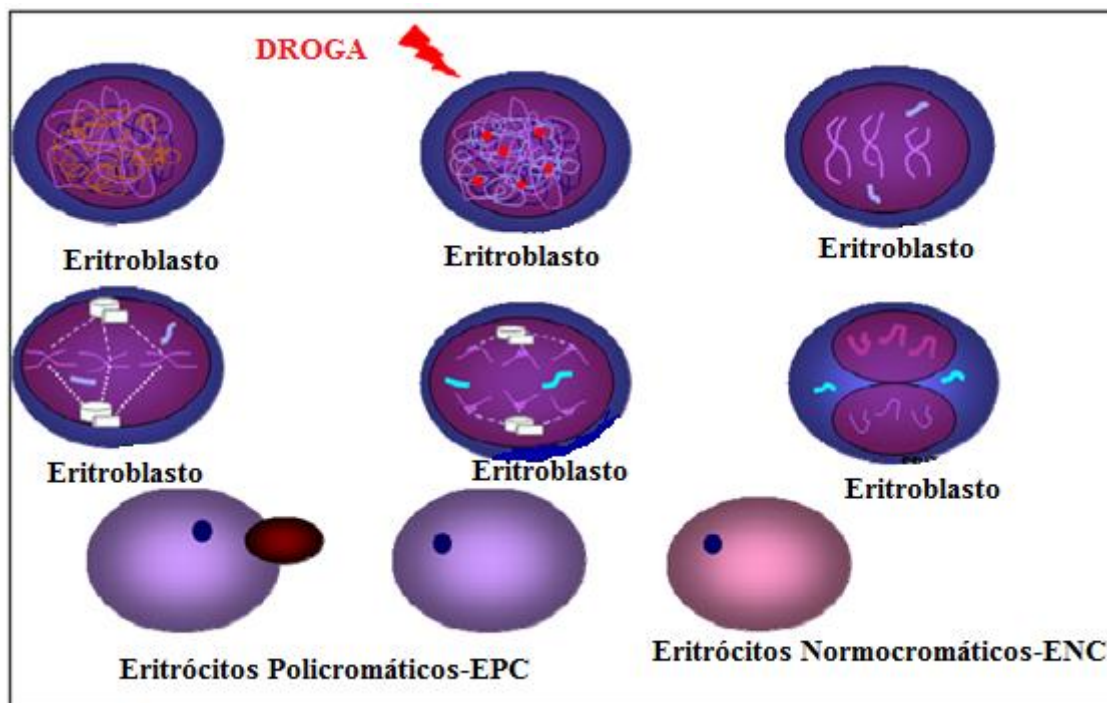


Figura 7: Formação de micronúcleos em eritrócitos da medula óssea (Ribeiro, 2003).

mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation and Recombination Test- SMART).

O teste SMART com *Drosophila melanogaster* foi primeiramente descrito por Graf e colaboradores em 1984. É caracterizado por ser rápido, barato, produzir resultados confiáveis e facilmente reproduzíveis (Graf *et al.*, 1984). O SMART vem sendo amplamente utilizado na detecção de efeitos citotóxicos, genotóxicos e antigenotóxicos de agentes químicos e misturas complexas (Kaya *et al.*, 2002).

A *D. melanogaster*, um organismo eucarioto conhecida popularmente como mosca da fruta, é utilizada há mais de 100 anos em pesquisa genética, em diversos testes para o monitoramento de agentes genotóxicos (Vogel *et al.*, 1999). Oferece diversas vantagens que facilitam seu uso em diferentes protocolos, tais como: pequeno tamanho, fácil cultivo, tempo de geração curto (aproximadamente 10 dias a 25°C), elevado número de progênie, pequena quantidade de cromossomos e capacidade de metabolizar compostos (Graf e Singer, 1992; Graf *et al.*, 1996). Segundo Akmoutsou e colaboradores (2011) o extensivo conhecimento acerca do genoma da *D. melanogaster* tem feito deste organismo um modelo para estudos genéticos em eucariontes, bem como na avaliação dos efeitos tóxicos, genotóxicos e antigenotóxicos.

A comparação do genoma humano com o da *Drosophila* aponta para a alta conservação evolutiva, não apenas em nível da sequência do DNA, mas principalmente em relação às funções gênicas. São também relevantes os dados obtidos a partir de análise proteômicas, uma vez que 60 % dos 289 genes relacionados a doenças humanas apresentam homólogos em *Drosophila*, dos quais, 75% portam sequências protéicas similares nestes dois organismos (Tickoo e Russel, 2002). Com o término do projeto de sequenciamento do genoma da *Drosophila*, estudos de comparação mostraram que dois terços dos genes implicados em cânceres humanos têm equivalência na mosca, incluindo o supressor de tumor, *TP53*, pois compartilham domínios similares (Sutcliffe e Brehm, 2004).

O teste SMART/asa foi desenvolvido para detectar a perda de heterozigose de genes marcadores específicos que determinam a expressão de fenótipos detectáveis nas asas da mosca adulta. Esse teste baseia-se na identificação de pelos ou tricomas com fenótipos mutantes que representam a expressão fenotípica da ocorrência de lesões em nível de DNA (Graf *et al.*, 1984; Dias, 2008).

As lesões são primordialmente induzidas nas células dos discos imaginais que, por diversas divisões mitóticas, darão origem a estruturas do corpo da mosca adulta, como as asas.

ca em uma das células do disco imaginal, tal alteração estará presente em todas as células descendentes, formando um clone de células mutantes detectadas como uma mancha de pelos diferentes na asa da mosca adulta. Essas manchas, com fenótipos característicos indicam a ocorrência de eventos genéticos relacionados com mutações pontuais, aberrações cromossômicas e rearranjos estruturais devidos à recombinação mitótica (Graf *et al.*, 1984; 1989; 1996).

Diversos trabalhos apontam que a Recombinação Homóloga (RH) é um dos mecanismos responsáveis pela perda de heterozigose de genes que estão envolvidos na regulação do ciclo celular. A RH também pode induzir eventos como a conversão gênica, deleção de segmentos cromossômicos e translocações e é considerada como um dos principais processos de alterações genéticas envolvidos na gênese e progressão de processos carcinogênicos (Bishop e Schiestl, 2001; Lehmann, 2003).

Este bioensaio permite a detecção simultânea de recombinação mitótica e mutações gênicas e cromossômicas através da análise dos genótipos trans-heterozigoto para os genes marcadores *mwh* e *flr³* (*mwh/flr³*) e heterozigotos para o cromossomo balanceador *TM3* (*mwh/TM3*) (Rigo, 2009). Os fenótipos *flr³* e *mwh* manifestam-se devido a perda da heterozigose induzida por diferentes eventos genotóxicos.

O teste fornece resultados de eventos mutacionais ocorridos, como mutações gênicas e cromossômicas e recombinações somáticas, quantifica a contribuição da recombinação e mutação induzida por compostos em estudo e detecta compostos genotóxicos e antigenotóxicos de ação direta ou indireta, de acordo com o nível basal e alto de enzimas de metabolização do tipo citocromo P450 (Sousa, 2008).

Para a realização do teste SMART são utilizadas 3 linhagens mutantes de *D. melanogaster*:

- 1) **Linhagem multiple wing hairs (mwh):** os indivíduos dessa linhagem possuem um gene marcador no braço esquerdo do cromossomo 3 e é caracterizado por expressar três ou mais pelos por célula (pelos múltiplos) (**Figura 8c**), diferentemente da linhagem selvagem onde há a expressão de apenas um pelo por célula (**Figura 8a**) (Dias, 2008);
- 2) **Linhagem flare³ (flr³):** os indivíduos dessa linhagem possuem o gene marcador *flr³* localizado também no braço esquerdo do cromossomo 3, em uma região mais proximal do centrômero, e é caracterizado por expressar um pelo modificado na célula, com a base alargada e semelhante a uma õchama de velaö (**Figura 8b**). Esse gene marcador é letal em homozigose recessiva e as moscas não se desenvolvem até a fase adulta (Graf *et al.*, 1984; Guzmán-Rincon e Graf, 1995). Em função desta letalidade foi desenvolvido um cromossomo

... (Figura 3, beaded-serrate), que mantém a heterozigose da linhagem. O balanceador impede eventos de recombinação (Lindsley e Zimm, 1992);

- 3) **Linhagem Oregon R, flare³ (ORR)**: essa linhagem é caracterizada por ser capaz de ativar promutágenos, de forma mais eficiente, que dependem da ativação metabólica por enzimas citocromo P450, também conhecidas como CYP6A2. A linhagem ORR apresenta o marcador *flr³* e carrega os cromossomos 1 e 2 de uma linhagem chamada de Oregon R (ORR), resistente ao DDT, diferindo-se assim da linhagem *flr³* (Dapkus e Merell, 1977). Essa linhagem possui, assim, alta capacidade de bioativação, devido altos níveis de expressão de enzimas citocromo P450 (Hallstrom e Blanck, 1985).

A partir dessas três linhagens são realizados dois tipos de cruzamentos para o teste SMART/asa:

- a) **Cruzamento padrão (ST)** - fêmeas virgens *flr³* são cruzadas com machos *mwh* (Graf *et al.*, 1989);
- b) **Cruzamento de alta bioativação metabólica (HB)** ó fêmeas virgens ORR são cruzadas com machos *mwh* (Graf e Van Schaik, 1992).

De ambos os cruzamentos é possível a obtenção de dois tipos de descendentes: trans-heterozigotos para os marcados recessivos *mwh* e *flr³* (**MH-** *mwh*+/*flr³*) que possuem asas arredondadas e os heterozigotos para o cromossomo balanceador TM3 (**BH-** *mwh*+/*TM3Bd^S*) que possuem asas serrilhadas (**Figura 9**) (Dias, 2008).

Nos descendentes MH é possível detectar a ocorrência de diferentes eventos genéticos, tais como mutações de ponto, aberrações cromossômicas e recombinação mitótica. Já nos descendentes BH podem-se detectar apenas mutações de ponto e aberrações cromossômicas. Isso se deve ao fato que o balanceador TM3 contém múltiplas inversões que impedem eventos de recombinação (Guzmán-Rincon e Graf, 1995).

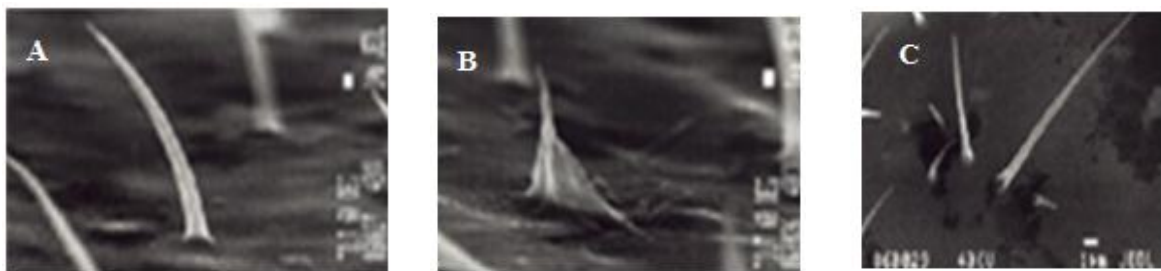


Figura 8: Fenótipos dos pelos de *D. melanogaster* (microscopia eletrônica): A) pelos normais; B) pelos *flr³* e C) pelos *mwh*.

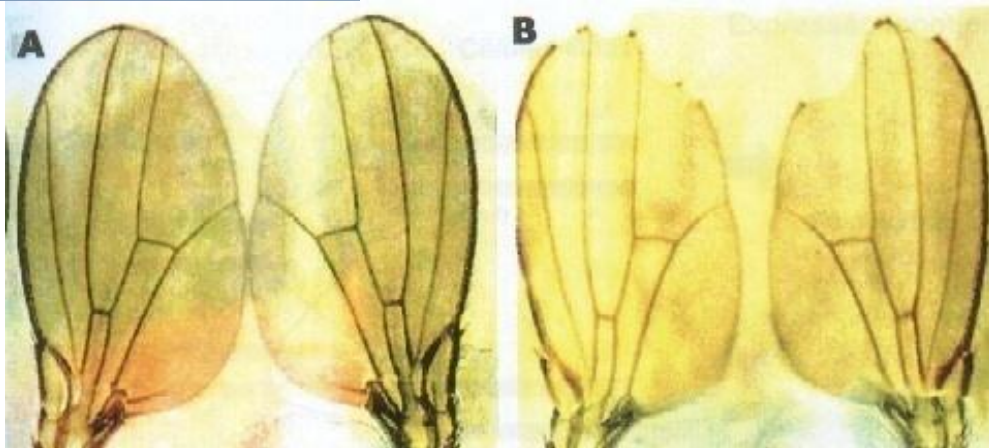


Figura 9: Asas dos indivíduos trans-heterozigotos (A) e heterozigotos balanceados (B).

Os pelos mutantes são classificados em manchas: simples quando expressam apenas um dos marcadores *mwh* (**Figura 10**) ou *flr³* (**Figura 11**) originadas por mutação, deleção, não-disjunção ou recombinação distal; e gêmeas quando expressam os dois marcadores *mwh* e *flr³* (**Figura 12**) na mesma mancha e são originadas exclusivamente por eventos recombinacionais (Graf *et al.*, 1984).

Conforme o momento de indução do dano genético e do tempo de ação da genotoxina durante a embriogênese pode-se encontrar variações no número de células mutantes presentes nas manchas. Quanto ao tamanho, as manchas se classificam em simples pequenas, quando possuem um ou dois pelos mutantes, caracterizadas por se formarem durante o último e penúltimo ciclo de divisão mitótica, que ocorrem na fase de pupa. Ou manchas simples grandes, se houver três ou mais pelos mutantes, são alterações produzidas mais cedo, ou seja, são formadas durante o desenvolvimento larval no início das divisões mitóticas (Graf *et al.*, 1998). Como células monossômicas ou portadoras de grandes deleções dividem-se raramente, aumentos restritos ao número de manchas simples pequenas podem ser indicativos de clastogênese ou aneugênese (Graf *et al.*, 1995).



Figura 10. Fotomicrografia mostrando pelos múltiplos (seta) observados em microscópio óptico de luz (aumento de 40x).

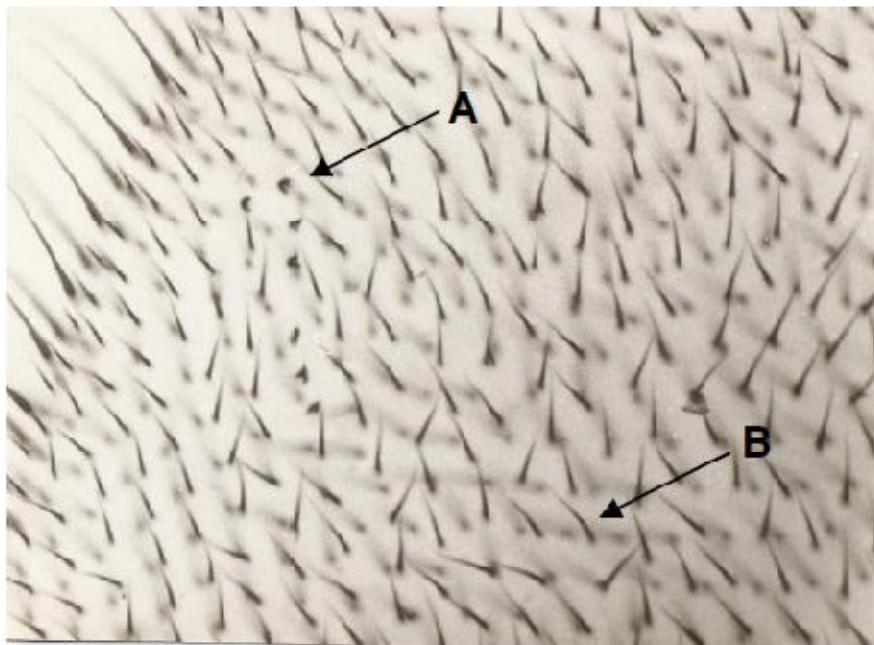


Figura 11. Fotomicrografia mostrando pelos mutantes do tipo flare (seta A) e pelos normais (seta B) observados em microscópio óptico de luz (aumento de 40x).

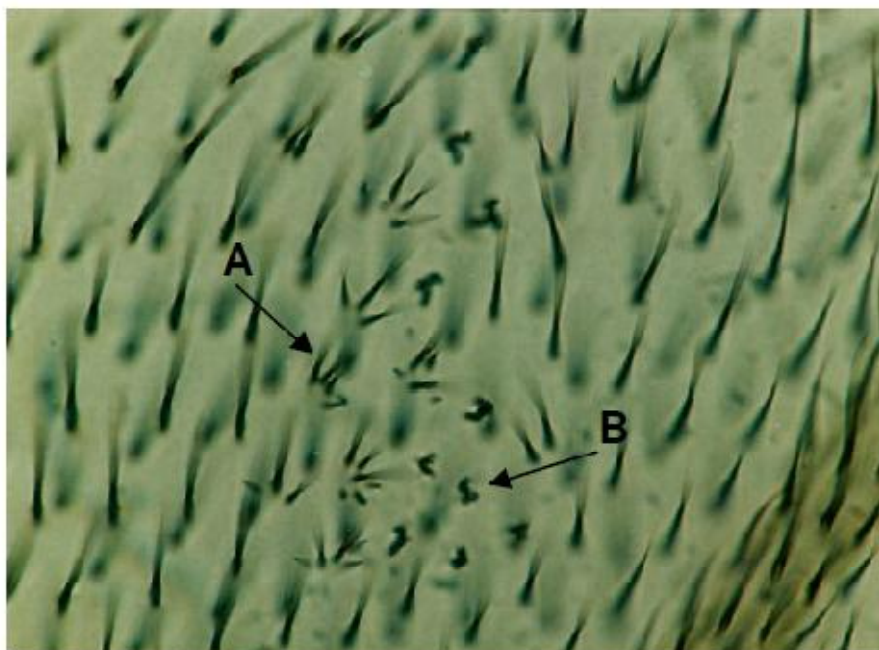


Figura 12. Fotomicrografia mostrando mancha gêmea [contendo pelos múltiplos (**seta A**) e pelos flare (**seta B**) adjacentes] observada em microscópio óptico de luz (aumento de 40x).

1.6. Compostos Usados em Testes para Avaliação dos Efeitos Mutagênicos e Antimutagênicos de Substâncias

O potencial antigenotóxico de uma determinada substância é avaliado utilizando reconhecidos indutores de danos no DNA, como agentes agressores associados às substâncias testes. Nessas avaliações, mutágenos têm sido utilizados em associação com substâncias com potencial antigenotóxico (Brockman *et al.*, 1992; De Flora *et al.*, 1992; Gebhart, 1992; Kuroda *et al.*, 1992; Mitscher *et al.*, 1992). Além disso, compostos mutagênicos têm sido utilizados em testes de genotoxicidade como controle positivo (Ribeiro *et al.*, 2003).

Para o presente estudo foram utilizados a Mitomicina C como controle positivo (agente indutor de lesões) para o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos e a Doxorubicina como controle positivo (agente indutor de lesões) para o teste SMART.

1.6.1. Mitomicina C (MMC)

A Mitomicina C (MMC) é um antibiótico isolado da espécie *Streptomyces caespitosus*. Apresenta-se sob a forma de cristais azul-violeta. Sua molécula possui três grupos reconhecidamente carcinostáticos: um anel de aziridina, o grupo quinona e o grupo octano (**Figura 13**) (Ribeiro *et al.*, 2003).

É comumente usada como quimioterápico em aplicações endovenosas, para tratamento de corioepitelioma, sarcoma de células reticulares, seminoma, tumores epiteliais, tumores da cavidade bucal, pulmões, intestino, pâncreas e estômago (Crooke e Bradner, 1976; Bruijn *et al.*, 1992; Bradner, 2001).

A ação de MMC pode ocorrer por mecanismos distintos: alquilação do DNA e geração de radicais livres como o superóxido e radicais hidroxil, que induzem quebras na fita de DNA (Kumar *et al.*, 1992; McGuinness *et al.*, 1991). Os radicais livres gerados pela MMC têm influência na citotoxicidade devido à extensão do dano que causam ao DNA e a inabilidade da célula em reparar a lesão (Doroshov, 1986; Satorelli *et al.*, 1989).

Segundo Rigo (2009) a MMC é um agente que realiza ligação cruzada com o DNA. Drogas que formam ligações cruzadas com o DNA inibem a replicação, bloqueando a divisão celular e impedindo a transcrição e a síntese protéica, o que conseqüentemente acarreta a morte celular (Balis, 1968; Kraut e Drnovsek-Olup, 1996; Stream e Vanlleuwen, 2000).

Vários trabalhos na literatura demonstram sua eficácia como inibidor do crescimento tumoral, por sua ação direta sobre o DNA (Hu *et al.*, 2000). A MMC atua bloqueando a replicação de DNA e RNA e inibindo a síntese protéica, sem ação específica no ciclo celular. Células em rápida atividade proliferativa são mais suscetíveis à ação da droga (Calabresi e Chabner, 1990).

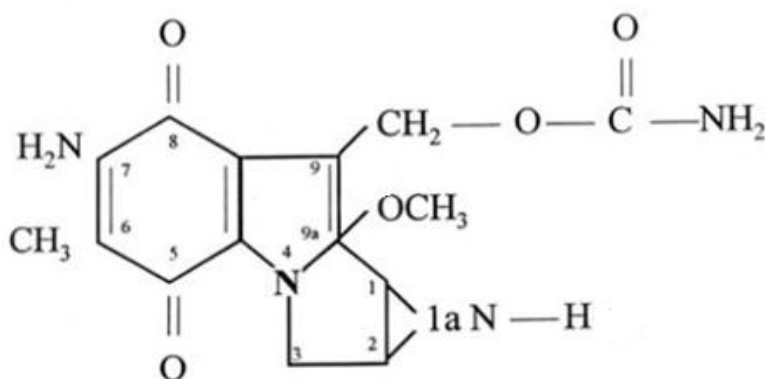


Figura 13. Fórmula estrutural do quimioterápico Mitomicina C (Ribeiro *et al.*, 2003).

A Doxorubicina (DXR) é um antibiótico extraído de um fungo conhecido como *Streptomyces peuceltius*, amplamente utilizada como antineoplásico, principalmente contra câncer de mama, ovário, leucemia, pulmão e testículo (**Figura 14**). A DXR é uma das drogas anti câncer mais utilizadas em fase clínica. Essa droga é rapidamente metabolizada no fígado, produzindo um metabolito alcoólico, o adriamicinol (Chiuchetta e Castro-Prado, 2002).

Este fármaco é usado no tratamento de vários tipos de tumores: leucemia linfoblástica, leucemia mieloblástica aguda, tumor de Wilms, neuroblastoma, sarcoma de pele leve, sarcoma de medula, câncer de mama, ovários, bexiga, tireóide, gástrico, linfoma de Hodgkins e câncer de pulmão de pequenas células (Micromedex, 2005).

A citotoxicidade da DXR contra as células cancerosas e seus efeitos tóxicos a vários organismos estão relacionados a diferentes mecanismos de ação (Tallaj *et al.*, 2005). Dentre esses estão a propriedade de intercalar seus anéis entre os pares de bases dos nucleotídeos de DNA e de se ligar à membrana celular lipídica (Dias, 2008). A DXR é um agente que interage com a topoisomerase II, podendo induzir quebras simples e duplas na molécula de DNA, e também gerar radicais livres de oxigênio (Rezende *et al.*, 2011).

Além disso, outros mecanismos também são sugeridos: (I) ligação ao DNA e alquilação; (II) pontes inter e intra-cadeias de DNA; (III) interferência no processo de separação da dupla fita de DNA e na atividade da helicase (Minotti, 2004). Visto que algumas destas atividades independem da duplicação celular para induzirem lesões no material genético, existe a possibilidade deste composto também gerar danos em células não-proliferativas.

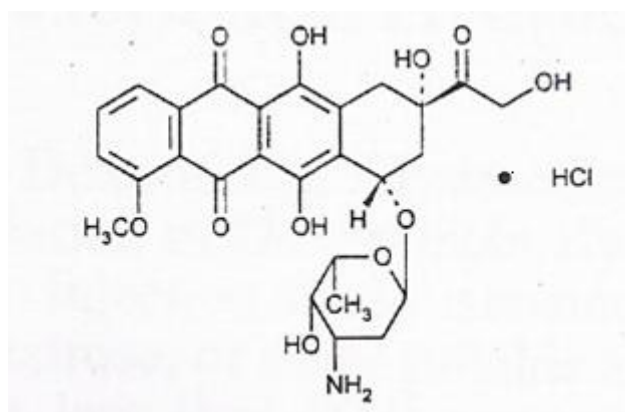


Figura 14: Fórmula estrutural do quimioterápico Doxorubicina (Merck, 1996)

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Tendo em vista as atividades biológicas apresentadas da espécie *Hymenaea courbaril*, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade tóxica, genotóxica e antigenotóxica da seiva de *H. courbaril* pelo teste do micronúcleo em células da medula óssea de camundongos e pelo teste SMART/asa em células somáticas de *D. melanogaster*.

2.2. Específicos

- Avaliar os possíveis efeitos citotóxicos da seiva de *H. courbaril* pelo teste do micronúcleo em células da medula óssea de camundongos;
- Avaliar os possíveis efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos da seiva de *H. courbaril* pelo teste do micronúcleo em células da medula óssea de camundongos;
- Avaliar os possíveis efeitos anticitotóxicos, anticlastogênicos e/ou antianeugênicos da seiva de *H. courbaril* pelo teste do micronúcleo em células da medula óssea de camundongos;
- Avaliar os possíveis efeitos tóxicos da seiva de *H. courbaril* em larvas de *D. melanogaster*;
- Avaliar os possíveis efeitos mutagênicos e/ou recombinogênicos da seiva de *H. courbaril* pelo teste SMART/asa em células da asa *D. melanogaster*;
- Avaliar os possíveis efeitos antimutagênicos e/ou anti-recombinogênicos da seiva de *H. courbaril* pelo teste SMART/asa em células da asa *D. melanogaster*.

3. REFERÊNCIAS

ABDEL-KADER, M., BERGER, J.M., SLEBODNICK, C., HOCH, J., MALONE, S., WISSE, J.H., WERKHOVEN, M.C.W., MAMBER, S.O.G.I., KINGSTON, D.G.I. Isolation and Absolute Configuration of *ent*-Halimane Diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname Rain Forest. **Journal of Natural Products**, v.65, p.11-15 (2002).

AGRA M.F., FREITAS P.F., BARBOSA FILHO J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.114640 (2007).

AGRIPINO, D.G., LIMA, M.E.L., SILVA, M.R., MEDA, C.I., BOLZANI, V.S., CORDEIRO, I., YOUNG, M.C.M., MORENO, P.R.H. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities. I. Atlantic rain forest-Ecological station Juréia-Itatins. **Biota Neotropica**, v.4, p.1-15 (2004).

AGUIAR, J.C.D. **Etudo fitoquímico e biológico de *Hymenaea courbaril* L.** Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Química. Fortaleza: Universidade Federal do Paraná, 2009.

AKMOUTSOU, P., MADEMTZOGLU, D., AKOU, I., ONOUFRIADIS, A., PAPADOPOULOU, X., KOUNATIDIS, I., FRANTZIOS, G., PAPADAKIS, G., VASILIAKIS, K., PAPADOPOULOS, N.T., MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Evaluation of toxicity and genotoxic effects of spinosad and deltamethrin in *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera oleae*. **Pest Management Science**, v.67, p.1534-1540 (2011).

ALICE, C.B., SIQUEIRA, N.C.S., MENTZ, L.A., SILVA, G.A.A., JOSÉ, K.F.D. **Plantas medicinais de uso popular (Atlas farmacognóstico)**. Canoas: Editora ULBRA, (1995). 205 p.

ALMASSY JÚNIOR, A.A., LOPES, R.C., ARMOND, C., SILVA, F., CASALI, V.W.D. **Folhas de chá ó plantas medicinais na terapêutica humana**. Viçosa: Editora UFV, (2005). 233p.

ALMEIDA, S.P.A. **Arvores fruteiras nativas do Cerrado com potencial para arborização urbana**, Brasília, DF. Resumos, IX Encontro nacional de arborização humana. Livro de resumos 18 p. 2001.

ALMEIDA, S.P.A., PROENÇA, C.E.B., SANO, S.M., RIBEIRO, J.F. **Cerrado: Espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa, 1998. 464p.

ALMEIDA, S.P.A., SILVA, J.A. **Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA, 1994.

ALMEIDA, V.L., LEITÃO, A., REINA, L.C.B., MONTANARI, C.A., DONNIEI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v.28, p.118-129 (2005).

AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, v.221, p.1256-1264 (1983).

AMES, B.N. Carcinogens and anticarcinogens, in: D.M. Shankel et al. (eds.) **Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms**. New York: Plenum, p. 7-35(1986).

ANDRADE, L.S. **Estudo do potencial mutagênico e antimutagênico da *Curatella americana* L.** Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Biologia. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2007.

ANDRÉA, A. **Guia de boas práticas para a extração de seiva de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.)**, Rio Branco: IPAM/USAID (2011). 35 p.

ANDREASSI, M.G., BOTTO, N., COLOMBO, M.G., BIGINI, A., CLERICO, A. Genetic instability and arteriosclerosis: can somatic mutations account for the development of cardiovascular diseases? **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.265-269 (2000).

ARTAVIA, D., BARRIOS, M., CASTRO, O.A. A flavanonol rhamnoside from *Hymenaea courbaril* leaves. **Fitoterapia**, v.66, p.91-92 (1995).

ARUOMA, O. Neuroprotection by dietary antioxidants: New age of research. **Journal Nahrung/Food**, v.46, p.381-382 (2003).

ASCHWANDEN, C. Herbs for health, but how safe are they. **Bull World Health Organ**, v.79, p.691-692 (2001).

AZEVEDO, L., GOMES, J.C., STRIGHETA, P.C., GONTIJO, A.M., PADOVANI, C.R., RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food and Chemistry Toxicology**, v.41, p.1671-1676 (2003).

BAGATINI, M.D., SILVA, A.C.F., TEDESCO, S.B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.7, p.444-447 (2007).

BALBACH, A. **A Flora Nacional na Medicina Doméstica**, São Paulo: Editora EDEL, 17^a Edição (1980).

BALIS, M.E. Seminars on Lesch-Nyhan syndrome. Aspects of purine metabolism. **Federation Proceedings**, v.27, p.1067-1074 (1968).

BARRAI, I., BARALE, R., SCAPOLI, C., AMBROSINO, P., BARETTA, M., SBRANA, C., MICHELETTI, R., LOPRIENO, N. The analysis of the joint effect of substances on reversion systems and the assessment of antimutagenicity. **Mutation Research**, v. 267, p.173-182 (1992).

BARROS, M.A.G. Flora medicinal do Distrito Federal. **Brasil Florestal**, v. 12, p. 35-45 (1982).

OVÁ, Z., SERTÁKOVA, H., LANGOVÁ, M., TUREK, B., BARTOVA, J. Current trends and perspectives in nutrition and cancer prevention. **Neoplasma**, v.53, p.19-25 (2006).

BARTEK, J., LUKAS, J. Mammalian G1-and S-phase checkpoints in response to DNA damage. **Current Opinion in Cell Biology**, v.13, p.738-747, 2001.

BIONDO, E., MIOTOO, S.T.S., WITTMANN, M.T.S. Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinoideae Leguminosae do Sul do Brasil. **Ciência Florestal**, v.15, p.241-248 (2005).

BISHOPE, A.J., SCHIESTL, R.H. Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. **Biochimica e Biophysica Acta**, v.1471, p.109-121 (2001).

BISHOP, J.M. Molecular themes in oncogenesis. **Cell**, v.64, p.235-248 (1991).

BLOCK, G. The data support a role for antioxidants in reducing cancer risk. **Nutrition Reviews**, v. 50, p. 207-213 (1992).

BONASSI, S., ZNAOR, A., CEPPI, M., LANDO, C., CHANG, W. P., HOLLAND, N., KIRSCH-VOLDERS, M., ZEIGER, E., BAN, S., BARALE, R., BIGATTI, P., BOLOGNESI, C., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., FABIANOVA, E., FUCIC, A., HAGMAR, L., GORDANA, J., MARTELLI, A., MIGLIORE, L., MIRKOVA, E., SCARFI, M., ZIJNO, A., NORPPA, H., FECECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, v.28, p.625-631 (2007).

BRADNER, W.T. Mitomycin C: a clinical update. **Cancer Treatment Reviews**, v.27, p.35-50 (2001).

BRANDÃO, M.G.L., ZANETTI, N.N.S., OLIVEIRA, P., GRAEL, C.F.F., SANTOS, A.C.P., MONTE-MÓR, R.L.M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopeia. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.120, p. 141-148 (2008).

BRANDÃO, M. Plantas medicamentosas do Cerrado Mineiro. **Informe Agropecuário**, v.15, p. 15-20 (1991).

BRIDGES, B.A., BOWYER, D.E., HANSEN, E.S., PENN, A., WAKABAYASHI, K. Report of ICPEMC Subcommittee 7/1. The possible involvement of somatic mutations in the development of atherosclerotic plaques, **Mutation Research**, v.239, p.143-187 (1990).

BROCKMAN, H.E., STACK, H.F., WATERS, M.D. Antimutagenicity profiles of some natural substances. **Mutation Research**, v.267, p.157-172 (1992).

BRUIJN, E.A., SLEEBOOM, H.P., VAN HELSDINGER, P.J.R.O., VAN OOSTEROM, A.T., TJADEN, U.R., MAES, R.A.A. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of intravesical Mitomycin C upon different dwelling times. **International Journal of Cancer**, v.51, p.359-64 (1992).

H.J., MENDES, C.J.M.; REID, J.S.G., GIDLEY, M.J., VIEIRA, C.C.J. A new family of oligosaccharides from the xyloglucan of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae) cotyledons. **Carbohydrate Research**, v.303, p.233-237 (1997).

BUTTERWORTH, B.E. A classification framework and practical guidance for establishing a mode of action for chemical carcinogens. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.45, p.9-23 (2006).

CALABRESI, P., CHABNER, B.A. Antineoplastic agents. In: Goodman Gilman A., Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P. **Pharmacological basis of therapeutics**. New York: Pergamon Press, p.1247-8 (1990).

CAMMERER, Z., ELHAJOUJI, A., KIRSCH-VOLDERS, M., SUTER, W. Comparison of the peripheral blood micronucleus test using flow cytometry in rat and mouse exposed to aneugens after single-dose applications. **Mutagenesis**, v.22, p.129-134 (2007).

CAMPOS, M.A.A., UCHIDA, T. Influência do sombreamento no crescimento de mudas de três espécies amazônicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.281-288 (2002).

CARAMORI, S.S., LIMA, C.S., FERNANDES, K.F. Biochemical characterization of selected plant species from Brazilian savannas. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v.47, p.253- 259 (2004).

CARNEIRO, E., CALIXTO, J.B. MONACHE, F.D. YUNES, R.A. Isolation, chemical identification, and pharmacological evaluation of eucryphin, astilbin, and engelitina obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. **International Journal of Pharmacognosy**, v.31, p.38-46 (1993).

CARVALHO, M. B., RAMIREZ, A., GATTÁS, G.R.F., GUEDES, A.L., AMAR, A., RAPOPORT, A., NETO, J.C.B., CURIONI, O.A. 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, p.317-322 (2002).

CARVALHO, R.P.E. Jatobá-do-Cerrado: *Hymenaea stignocarpa*. **Embrapa**, 2007.

CAVALCANTI, B.C., COSTA-LOTUFO, L.V., MORAES, M.O., BURBANO, R.R., SILVEIRA, E.R., CUNHA, K.M.A., RAO, V.S.N., MOURA, D.J., ROSA, R.M., HENRIQUES, J.A.P., PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.388-392 (2006).

CHABNER, B.A., CALABRESI, P. In: GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: Editora Mc Graw Hill, p. 903-949 (1995).

CHITTURI, S., FARRELL, G.C. Herbal hepatotoxicity: an expanding but poorly defined problem. **Journal Gastroenterology and Hepatology**, v.15, p.1093-1099 (2000).

CHIUCHETTA, S.J.R., CASTRO-PRADO, M.A.A. Doxorubicin and etoposide induce somatic recombination in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.255-259 (2002).

D.M.T. Anatomia comparada dos limbos cotiledonares e eominares de dez especies Caesalpinoideae (Fabaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, p.193-207 (2006).

CORRÊA, P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Maranhão: IBDF, 1984.

COSTA, R.M.A., MENK, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento**, v. 3, p. 24-26 (2000).

COSTA, W.F., NEPOMUCENO, J.C. Efeito protetor do chá de cogumelo do sol (*Agaricus blazei* Muril) contra ação genotóxica do uretano em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. **Revista ciências farmacêuticas**, v. 24, p. 153-158 (2003).

COWAN, M.M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p.564-582 (1999).

CROOKE, S.T., BRADNER, W.T. Mytomycin C: a review. **Cancer Treatment Reviews**, v.3, p.121-39 (1976).

CUNNINGHAM, A., MARTIN, S.S., LANGENHEIM, J.A. Resin acids from two amazon species of *Hymenaea*. **Phytochemistry**, v.12, p.633-635 (1973).

DAPKUS, J., MERRELL, D.J. Chromosomal analysis of DDT resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.87, p.685-697 (1977).

DA SILVA, J., HEUSER, V., ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: **Genética Toxicológica**. DA SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. Porto Alegre: Alcance, p.166-180 (2003).

DEARFIELD, K.L., CIMINO, M.C., MCCARROLL, N.E., MAUER, I., VALCOVIC, L.R., Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research**, v.521, p.121-135 (2002).

DE FLORA, S., BRONZETTI, G., SOBELS, F.H. Assessment of antimutagenicity and anticarcinogenicity. **Mutation Research**, v.267, p.153-155 (1992).

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

DE FLORA, S., IZZOTTI, A., RANDEATH, K., RANDEATH, E., BARTSCH, H., NAIR, J., BALANSKY, R., VAN SCHOOTEN, F., FRONZA, G., WALSH, D., LEWTAS, J. DNA adducts in chronic degenerative diseases. Pathogenic relevance and implications in preventive medicine. **Mutation Research**, v.366, p.197-238 (1996).

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v.402, p.151-158 (1998).

DE MARINI, D.M. Dietary interventions of human carcinogenesis. **Mutation Research**, v.400, p. 457-465 (1998).

acaroteno contra a ação genotóxica da doxorubicina, em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora UNESP (1996) 230p.

DOROSHOW, J.H. Role of hydrogen peroxide and hidroxil radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.83, p.4514-4518 (1986).

DOURADO, E.R., DOCA, K.N.P., ARAUJO, T.C.C. Comercialização de plantas medicinais por raizeiros na cidade de Anápolis ó GO. **Revista Eletrônica de Farmacia**, v.2, p.67-69 (2005).

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multi Ciência: Construindo a historia dos Produtos Naturais**, v.7, p.1-16 (2006).

EDENHARDER, R., VAN PETERSDORF, I., RAUSHER, V. Antimutagenic effects of flavonoids chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazol (4,5-f)quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. **Mutation Research**, v.287, p.361-274 (1993).

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal medicines. **Journal Ethnopharmacology**, v.75, p.141-164 (2001).

ENGELKE, F. Fitoterápicos e Legislação. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 1, p. 10-15 (2003).

ERDTMANN, B.A. genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, p.21-48 (2003).

ERICKSON, L. Rooibos tea: research into antioxidant and antimutagenic properties, **HerbalGram**, v.59, p.34645 (2003).

FONSECA, C.A., PEREIRA, D.G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v.16, p.7-8 (2004).

FENECH, M., BAGHURST, P., LUDERER, W., TURNER, J., RECORD, S., CEPPI, M., BONASSI, S. Low intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability ó results from dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. **Carcinogenesis**, v.26, p.991-999 (2005).

FREDERICH, M., HAYETTE, M.P., TITS, M., DE MOL, P., ANGENOT, L. In vitro activities of *Strychnos* alkaloids and extracts against *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.43, p.2328-2331 (1999).

FORSTER, R., ROWLAND, I.R., CALLANDER, R.D.
Bacterial mutation assays. In: Kirkland, D.J. **Basic mutagenicity tests: UKEMS recommended procedures**. New York: Cambridge University Press, p. 13-61 (1990).

GAZZANEO L.R.S., LUCENA R.F.P., ALBUQUERQUE U.P. Knowledge and use of Medicinal plants by local specialists in region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **Journal Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.1, p.1-11 (2005).

GEBHART, E. Anticlastogenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v.267, p.211-220, 1992.

GOLD, L.S., SLONE, T.H., AMES, B.N. Prioritization of possible carcinogenic hazards in food. In: TENNANT, D.R. **Food chemical risk analysis**. London: Blackie Academic and Professional, p.267-295 (1997).

GONCHAROVA, R.I. Antimutagenesis as a genetic process. **Vesti Rossiyskov Akademii Nauk**, v.1, p.26-33 (1993).

GRAF, U., ABRAHAM, S.K., GUZMÁN-RINCÓN, J., WÜRGLER, F.E. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.402, p.203-209 (1998).

GRAF, U. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Experientia**, v.51, p.168-173 (1995).

GRAF, U., FREI, H., KÄGI, A., KATZ, A.J., WÜGLER F.E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v. 222, p.359-373 (1989).

GRAF, U., SINGER D. Genotoxicity testing of promutagens in the wing Somatic Mutation and Recombination Test In *Drosophila melanogaster*. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v.8, p.15-27 (1992).

GRAF, U., SPANÓ, M.A., GUZMÁN-RINCÓN, J., ABRAHAM, S.K., ANDRADE, H.H.R. The wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. **African newslett on occupational Health and Safety**, v.6, p.9-13 (1996).

GRAF, U., VAN SCHAİK, N. Improved high of promutagens en the wing somatic mutation and recombination test in *D. melanogaster*. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v.8, p.15-27 (1992).

GRAF, U., WURGLER, F.E., KATZ, A.J., FREI, H., JUON, H., HALL, C.B., KALE, P.G. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagen**, v.6, p.347-377 (1984).

GUARIM NETO, G., DE MORAIS, R.G. Recursos Medicinais de espécies do Cerrado de Mato-Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v.17, p.561-584 (2003).

U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: BUTTERWORTH, F.M. **Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental changes**. New York: Plenum, p. 169-181 (1995).

HALLSTROM, I., BLANCK, A. Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. Chromosomal determination of some cytochrome P-450 dependent reactions. **Chemico-Biological Interactions**, v.56, p.157-171 (1985).

HAMBURGER, M., HOSTETTMANN, K. Bioactivity in Plants: The Link Between Phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v.30, p.3864-3874 (1991).

HANSEN, E.S. Shared risk factors for cancer and atherosclerosis: a review of the epidemiological evidence. **Mutation Research**, v.239, p.163-179 (1990).

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

HARD, G.C. Mechanisms of chemically induced renal carcinogenesis in the laboratory rodent. **Toxicologic Pathology**, v.26, p.104-112 (1998).

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

HAYASHI, M., MACGREGOR, J.T., GATEHOUSE, D., ADLER, I.D., BLACKKEY, D.H., DERTINGER, S., GOPALA, K., TAKESHI, M., RUSSO, A. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. Some aspect of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.234-252 (2000).

HAYASHI, M., SOFUNI, T., ISHIDATE, M.J.R. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. **Mutation Research**, v.120, p.241-247 (1983).

HAYASHI, M., TICE, R.R., MACGREGOR, J.T., ANDERSON, D., BLAKEY, D.H., KIRSCH-VOLDERS, M., OLESON JÚNIOR, F.B., PACCHIEROTTI, F., ROMAGNA, F., SHIMADA, H., SUTOU, S., VANNIER, B. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, v.312, p.293-304 (1994).

HEDDLE, J.A. A rapid in vitro test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v.18, p.187-190 (1973).

HEDDLE, J. A., SALAMONE, M. F. The micronucleus assay *in vivo*. In: STICH, H., SAN, R.H.C. **Proceedings of the international workshop on short-term tests for chemical carcinogens**. New York: Springer-Verlag, p.243-249 (1981).

HU, D., SIREB, B.S., TONG, D.C., ROYACK, G.A., ODA, D. Effect of brief exposure to mitomycin C on cultured human nasal mucosa fibroblasts. **Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery**, v.16, p.119-25 (2000).

IARRIS, C.C. Tumor suppressor genes: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and human risk assessment. **Lung Cancer**, v.34, p.7-15 (2001).

IMAI, T., INOUE, S., MATSUSHITA, N.O.Y., SUZUKI, R., SAKURAI, M., JESUS, J.M.H., OZAKI, S.K., FINGER, Z., FUKUSHIMA, K. Heartwood extractives from the Amazonian trees *Dipteryx odorata*, *Hymenaea courbaril*, and *Astronium lecontei* and their antioxidant activities. **Journal of Wood Science**, v.54, p.470-475 (2008).

IMAMURA, P.M., MIRANDA, P.C.M.L., GIACOMINI, R.A. A complete ^1H and ^{13}C NMR data assignment for the diterpene methyl (-)-Zanzibarate by 2D spectroscopy and NOE experiments. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.42, p.561-563 (2004).

IMANISHI, H., SASAKI, Y.F., OHTA, T., WATANABE, M., KATE, T., SHIRASU, Y., Tea tannin components modify the induction of sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations in mutagen-treated cultured mammalian cells and mice. **Mutation Research**, v.259, p.79-87 (1991).

JAYAPRAKASAN, B., LINDO, R.L.A., WITT, D.L., NAIR, M.G. Terpenoids from stinking toe (*Hymenaea courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitor activities. **Food Chemistry**, v.105, p.485-490 (2007).

JUNIOR, V.F.V., PINTO, A.C., MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química nova**, v.28, p.519-528 (2005).

KAI, M., WANG, T.S. Checkpoint responses to replication stalling: inducing tolerance and preventing mutagenesis. **Mutation Research**, v.532, p.59-73 (2003).

KAREKAR, V., JOSHI, S., SHINDE, S.L. Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v.468, p.183-194 (2000).

KAYA, B., CREUS, A., VELÁSQUEZ, A., YANIKOGLU, A., MARCOS, R. Genotoxicity is modulated by ascorbic acid studies the wing spot test in *Drosophila*. **Mutation Research**, v.520, p.93-101 (2002).

KIM, D.N., MEHTA, R., YU, W., NEEMAN, I., LIVENEY, T., AMICHAY, A., POIRIER, D., NICHOLLS, P., KIRBY, A., JIANG, W., MANSEL, R., RAMACHANDRAN, C., RABI, T., KAPLAN, B., LANSKY, E. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.71, p.203-217 (2002).

KIMURA, M., UMEGAKI, K., HIGUCHI, M., THOMAS, P., FENECH, M. Methylene tetrahydrofolate reductase C6&T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. **Journal of Nutrition**, v.134, p.48-56 (2004).

KIRSCH-VOLDERS, M., VANHAUWAERT, A., DE BOECK, M., DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutation Research**, v.504, p.137-148 (2002).

in food: identification and potential uses. **Canadian Journal of the Physiology and Pharmacology**, v. 72, p.23-434 (1994).

KRAUT, A., DRNOVSEK-OLUP, B. Instillation of mytomicin C after recurrent pterygium surgery. **European Journal of Ophthalmology**, v.6, p.264-7 (1996).

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

KRISHNA, G., HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v.455, p.155-166 (2000).

KUMAR, S., LIPMAN, R., TOMASZ, M. Recognition of specific DNA sequences by mitomycin C for alkylation. **Biochemistry**, v.31, p.139961407 (1992).

KURODA, Y., JAIN, A.K., TEZUKA, H., KADA, T. Antimutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v.267, p.201-209 (1992).

LEHMANN, M., FRANCO, A., DE SOUZA PRUDENTE VILAR, K., REGULY, M.L., DE ANDRADE, H.H. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.539, p.1676175 (2003).

LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed (2001).

LIMA, A.F., AZEVEDO, K.S., CAMPO, C.A., TAVEIRA, U., ROCHA, A.A. Manejo da seiva do jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por famílias tradicionais na reserva extrativista Chico Mendes, Acre óBrasil. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil** (2007).

LINDSLEY, D.L., ZIMM, G.G. **The Genome of *Drosophila melanogaster***. New York: Academic Press, p. 1133 (1992).

LIU, J.S., KUO, S.R., MELENDY, T. Comparison of checkpoint responses triggered by DNA polymerase inhibition versus DNA damaging agents. **Mutation Research**, v.532, p.215-226 (2003).

LOCATELLI, K.M.M. **Detecção da genotoxicidade dos corantes artificiais Amarelo Tartazina e Vermelho 40 pelo teste SMART de asa, em *Drosophila melanogaster***. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

LOHMANN, P.H.M., GENTILE, J.M., GENTILE, G., FERGUSON, L.R. Antimutagenesis/anticarcinogenesis: screening, methods and biomarkers. **Mutation Research**, v.496, p.1-4 (2001).

LORENZI, H. **Árvores brasileiras, manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. São Paulo: Editora Plantarum, 1998.

**manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas
nativas do Brasil.** São Paulo: Editora Plantarum, 1992.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil.** São Paulo: Editora Plantarum, 2002.

LUNA J., SANTOS, A.F., LIMA, M.R., OMENA, M.C., MENDONÇA, F.A., BIEBER, L.W., SANTANA, A.E. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal Ethnopharmacology**, v.97, p.199-206 (2005).

McCARTHY, J.F., SHUGART, L.R. **Biomarkers of environmental contamination.** Boca Raton: Lewis publications, 1990.

MACGREGOR, J.T. Dietary factors affecting spontaneous chromosomal damage in man. **Progress in Clinical e Biological Research**, v.347, p.139-153 (2005).

MACGREGOR, J.T., HEDDLE, A., MARGOLIN, B.H., RAMEL, C., SALAMONE, M. F., TICE, R.R., WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone erythrocytes. **Mutation Research**, v.189, p.103-112 (1987).

MAHABIR P. **Plantas Medicinales Iberoamericanas.** Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciência y Tecnología para el Desarrollo- CYTED, p. 359-361 (1995).

MALUF, S.W., ERDTMANN, B. Biomonitorização do dano genético em humanos. **Genética Toxicológica.** Porto Alegre: Editora Alcance, p. 183-205 (2003).

MARNETT, L.J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v.21, p.361-320 (2000).

MARQUES, M.C.S., CARDOSO, M.G., SOUZA, P.E., GAVILANES, M.L., SOUZA, J.A., PEREIRA, N.E., NEGRAO, I.O. Efeito fungitóxico dos extratos *Caryocar brasiliense* Camb. Sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. **Ciência Agrotecnologia**, v.26, p.1410-1419 (2002).

MARTINS, E. R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C., DIAS, J.E. **Plantas medicinais.** Viçosa: UFV, 2000. 220p.

MATUDA, T.G., NETTO, F.M. Caracterização química parcial da semente de jatobá-do-Cerrado (*Hymenaea stignocarpa* Mart). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.353-357 (2005).

MCGUINNESS, B.F., R. LIPMAN, R., GOLDSTEIN, J., NAKANISHI, K., TOMASZ, M. Reductive alkylation of DNA by mitomycin A, a mitomycin with high redox potential. **Biochemistry**, v.30, p.644466453 (1991).

MELO, J.G., MARTINS, J.D.G.R., AMORIM, E.L.C., ALBUQUERQUE, U.P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializadas no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.)Urban). **Acta botânica brasílica**, v. 21, p.27-36 (2007).

S., MENDES, A.M.S. Análise morfológica das sementes, germinação e plântulas de jatoba (*Hymenaea intermédia* DUCKE var. *adenotricha* (DUCKE) Lee e Zang) (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Acta Amazônica**, v. 34, p.9-14 (2004).

MELO, S.F., SOARES, S.F., COSTA, R.F., SILVA, C.R., OLIVEIRA, M.B.N., BEZERRA, R.J.A., DE ARAÚJO, A.C., BERNARDO-FILHO, M. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v.496, p.33-38 (2001).

MERCK, A.N. **Encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. New Jersey: Whitehouse Station, 12^a edição (1996). 2198p.

MICROMEDEX Health care Series, DrugDex Drug Evaluation. Disponível em: <http://www.micromedex.com>. [Acesso em: 20/12/2011].

MINOTTI, G., MENNA, P., SALVATORELLI, E., CAIRO, G., GIANNI, L., Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v. 56, p. 185-229 (2004).

MITSCHER, L.A., TELIKEPALLI, H., WANG, P.B.B., KUO, S., SHANKEL, D.M., STEWART, G. Antimutagenicity of secondary metabolites from higher plants. **Mutation Research**, v.267, p.229-241 (1992).

MIYAKE, M., IDE, K., SASAKI, K., MATSUKURA, Y., SHIJIMA, K., FUJIWARA, D. Oral administration of highly oligomeric procyanidins of Jatoba reduces the severity of collagen induced arthritis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.72, p.1781-1788 (2008).

MOLYNEUX, R.J., LEE, S.T., GARDNER, D.R., PANTER, K.E., JAMES, L.F. Phytochemicals: the good, the bad and the ugly? **Phytochemistry**, v.68, p.2973-2985 (2007).

MORAIS, I.C., Silva L.D.G., Ferreira, H.D., PAULA, J.R., TRESVENZOL, L.M.F. Levantamento sobre plantas medicinais comercializadas em Goiânia. **Revista Eletrônica de Farmacia**, v.2, p.13-16 (2005).

MOUSTACCHI, E. DNA-damage and repair: consequences on dose-responses. **Mutation Research**, v.464, p.35-40, 2000.

NAKANO, T., DJERASSI, C. Terpenoids. XLVI. Copalic Acid. **Journal of Organic Chemistry**, v.26, p.167-173 (1961).

NAWROT, P., JORDAN, S., EASTWOOD, J., ROTSTEIN, J., HUGENHOTTZ, A. FEELEY, M. Effects of caffeine on human health. **Food Additives and Contaminants**, v.20, p.1630 (2003).

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

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

J., LAVERDE, J.R.A., MARSAIOLI A.J., IAMAMURA F.M. Cierodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v.58, p.1153-1157 (2001).

ODIN, A.P. Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. **Mutation Research**, v.386, p.39-67 (1997).

OHE, T., MURUTANI, K., NAKASE, S. Catechins are not major components responsible for anti-genotoxic effects of tea extracts against nitroarenes. **Mutation Research**, v.496, p.75-81 (2001),

OLINSK, R., GACKOUSK, D., FOKSINKI, M., ROZALSKI, K., JARUGA, P. Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. **Free radical Biology and Medicine**, v.33, p.192-200 (2002).

OLIVEIRA, D.M. Morfologia comparada de plântulas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de *Phaseoleae*, *Sophoreae*, *Swartzieae* e *Tephrosea*. **Revista Brasileira de Botânica**, v.24, p.85-87 (2001).

OLIVEIRA, R.B., ALVES, R.J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, p. 976-984 (2002).

OMAIRA, A., GLADYS, L.P., MARTIZA, M., OMAIRA, G. LILIAN, S. Structural features of a xylogalactan isolated from *Hymenaea courbaril* gum. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.1302-1309 (2007).

PAVAN-FRUEHAUF, S. **Plantas medicinais de mata atlântica: manejo sustentado e amostragem**. São Paulo: Editora Annablume (2000). 215p.

PEREIRA, A.C., CASTRO, D.L. Prospecção fitoquímica e potencial citotóxico de *Unxia kubitzkii* H. Rob. (Asteraceae-Heliantheae). **Revista Brasileira de Biociência**, v.5, p.231- 233 (2007).

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v.56, p.237-243 (2001).

PRESTON, R.J., DEAN, B.J., GALLOWAY, S., HOLDEN, H., MCFEE, A.F., SHELBY, M. Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. **Mutation Research**, v.189, p.157-165 (1987).

PUNTUREE, K., WILD, C.P., VINITKETHUMNEUN, U. Thai medicinal plants modulate nitric oxide and tumor necrosis factor- in J774.2 mouse macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p.183-189 (2004).

RABELO-GAY, M.N. **Teste do Micronúcleo em medula óssea**. In: RABELO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A.L.R., MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Editora FCA (1991). 246 p.

J., P.V., RAGO, C., VELCULESCU, V.E., KINZLER, K.W., VOGELSTEIN, B., LENGAUER, C. Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. **Nature**, v.428, p.77-81 (2004).

RAMPAZO, L.G.L., JORDÃO, B.Q., VICENTINI, V.E.P., MANTOVANI, M.S. *Chlorophyllin antimutagenesis* mechanisms under different treatment conditions in the micronucleus assay in V79 cells. **Cytologia**, v.67, p.323-327 (2002).

REN, H., ENDO, H., HAYASHI, T. The superiority of organically cultivated vegetables to general ones regarding antimutagenic activities. **Mutation Research**, v.496, p.83-88 (2001).

REZENDE, F.A., TOMAZELLA, I.M., BARBOSA, L.C., PONCE, M., FURTADO, R.A., PEREIRA, A.C., BASTOS, J.K., ANDRADE, E.S.M.L., TAVARES, D.C. Effect of the dibenzylbutyrolactone lignan (-)-hinokinin on doxorubicin and methyl methanesulfonate clastogenicity in V79 Chinese hamster lung fibroblasts. **Mutation Research**, v.700, p.62666 (2011).

RIBEIRO, F.A.Q., BORGES, J.P., ZACCHI, F.F.S., GUARALDO, L. O comportamento clínico e histológico da pele do rato submetida ao uso tópico e injetável de Mitomicina C. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.69, p.151-8 (2003).

RIBEIRO, L.R., MARQUES, E.K., A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K., **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora ULBRA, p.21 - 27 (2003).

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Editora ULBRA, p.173-200 (2003).

RIGO, M.P. **Estudo da atividade bioantimutagênica do licopeno em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada. Canoas: Universidade Luterana do Brasil, 2009.

RODRIGUES, F.C.M.P., LOPES, B.M. Potencial Alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, v.8, p.130-136 (2001).

ROSÁRIO, M.M.T., NOLETO, G.R., BENTO, J.F., REICHER, F., OLIVEIRA, M.B.M., PETKOWICZ, C.L.O. Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages. **Phytochemistry**, v. 69, p. 464-472 (2008).

ROSS, C.A., MARGOLIS, R.L. Neurogenetics: insights into degenerative diseases and approaches to chizophrenia. **Clinical Neuroscience Research**, v.5, p.3-14 (2005).

RUIZ, A.L.T.G., MAGALHÃES, E.G., MAGALHÃES, A.F., FARIA, A.D., AMARAL, M.C.E., SERRANO, D.R., ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M., MAGALHÃES, L.A. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.98-102 (2005).

B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 029-055 (1998).

SALVADORI, D.M.F., RIBEIRO, L.R., FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, p.201-219 (2003).

SANTOS, I.R. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade do Rio Grande do Sul, 5ª edição (2004). 404p.

SATORELLI, L., MANTOVANI, G., CIMAN, M. Carnitine and deoxycarnitine concentration in rat tissues and urine after their administration. **Biochimica of Biophysica Acta**, v.1006, p.15-18 (1989).

SCHIMITZ, W., SAITO, A.Y., ESTEVÃO, D., SARIDAKIS, H.O. Green tea as a chemoprotector. **Seminário de Ciências Biológicas e da Saúde**, v.23, p.119-130 (2001).

SCHOLZOVA, E., MALÍK, R., SEVCIK, J., KLEIBL, Z. RNA regulation and cancer development. **Cancer Letter**, p.1-12 (2006).

SHAHIRIM, Z., BAHARUDDIN, P.J.N.M., YAHYA, A., MUHAMMAD, H., BAKAR, R. A., ISMAIL, Z. The *in vivo* rodent micronucleus assay of kaci Fatimah (*Labisia pumila*) extract. **Trop Biomed**, v.23, p.214-219 (2006).

SHANLEY P, MEDINA G. **Arvores frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. Belém: CIFOR, 2005.

SILVA, C.R. **Avaliação das Atividades Genotóxica e Antigenotóxica de *Duguetia furfuracea* em Bactérias e Camundongos**. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Biologia. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2008.

SILVA, M.J. **Parque das Emas: Última pátria do Cerrado (bioma ameaçado)**. Goiânia: Editora Kelps (2005). 294 p.

SILVA, M.R., SILVA, M.S., MARTINS, K.A., BORGES, S. Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e de jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, p.176-182 (2001).

SILVEIRA, J.C. **Avaliação dos efeitos imunomoduladores e citotóxicos de polissacarídeos de *Chorisia speciosa* e *Hymenaea courbaril***. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Ciência-Bioquímica. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2010.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade do Rio Grande do Sul, 5ª edição (2004). 404p.

SIXEL P.J., Pecinalli, N.R. Seleção de plantas para pesquisa farmacológica. **Infarma**, v.15, p.70-73 (2002).

A **Ciência da Genética, Fundamentos de Genética**. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, p.3-19 (2001).

SOUSA, N.C. **Efeitos moduladores da *Annona muricata* e da *tabebuia impetiginosa* sobre a genotoxicidade da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

SOUSA, N.C., REZENDE, A.A.A., SILVA, R.M.G., GUTERRES, Z.R., GRAF, U., KERR, W.E., SPANÓ, M.A. Modulatory effects of *Tabebuia impetiginosa* (Lamiales, Bignoniaceae) on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, p.3826388 (2009).

SOUZA, A.C.M. **Potencial antifúngico de extratos de *Hymenaea martiana***. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Goiânia: Universidade federal de Goiás, 2008.

STREAM, S.A., VANLLEUWEN, R.N. Use of mitomycin-C for maintaining myringotomy patency. **Otolaryngology Head and Neck Surgery**, v.122, p.8-10 (2000).

SUGIMURA, T. Cancer prevention: past, present, future. **Mutation Research**, v.402, p.70-74 (1998).

SUTCLIFFE, J.E., BREHM, A. Of flies and men; p53, a tumour suppressor. **FEBS Lett**, v.567, p.86-91 (2004).

SUZUKI, D.T., GRIFFITHS, A.J.F., MILLER, J.H., LEWONTIN, R.C. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4ª edição, (1992). 633p.

SUZUKI, R., MATSUSHITA, Y., IMAI, T., SAKURAI, M., JESUS, J. M. H., OZAKI, S. K., FINGER, Z., KO FUKUSHIMA, K. Characterization and antioxidant activity of Amazonian woods. **Journal of Wood Science**, v.54, p.1746178 (2007).

TAKAHASHI, E., MARCZYLO, T.H., WATANABE, T., NAGAI, S., HAYATSU, H., NEGISHI, T. Preventive effects of anthraquinone food pigments on the DNA damage induced by carcinogens in *Drosophila*. **Mutation Research**, v.480, p.139-145 (2001).

TAKAGI, K., ITHO, S., NASU, S., YAMADA, S., NOMURA, S., SHIMOMURA, K., OHNISHI, K. Anti-inflammatory effect and pigmentation inhibitory of the pericarp of jatobá (*Hymenaea courbaril* L.). **Mikimoto Pharmaceutical Co**, p.516-8581 (2002).

TALLAJ, J.A., FRANCO, V., RAYBURN, B.K., PINDERSKI, L., BENZA, R.L., PAAMBOUKIAN, S., FOLEY, B., BOURGE, R.C. Response of doxorubicin-induced cardiomyopathy to the current management strategy of heart failure. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v.24, p.2196-201 (2005).

TAMAYO, L.M.A., GONZÁLEZ, D.M.A., GARCÉS, Y.J. Propiedades farmacológicas del Algarrobo (*Hymenaea courbaril* Linneaus) de interés para la industria de alimentos. **Revista Lasallista de Investigación**, v.5, p.359-361 (2008).

GISHI, T., HAYATSU, H. Inhibition of N-nitrosation of secondary amines *in vitro* by tea extracts and Catechins. **Mutation Research**, v. 412, p.91-98 (1998).

TICKOO, S., RUSSELL, S.S. *Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery and pathway screening. **Current Opinion in Pharmacology**, v.2, p.555-560 (2002).

TUROLLA, M.S., NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, p.289-306 (2006).

UMBUZEIRO, G.A., VARGAS, V.M.F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Editora ULBRA (2003). 356p.

UMEGAKI, K., FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. **Mutagenesis**, v.15, p.261-269 (2000).

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

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**, v.27, p.1-7 (2006).

VERCHAEVE, L., KEATENS, V., TAYLOR, J.L.S., ELGORASHI, E.E., MAES, A., VAN PUYVELDE, L., KIMPE, N., VAN STANDEN, J. Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. **Toxicology In Vitro**, v.18, p.29-35 (2004).

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

VERPOORTE, R. Medicinal plants of Surinam. IV. Antimicrobial activity of some medicinal plants. **Journal Ethnopharmacology**, v.21, p.315-18 (1987).

VIEIRA, L.S. **Manual da medicina popular- A fitoterapia na Amazônia**. Belém: FCAP, 1991.

VILA VERDE, G.M., PAULA, J.R., CARNEIRO, D.M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossamedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p.64-66 (2003).

VOGEL, E.W., GRAF, U., FREI, H.J., NIVERD, M.M.J. The results of assay in *Drosophila* of exposure to carcinogens. **International for research on Cancer**, v.146, p.427-470 (1999).

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

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

LIUAN, L., WAGATSUMA, C., TOSHIDA, M., MIURA, T., MUKODA, T., FUJII, H., SUN, B., KIM, J. H. & SURH, Y. J. Inhibition of human breast cancer growth by GCP (genistein combined polysaccharide) in xenogeneic athymic mice: involvement of genistein biotransformation by beta-glucuronidase from tumor tissues. **Mutation Research**, v.5236524, p.55662 (2003).

WARGOVICH, M.J. Experimental evidence for cancer preventive elements in foods. **Cancer Letters**, v.114, p. 11-17 (1997).

WITTE, I., PLAPPERT, U., WALL, H., HARTMANN, A. 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, p.21-26 (2007).

ZAHA, A. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, p.336 (1996).

ZAN, M.A. **Avaliação da genotoxicidade induzida pelo extrato aquoso de alcachofra (*Cynara scolymus*) em camundongos**. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia aplicada. Canoas: Universidade Luterana do Brasil, 2008.

ZEIGER, E. Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: premises, promises, and performance. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 28, p. 85-95 (1998).



Capítulo I

Avaliação da Atividade Citotóxica, Genotóxica e Antigenotóxica de *Hymenaea courbaril* L. em Medula Óssea de Camundongos

CAMILA REGINA DO VALE

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral
Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese

Avaliação da Atividade Citotóxica, Genotóxica e Antigenotóxica de *Hymenaea courbaril* L. em Medula Óssea de Camundongos

VALE, C.R¹., OLIVEIRA, C.M.A²., CHEN-CHEN, L¹.

¹Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese, ICB I, Campus II, Universidade Federal de Goiás, CEP: 74001-970, Goiânia-GO

²Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus II, 74001-97, Goiânia, Goiás, Brazil

RESUMO

Hymenaea courbaril L. (família Fabaceae), popularmente conhecida no Brasil como jatobá, é uma espécie tropical que ocorre na floresta semi-decídua da América do Sul. A espécie tem sido utilizada no Brasil para fins culinários e na medicina popular para tratar artrite, disfunção gástrica, inflamação e doenças respiratórias. Devido ao amplo uso dessa planta como um recurso terapêutico e alimentar, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e antigenotóxicos da seiva de *Hymenaea courbaril* (SHyc) usando o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongo. Para avaliar as atividades clastogênicas e/ou aneugênicas, os animais foram tratados com 3 concentrações de SHyc (5, 10 ou 15 mL/kg de peso corporal) e para avaliar a atividade anticlastogênica e/ou antianeugênica, os animais foram tratados simultaneamente com as mesmas doses de SHyc e mitomicina C (4mg/kg de peso corporal). A genotoxicidade foi avaliada pela frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) e a citotoxicidade foi analisada pela razão eritrócitos policromáticos e normocromáticos (EPC/ENC). Nossos resultados mostraram que SHyc não apresentou efeitos citotóxicos, clastogênicos e/ou aneugênicos em medula óssea de camundongos. Por outro lado, as atividades anticitotóxica, anticlastogênica e/ou antianeugênica foram evidenciadas em todas as doses utilizadas.

Palavras-chave: Jatobá, Fabaceae, antianeugênese, anticlastogênese.

ABSTRACT

Hymenaea courbaril L. (Family Fabaceae), popularly known in Brazil as jatobá, is a tropical species that occurs in semi-deciduous forest of the South America. The species has been used in Brazil for culinary purposes and in folk medicine to treat arthritis, gastric dysfunction, inflammation and respiratory diseases. Due to the spreading use of this plant as a therapeutic resource and food, the present study aimed to evaluate the citotoxic, genotoxic, and antigenotoxic effects of *Hymenaea courbaril* sap (Hycs) using the mouse bone marrow micronucleus test. To evaluate the clastogenic and/or aneugenic activities the animals were treated with 3 concentrations of Hycs (5, 10 and 15 mL/kg body weight) and to evaluate the anti-clastogenic and/or anti-aneugenic activities, the animals were simultaneously treated with the same doses of Hycs and mitomycin C (4mg/Kg body weight). The genotoxic action was evaluated by the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) and cytotoxicity was evaluated by the polychromatic and normochromatic erythrocytes ratio (PCE/NCE). Our results showed that Hycs did not exhibit cytotoxic, clastogenic and/or aneugenic effects in mice bone marrow test. On the other hand, anticytotoxic, anti-clastogenic and/or antianeugenic effects were evidenced in all doses tested.

Key words: Jatobá, Fabaceae, anti-aneugenic, anti-clastogenic.

Hymenaea courbaril L. (família Fabaceae) popularmente conhecida no Brasil como jatobá, é uma espécie tropical que ocorre na floresta semi-decídua da América do Sul. A espécie tem sido utilizada no Brasil para fins culinários e na medicina popular para tratar a artrite, disfunção gástrica, inflamação e doenças respiratórias (Silva *et al.*, 2001; Lorenzi; Matos, 2002). Plantas do gênero *Hymenaea* (família Fabaceae) são comumente usadas na medicina tradicional brasileira no tratamento de processos inflamatórios, infecções bacterianas, reumatismo e anemia (Gazzaneo *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2005; Agra *et al.*, 2007).

A análise fitoquímica de *H. courbaril* revelou a presença de compostos fenólicos (taninos, favonoides e procianidinas), óleos essenciais e terpenos na resina exsudada pelo tronco, nos extratos da casca, folhas, frutos e seiva. Os flavonóides possuem ação antioxidante, removem os radicais livres e exibem atividade antígeno-tóxica. Procianidinas possuem uma variedade de atividades, como por exemplo, antioxidante, antiinflamatória e de inibidora da tirosinase (Miyake *et al.*, 2008). No entanto, em altas concentrações pode ter efeitos genotóxicos (Martins *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2004; Aguiar, 2009).

O ensaio de micronúcleo descrito inicialmente por Heddle (1973) é utilizado para detectar a genotoxicidade de produtos químicos através da sua capacidade para induzir a formação de fragmentos de DNA resultantes de eventos clastogênicos (quebras cromossômicas) ou aneugênicos (não disjunção dos cromossomos) (Ouanes *et al.*, 2003). Avaliação da indução de micronúcleo é um dos principais testes *in vivo* em uma bateria de testes de genotoxicidade e é recomendado por agências reguladoras em todo o mundo como parte da avaliação da segurança de produtos (Krishna e Hayashi, 2000).

Devido à ampla utilização de *H. courbaril*, o objetivo do presente trabalho foi avaliar seus efeitos citotóxicos, genotóxicos e antígeno-tóxicos utilizando o teste de micronúcleo em camundongos (Heddle, 1973).

2.1. Material Botânico

A seiva da *H. courbaril* (SHyc) foi coletada em Pirenópolis, estado de Goiás, Brasil. Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás sob o número 22.972/UFG. A SHyc foi extraída através de incisões no tronco de *H. Courbaril*, sendo transferida para frascos de vidro e mantida a 5°C até o momento do uso.

2.2. Camundongos

O protocolo usado neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Goiás (CEP/UFG no. 183/2011). Este experimento seguiu todas as normas de manejo e experimentação animal preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados 80 camundongos *Mus musculus* (Swiss Webster) out bred, do sexo masculino, pesando entre 30 e 40g com idade variando de 7 a 12 semanas, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás. Antes da realização dos experimentos, os animais permaneceram por 7 dias no laboratório, mantidos em gaiolas de polipropileno com dimensão de 40x30x16 cm com 5 animais cada, forradas com maravalha trocada diariamente, e alimentados com ração comercial e água filtrada, ambos oferecidos "*ad libitum*". Os animais foram mantidos à temperatura de 25°C, umidade 50% ± 20% e um ciclo de luz 12h claro/12h escuro.

2.3. Reagentes Químicos e Soluções

2.3.1. Tampão Fosfato

Solução A (fosfato de sódio dibásico)	Solução B (Fosfato de sódio monobásico)
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O -----17,9g	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O-----34,5g
H ₂ O destilada -----100 mL	H ₂ O destilada-----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.

2.3.2. Corante

Composição	Quantidade
Solução Giemsa	9 mL
Solução tampão fosfato	100 mL
H ₂ O destilada	100 mL

Após preparação, filtrou-se a solução em papel filtro. Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso.

2.3.3. Fixador

Metanol (CH₄O).

2.3.4. Homogeneização das Células

Soro fetal bovino (FCS, lot. n° 30721063, Laborclin, Campinas, SP, Brasil).

Foram utilizados como controle positivo Mitomicina C (MMC-4 mg/kg, lot. n° 237AEL, Bristol, Mayers Squibb, São Paulo, SP, Brasil) e como controle negativo água destilada estéril.

2.4. Procedimento Experimental

Os experimentos foram realizados de acordo com Heddle (1973) e Schmid (1975). Para avaliação da genotoxicidade grupos de cinco animais foram tratados, via gavagem, com três diferentes concentrações da seiva de *H. courbaril* L (SHyc) (5, 10 ou 15 mL/kg de peso corporal) em dois diferentes tempos (24 e 48 horas). O grupo controle negativo foi tratado com água destilada esterilizada, enquanto o grupo controle positivo recebeu uma concentração padrão de MMC (4mg/Kg). Para avaliação da antigenotoxicidade, foram administradas simultaneamente, as mesmas concentrações da SHyc que foram utilizadas para o teste de genotoxicidade (5, 10 ou 15 mL/Kg de peso corporal, via gavagem), juntamente com a mesma concentração de MMC, usada no controle positivo (4mg/kg) via intraperitoneal (ip). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, tendo seus fêmures dissecados e retirados. As epífises do fêmur foram cortadas e a medula óssea lavada com 1 mL de soro fetal bovino. Após homogeneização da medula no soro, centrifugou-se 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 então transferida para a lâmina histológica, onde fez-se o esfregaço celular. Após secagem das lâminas, estas foram fixadas em metanol absoluto durante 5 minutos, coradas em solução de Giemsa tamponada com pH 6,8 por um período de 15 minutos (Heddle, 1973), lavadas em água corrente e secas em temperatura ambiente (Vieira *et al.*, 2010).

2.5. Análise Citogenética

A análise das lâminas foi realizada em microscopia óptica de luz, com a finalidade de se detectar possíveis alterações e/ou perdas cromossômicas (micronúcleos) nos eritrócitos da medula óssea dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. As células foram visualizadas utilizando objetiva de imersão (100x), avaliando-se 2000 eritrócitos policromáticos (EPC) por animal. Para avaliação da citotoxicidade, contou-se até 1000 EPC

uência de eritrócitos normocromáticos (ENC), a razão EPC/ENC foi então determinada conforme modelo proposto por Schmid (1975).

2.6. Análise Estatística

A avaliação de 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 de citotoxicidade as frequências de EPC/ENC de cada grupo foram comparadas pelo teste Qui-quadrado. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos pela análise da frequência de EPCMN e da relação EPC/ENC nos animais submetidos aos diferentes tratamentos com a SHyc e seus controles estão apresentados na **Tabela 1**.

Na avaliação do potencial genotóxico da SHyc expressa pela média das frequências de EPCMN (Tabela 1), observou-se que para os tratamentos de 24 horas, os animais apresentaram uma média de 2, 2,6 e 3,4 EPCMN/2000 EPC para as concentrações de 5, 10 e 15 mL/kg p.c., respectivamente, enquanto que o grupo controle negativo apresentou uma média de 3,2 EPCMN/2000 EPC (**Figura 1**). Dessa maneira, pôde-se observar que não houve diferença significativa para todas as doses testadas comparado com o grupo controle negativo ($p > 0,05$).

Nos resultados obtidos para os tratamentos de 48 horas com a SHyc, os animais apresentaram uma média de 2,8, 2,2 e 3,8 EPCMN/2000 EPC para as concentrações de 5, 10 e 15 mL/kg p.c., respectivamente, enquanto que o grupo controle negativo apresentou uma média de 3,2 EPCMN/2000 EPC (**Figura 2**). Assim, observou-se que também não houve diferença significativa para as diferentes doses da SHyc em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$). Dessa maneira, os resultados obtidos não demonstraram a ação genotóxica da SHyc.

A avaliação da atividade citotóxica da SHyc, é expressa pelas razões EPC/ENC dos animais tratados com as diferentes doses em relação ao grupo controle negativo (**Tabela 1**).

s tratamentos de 24 horas foram 1,25, 1,36 e 1,21 para os grupos tratados com 5, 10 e 15 mL/kg de SHyc, respectivamente, enquanto que o grupo controle negativo apresentou a razão de 1,2 (**Figura 3**). A razão de EPC/ENC dos grupos tratados foi comparada com a do grupo controle negativo pelo teste qui-quadrado e foi demonstrado que não houve diferença significativa entre esses grupos ($p>0,05$).

As razões de EPC/ENC obtidas nos tratamentos de 48 horas foram 1,23, 1,2 e 1,2 para os grupos tratados com 5, 10 e 15 mL/kg de SHyc, respectivamente, enquanto que o grupo controle negativo apresentou uma razão de 1,2 (**Figura 4**). Dessa maneira, a comparação das frequências de EPC/ENC dos grupos tratados em relação ao grupo controle negativo pelo teste qui-quadrado, também demonstrou que não houve diferença significativa entre esses grupos ($p>0,05$). Assim, foi demonstrada ausência de citotoxicidade da SHyc em todas as doses aplicadas nos tempos de 24 e 48 horas.

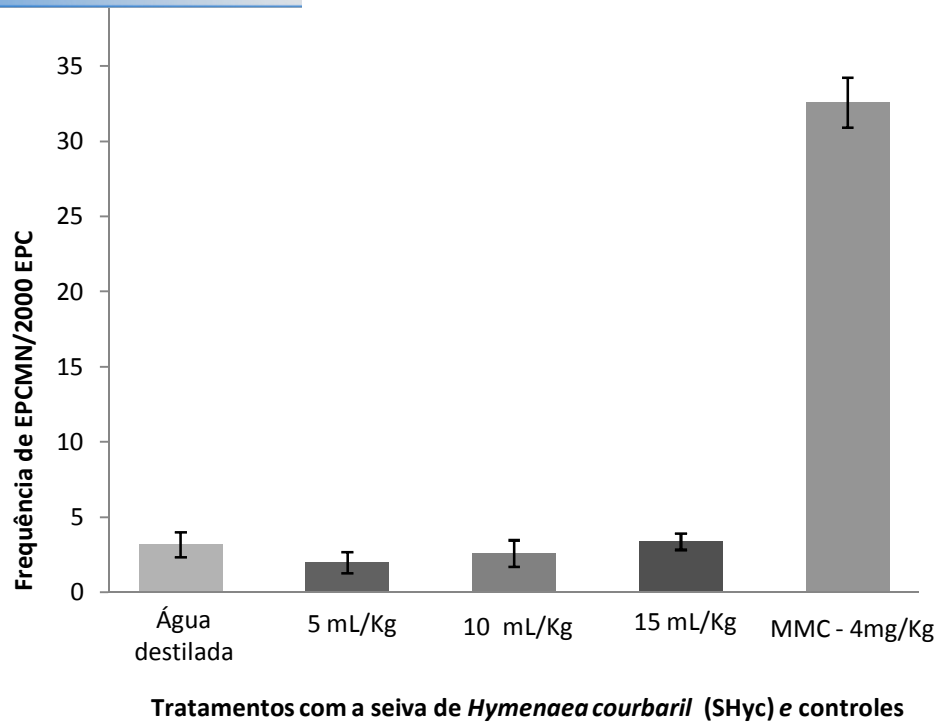


Figura 1. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) após 24 horas de tratamento com a seiva de *Hymenaea courbaril* (SHyc) e controles.

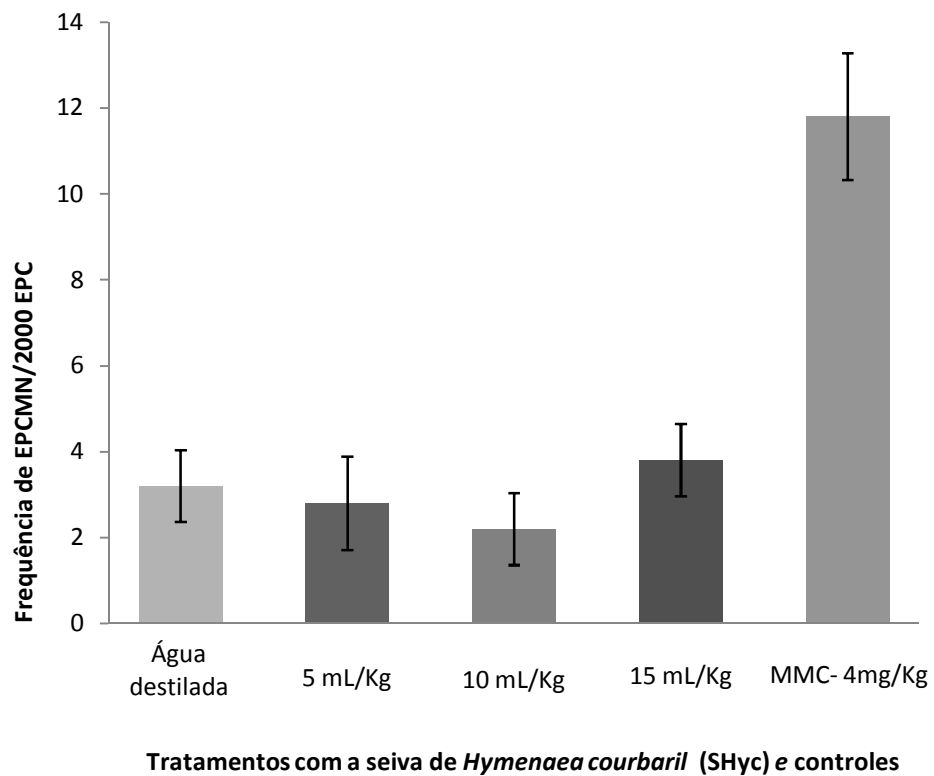


Figura 2. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) após 48 horas de tratamento com a seiva de *Hymenaea courbaril* (SHyc) e controles.

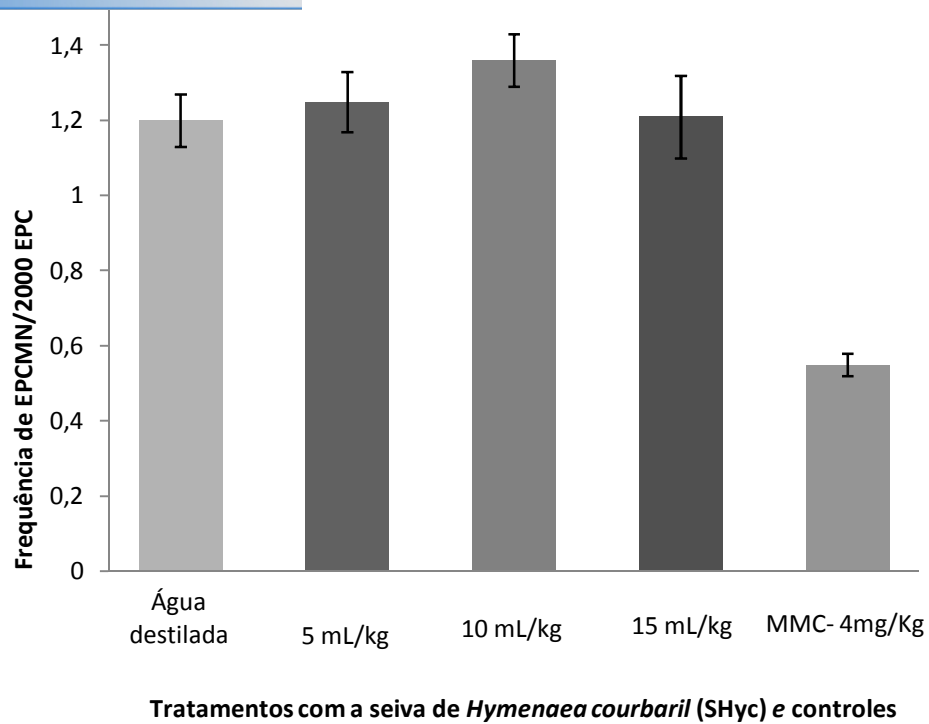


Figura 3. Razão de EPC/ENC após 24 horas de tratamento com a seiva de *Hymenaea courbaril* (SHyc) e controles.

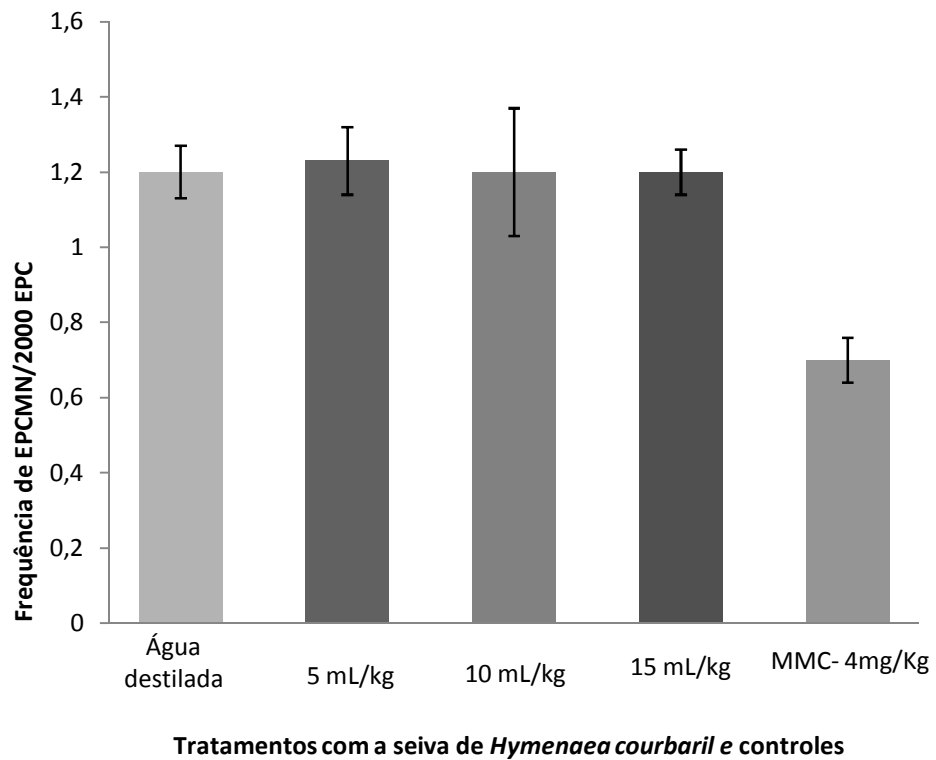


Figura 4. Razão de EPC/ENC após 48 horas de tratamento com a seiva de *Hymenaea courbaril* (SHyc) e controles.

Os resultados obtidos pela análise da frequência de EPCMN e da relação EPC/ENC nos animais submetidos aos diferentes tratamentos com a SHyc co-tratados com MMC e seus controles são apresentados na **Tabela 2**.

Na avaliação da atividade antígenotóxica da SHyc (Tabela 2), os resultados mostraram que para os tratamentos de 24 horas, os animais apresentaram uma média de 26,8, 16 e 12,8 EPCMN/2000 EPC nas concentrações 5, 10 e 15 mL/kg de SHyc co-tratados com 4 mg/kg de MMC, enquanto que o controle positivo apresentou uma média de 32,6 EPCMN/2000 EPC (**Figura 5**). Os dados obtidos mostraram que o tratamento simultâneo do extrato da planta com MMC provocou uma redução significativa do número de EPCMN em relação ao grupo controle positivo (MMC) ($p < 0,05$). Demonstrando uma redução de 17, 50 e 55%, respectivamente, para essas concentrações.

Já no tempo de 48 horas os animais tratados com as concentrações de 5, 10 e 15 mL/kg de SHyc co-tratadas com 4 mg/Kg de MMC apresentaram uma média de 6,6, 6,2 e 5,4 EPCMN/2000 EPC e o controle positivo apresentou uma média de 11,8 (**Figura 6**). Os resultados obtidos também mostraram que o tratamento simultâneo do extrato da planta com o controle positivo MMC reduziu significativamente a frequência de EPCMN em relação ao grupo controle positivo ($p < 0,05$). Demonstrando uma redução de 33, 35 e 43% respectivamente, para essas doses. Assim, a SHyc apresentou ação antígenotóxica para todas as concentrações testadas nos tempos de 24 e 48 horas.

A comparação das razões EPC/ENC dos animais co-tratados com a SHyc e MMC em relação ao grupo controle positivo possibilitou avaliar a anticitotoxicidade do extrato (**Tabela 2**). As razões encontradas nos tratamentos de 24 horas foram 0,54, 0,67 e 0,83 para os grupos tratados com 5, 10 e 15 mL/kg de SHyc simultaneamente com MMC, enquanto que o grupo controle positivo apresentou a razão de EPC/ENC de 0,55 (**Figura 7**). A comparação das frequências de EPC/ENC pelo teste qui-quadrado, mostrou que a SHyc apresentou ação anticitotóxica para as doses mais altas ($p < 0,05$). As razões de EPC/ENC obtidas nos tratamentos de 48 horas foram 0,92, 0,87 e 0,95 para os grupos tratados com 5, 10 e 15 mL/kg de SHyc simultaneamente com MMC, enquanto que o grupo controle positivo apresentou uma razão de EPC/ENC de 0,70 (**Figura 8**). A comparação de frequências de EPC/ENC também mostrou ação anticitotóxica da SHyc em todas as doses do tempo de 48 horas ($p < 0,05$).

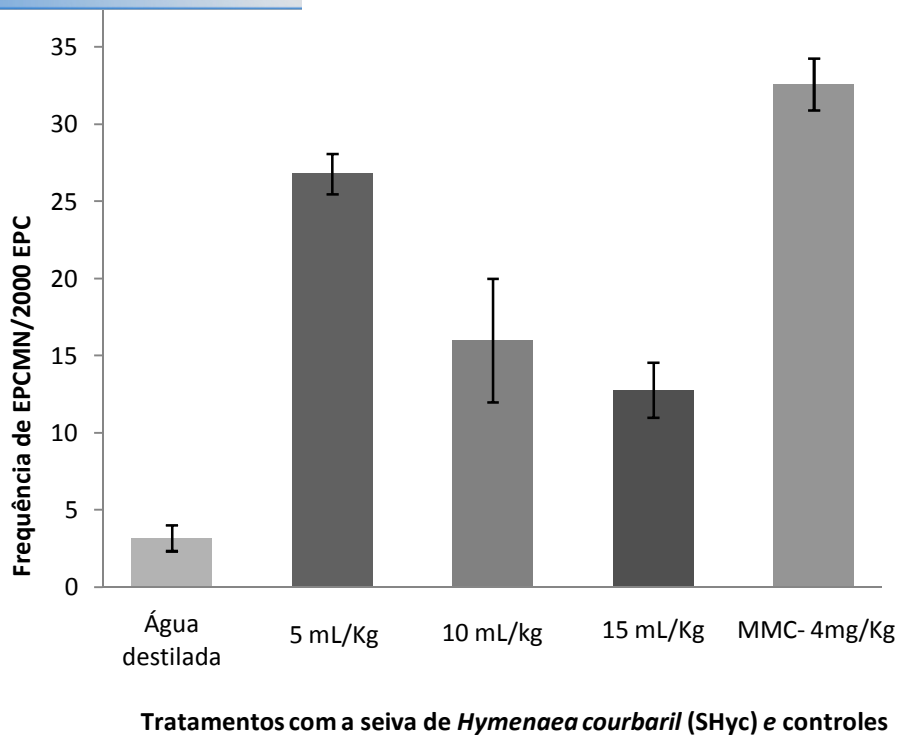


Figura 5. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) após 24 horas de tratamento com a seiva de *Hymenaea courbaril* (SHyc) concomitantemente com MMC e controles.

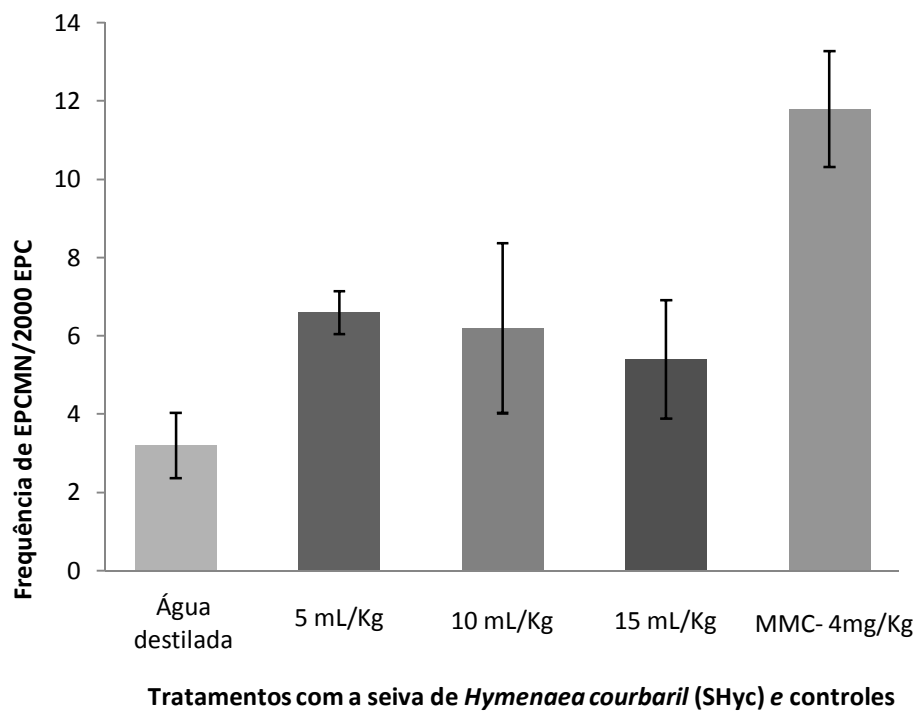


Figura 6. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) após 48 horas de tratamento com a seiva de *Hymenaea courbaril* (SHyc) concomitantemente com MMC e controles.

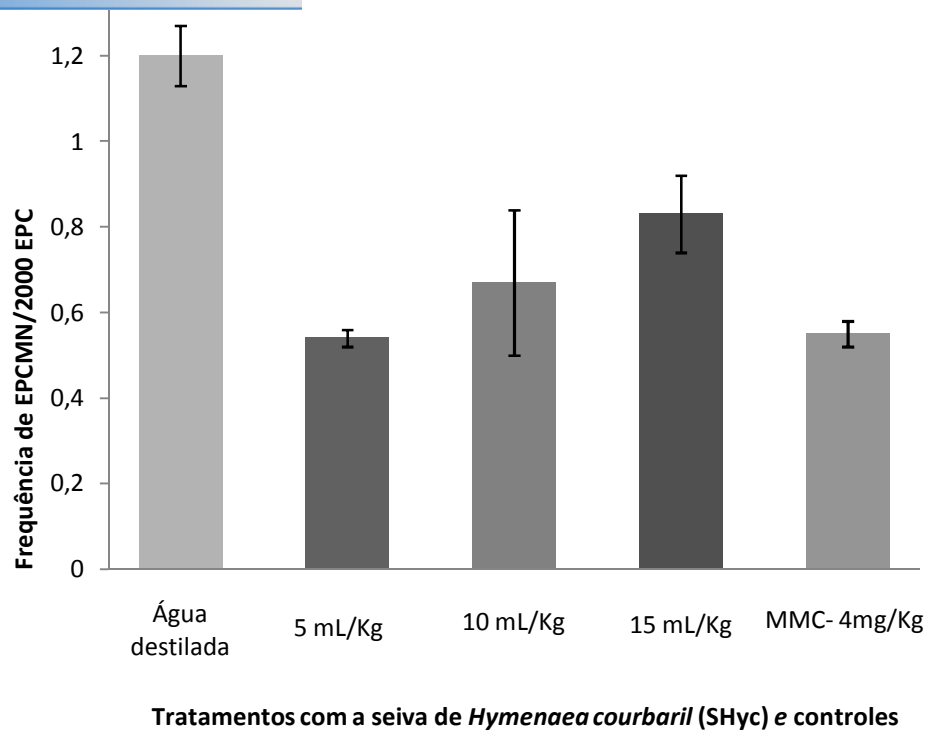


Figura 7. Razão de EPC/ENC após 24 horas de tratamento com a seiva de *Hymenaea courbaril* (SHyc) concomitantemente com MMC e controles.

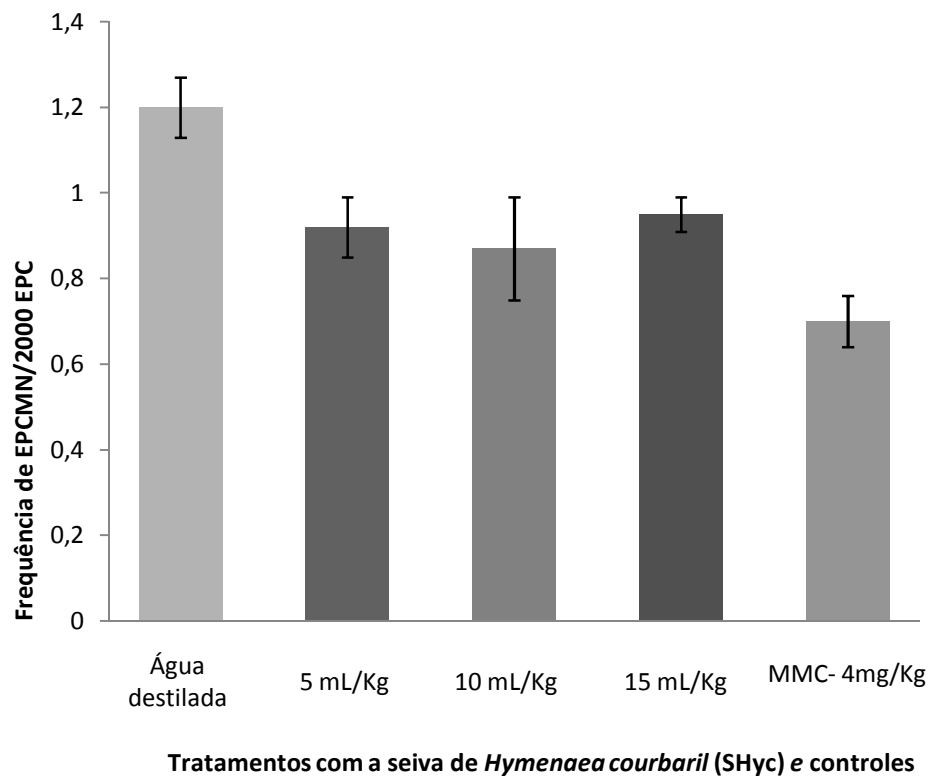


Figura 8. Razão de EPC/ENC após 48 horas de tratamento com a seiva de *Hymenaea courbaril* (SHyc) concomitantemente com MMC e controles.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as atividades citotóxicas, genotóxica e antigenotóxica da seiva de *H. courbaril* (SHyc) utilizando o teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos.

O Teste do micronúcleo em medula óssea de camundongo consiste de um ensaio de curto prazo amplamente utilizado para detectar os efeitos de substâncias genotóxicas (clastogênicas e/ou aneugênicas), antigenotóxica e citotóxicas *in vivo* (Hayashi *et al.*, 2000). Micronúcleo (MN) em eritrócitos jovens surgem principalmente a partir de fragmentos acêntricos ou cromossomos que são incapazes de migrar e acompanhar o fuso mitótico durante a divisão celular (Salamone e Heddle, 1983; Ouanes *et al.*, 2003). Um aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) vem sendo uma indicação de danos cromossômicos induzidos (Krishna e Hayashi, 2000).

Os resultados da avaliação da genotoxicidade de SHyc usando o teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos não mostraram um aumento significativo da frequência de EPCMN nos grupos tratados com as três diferentes concentrações de SHyc em comparação com o grupo controle negativo ($p > 0,05$). Estes resultados indicam que SHyc não exibiu efeitos genotóxicos (aneugênicos e/ou clastogênico) em eritrócitos policromáticos (EPC) de medula óssea de camundongos.

O teste do micronúcleo utilizado neste estudo também não detectou efeitos citotóxicos através da razão de EPC/ENC. Quando a proliferação normal das células da medula óssea é afetada por um agente tóxico, o número de eritrócitos imaturos (EPC) diminui em relação ao de eritrócitos maduros (ENC), levando a uma diminuição na razão EPC/ENC (Hayashi *et al.*, 2000). Os nossos resultados indicaram que não houve ação citotóxica da SHyc pela relação de EPC/ENC em todas as doses testadas em comparação com o grupo do controle negativo ($p > 0,05$).

Silveira (2010) avaliou a ação citotóxica de polissacarídeos da semente de *H. courbaril* sob a viabilidade celular de macrófagos da linhagem RAW 264.7 pelo método colorimétrico do MTT. O tratamento dessas células com *H. courbaril* levou a uma diminuição da viabilidade celular em 50% em uma concentração de 5 g/mL, alcançando 70% na maior concentração utilizada de 200 g/mL (Silveira, 2010). Dados similares foram obtidos em tratamentos de macrófagos peritoneais de camundongos com esse polissacarídeo da semente de *H. courbaril*, onde foi demonstrado atividade citotóxica em doses de 100 g/mL, diminuindo a taxa de sobrevivência das células em 30% (Rosário *et al.*, 2008).

células de carcinoma de cérvix uterino (HeLa) com 5, 10, 25, 100 ou 200 g/mL de extratos da semente de *H. courbaril* não demonstrou atividade citotóxica por meio do ensaio colorimétrico do MTT (Silveira, 2010). Esta diferença entre os resultados foi atribuída possivelmente às diferenças de comportamento entre linhagens de células e também à presença de diferentes componentes químicos em diferentes partes de *H. courbaril*.

Algumas plantas podem possuir substâncias que modulam a genotoxicidade de outros compostos (Siddique *et al.*, 2008). A atividade antigenotóxica de substâncias derivadas de plantas pode ser devido a uma variedade de mecanismos, tais como a inibição de efeitos genotóxicos, transdução de sinal, atividade antioxidante, eliminação de radicais livres, por diferentes mecanismos de reparo do DNA que removem ou reparam lesões (Hartman e Shankel, 1990; De Flora *et al.*, 1999; Mantle *et al.*, 2000).

No presente trabalho, SHyc revelou um efeito antigenotóxico contra danos cromossômicos induzidos pela MMC. O efeito antigenotóxico de SHyc observado em nosso estudo pode ser atribuído a sua ação de redução de alquilação e também à sua atividade antioxidante, uma vez que a ação genotóxica da MMC está relacionada à sua capacidade de alquilar o DNA e produzir radicais livres reativos que causam diferentes tipos de dano celular, incluindo quebras no DNA (Kang *et al.*, 2006; Sousa, 2008). Portanto, a ação da SHyc pode estar relacionada com a proteção de sítio nucleofílicos no DNA.

Essa capacidade antioxidante de *H. courbaril* foi demonstrada em estudos realizados por Aguiar (2009) por meio do método de detecção de radicais livres de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), foi observado que o extrato das folhas de *H. courbaril* em uma concentração de 0,04 mg/mL foi eficiente em capturar radicais livres, apresentando-se assim como um agente antioxidante (Aguiar, 2009). Considerando esse resultado, sugerimos que uma das vias para a resposta antigenotóxica de *H. courbaril* demonstrada no presente estudo seja a sua atividade antioxidante.

Os radicais livres gerados por produtos químicos exógenos (por exemplo MMC) ou metabólitos endógenos podem causar danos oxidativos por oxidação de biomoléculas e resultar na morte celular e danos nos tecidos (Kehrer, 1993). O potencial genotóxico é diretamente proporcional ao número de lesões oxidativas do DNA que escapam do mecanismo de reparo (Valko *et al.*, 2004). Os dados de numerosos experimentos sugerem que danos oxidativos no DNA são importantes no envelhecimento, assim como na etiologia de muitas doenças humanas, incluindo a arteriosclerose, doenças neurodegenerativas e até mesmo câncer (Marnett, 2000; Olinski *et al.*, 2002).

proteger o corpo humano contra os radicais livres e retardar o progresso de muitas doenças crônicas (Baydar *et al.*, 2007). Antioxidantes que eliminam os radicais livres, retardam o processo de envelhecimento e reduzem o risco de doenças degenerativas associadas à idade, tais como câncer, doenças cardiovasculares, declínio do sistema imunológico e disfunção cerebral (Finkel e Holbrook, 2000).

A análise fitoquímica de *H. courbaril* revelou a presença de compostos fenólicos (taninos, flavonóides e procianidinas), óleos essenciais e terpenos (Martins *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2001; Aguiar, 2009).

Vários estudos têm demonstrado que os compostos fenólicos apresentam diversas atividades biológicas (Aruoma, 2002; Araújo, 2008). Taninos exibem efeitos antígeno-tóxicos (Weisburger *et al.*, 1996; Mejía *et al.*, 1999). Os flavonóides podem remover espécies reativas de oxigênio (Manosroi *et al.*, 2006) e são inibidores de crescimento de células tumorais, indutores da apoptose e inativadores de cancerígenos (Duthie e Dobson, 1999; Yokozawa *et al.*, 1998). A atividade antioxidante de flavonóides pode inativar tanto a peroxidação lipídica como espécies reativas de oxigênio e tem um efeito indireto sobre sistemas antioxidantes endógenos *in vivo* (Yang *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2001). Os terpenos são um grupo de compostos químicos importantes presentes em plantas e têm sido demonstrado que possuem propriedades antioxidantes particularmente contra a peroxidação lipídica (Grassmann *et al.*, 2002).

Dessa maneira, a atividade antígeno-tóxica detectada no presente estudo pode ser mediada, pelo menos parcialmente, pela ação de flavonóides, taninos e/ou terpeno.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados obtidos indicaram que a seiva de *Hymenaea courbaril* não apresentou efeitos citotóxicos, clastogênicos e/ou aneugênicos nas condições experimentais utilizadas no presente estudo. No entanto, protegeu células contra os efeitos citotóxicos, clastogênicos e/ou aneugênicos da MMC em células de medula óssea de camundongos e seu efeito foi diretamente proporcional as doses utilizadas. Os resultados encontrados no presente trabalho indicaram claramente que SHyc é um modulador eficiente de genotoxicidade.

U. REFERÊNCIAS

- AGRA M.F., FREITAS P.F., BARBOSA FILHO J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.114640 (2007).
- AGUIAR, J.C.D. **Estudo fitoquímico e biológico de *Hymenaea courbaril* L.** Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Química. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2009.
- ALMASSY JÚNIOR, A.A., LOPES, R.C., ARMOND, C., SILVA, F., CASALI, V.W.D. **Folhas de chá ó plantas medicinais na terapêutica humana.** Viçosa: Editora UFV, (2005). 233p.
- ARAÚJO, B.C. Efeito protetor do chá verde (*Camellia sinensis*) contra a ação genotóxica da Doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2008.
- ARUOMA, O. Neuroprotection by dietary antioxidants: New age of research. **Journal Nahrung/Food**, v.46, p.381-382 (2002).
- BAYDAR, N.G., OZKAN, G., YA AR, S. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. **Food Control**, v.18, p. 1131-1136 (2007).
- DE FLORA, S., BAGNOSCO, M., VAINIO, H. Modulation of genotoxic and related effects b carotenoids and vitamin A in experimental models: mechanistic issues. **Mutagenesis**, v.14, p.153-172 (1999).
- DUTHIE S.J., DOBSON V.L. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. **European Journal of Nutrition**, v.38, p.28634 (1999).
- FINKEL, T., HOLBROOK, J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, p.239-247 (2000).
- GAZZANEO L.R.S., LUCENA R.F.P., ALBUQUERQUE U.P. Knowledge and use of Medicinal plants by local specialists in region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **Journal Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.1, p.1-11 (2005).
- GONÇALVES, A.L., ALVES FILHO, A., MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas arvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, p.353-8 (2005).
- GRASSMANN, J., HIPPELI, S., ELSTNER, E.F. Plant defense and its benefits for animals and medicine: Role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. **Plant Physiology Biochemistry**, v.40, p.471-478 (2002).
- HARTMAN P.E., SHANKEL D.M. Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.15, p.145-182 (1990).

HAYASHI, M., MACGREGOR, J.T., GATEHOUSE, D.G., ADLER, I.D., BLAKEY, D.H., DERTINGER, S.D., KRISHNA, G., MORITA, T., RUSSO, A., SUTOU, S. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.2346252 (2000).

HEDDLE, J.A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v.18, p.1876190 (1973).

HONG, J., SMITH, T.J., HO, C.T., AUGUST, D.A., YANG, C.S. Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. **Biochemical Pharmacology**, v.62, p.1175-1183 (2001).

KANG, Y.H., LEE, K.A., RYU, C.J., LEE, H.G., LIM, J.S., PARK, S.N., PAIK, S.G., YOON, D.Y. Mitomycin C induces apoptosis via Fas/FasL dependent pathway and suppression of IL-18 in cervical carcinoma cells. **Cancer Letter**, v.237, p.33644 (2006).

KEHRER, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical Reviews. Toxicology**, v.23, p.21648 (1993).

KRISHNA, G., HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, v.455, p.155-166 (2000).

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais no Brasil**. São Paulo: Editora Plantarum, 2002.

MANOSROI, J., DHUNTANOM, P., MANOSROI, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Letter**, v.235, p.114-120 (2006).

MANTLE, D., LENNARD, T.W., PICKERING, A.T. Therapeutic applications of medicinal plants in the treatment of breast cancer: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. **Adverse Drug Reactions and Toxicology Reviews**, v.19, p.223-240 (2000).

MARNETT, L.J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, v.21, p.361-320 (2000).

MARTINS, E. R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C., DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2000. 220p.

MEJÍA, E.G., CASTAÑO-OSTADO, E.C., LOARCA-PINÃ, G. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. **Mutation Research**, v.441, p.169 (1999).

MIYAKE, M., IDE, K., SASAKI, K., MATSUKURA, Y., SHIJIMA, K., FUJIWARA, D. Oral administration of highly oligomeric procyanidins of Jatoba reduces the severity of collagen induced arthritis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.72, p.1781-1788 (2008).

G.J., LAVERDE, J.R. A., MARSAIOLI, A.J., TAMAMONA, F.M. Cierodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v. 58, p.1153-1157 (2001).

OLINSK, R., GACKOUSK, D., FOKSINKI, M., ROZALSKI, K., JARUGA, P. Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome. **Free radical Biology and Medicine**, v.33, p.192-200 (2002).

OUANES, Z., ABID, S., AYED, I., ANANE, R., MOBIO, T., CREPPY, E.E., BACHA, H. Induction of micronuclei by Zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: Protective effect of vitamin E. **Mutation Research**, v.538, p.63-70 (2003).

PARK, K.Y., JUNG, G.O., LEE, K.T., CHOI J., CHOI, M.Y., KIM, G.T., JUNG, H.J., PARK, H.J. Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. **Journal Ethnopharmacol**, v.90, p.73679 (2004).

PEREIRA, D.G., ANTUNES, L.G.M., GRAF, U., SPANÓ, M.A. Protection by *Panax ginseng* C.A. Meyer against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.947-955 (2008).

ROSÁRIO, M.M.T., NOLETO, G.R., BENTO, J.F., REICHER, F., OLIVEIRA, M.B.M., PETKOWICZ, C.L.O. Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages. **Phytochemistry**, v. 69, p. 464-472 (2008).

SALAMONE, M.F., HEDDLE, J.A. The bone marrow micronucleus assay: Rationale for a revised protocol. In: SERRES, F.J. **Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection**, New York: Plenum Press, v. 8, p.111-149 (1983).

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v.31, p.9-15 (1975).

SILVA, M.R., SILVA, M.S., MARTINS, K.A., BORGES, S. Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e de jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, p.176-182 (2001).

SILVEIRA, J.C. **Avaliação dos efeitos imunomoduladores e citotóxicos de polissacarídeos de *Chorisia speciosa* e *Hymenaea courbaril***. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Ciência-Bioquímica. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2010.

SOUSA, N.C. **Efeitos moduladores da *Annona muricata* e da *tabebuia impetiginosa* sobre a genotoxicidade da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

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

VIEIRA, P.M., SANTOS, S.C., CHEN-CHEN, L. Assessment of mutagenicity and cytotoxicity of *Solanum paniculatum* L. extracts using in vivo micronucleus test in mice. **Brazilian Journal**, v.70, p.601-606 (2010).

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

WEISBURGER, J.H., HAKA, T., DOLAN, L., LUO, F.Q., PITTMAN, B., ZANG, E. Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens. **Mutation Research**, v.371, p.57663 (1996).

YANG, K., LAMPRECHT, S.A., LIU, Y., SHINOZAKI, H., FAN, K., LEUNG, D., NEWMARK, H., STEELE, V.E., KELLOFF, G.J., LIPKIN, M. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and ozoxy methane-treated mouse colon. **Carcinogenesis**, v.21, p.1655-1660 (2000).

YOKOZAWA, T., CHEN, C.P., DONG, E., TANAKA, T., NONAKA, G.I., NISHIOKA, G.I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Biochemical Pharmacology**, v.56, p.2136222 (1998).



Capítulo II

Interferência da Seiva de *Hymenaea courbaril* L. sobre a mutagenicidade e recombino-genicidade induzida pelo Cloridrato de Doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

CAMILA REGINA DO VALE

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral
Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese

Hymenaea courbaril L. sobre a mutagenicidade e recombinação induzida pelo Cloridrato de Doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

VALE, C.R¹., CARVALHO, S¹., CHEN-CHEN, L¹.

¹Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese, ICB I, Campus II, Universidade Federal de Goiás, CEP: 74001-970, Goiânia-GO

RESUMO

Hymenaea courbaril L. (família Fabaceae), popularmente conhecida no Brasil como jatobá, é uma espécie que ocorre na floresta semi-decídua da América do Sul. A espécie tem sido utilizada no Brasil para fabricação de picolés, farinhas, pães, biscoitos e na medicina popular para tratar artrite, disfunção gástrica, inflamação e doenças respiratórias. Apesar do amplo uso da espécie como forma alimentar e medicinal não existem estudos na literatura acerca de seus efeitos tóxicos, genotóxicos e/ou antígenotóxicos. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos, mutagênicos, recombinagênicos, antimutagênicos e antirecombinogênicos da seiva de *Hymenaea courbaril* (SHyc) usando o teste para detecção de recombinação e mutação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Para avaliar as atividades genotóxica e recombinagênica pelo teste SMART, larvas de terceiro estágio provenientes dos cruzamentos padrão (ST) e o cruzamento de alta bioativação metabólica (HB) foram tratadas com 3 doses de SHyc (0,3; 1,5 ou 3mL) por aproximadamente 48 horas. Para avaliar a atividade antígenotóxica, larvas provenientes de ambos os cruzamentos foram co-tratadas com 3 doses de SHyc (0,3; 1,5 ou 3mL) e doxorubicina (0,125 mg / mL). Nossos resultados mostraram que SHyc não apresentou efeitos mutagênicos e recombinagênicos em *D. melanogaster* pelo teste SMART. Por outro lado, a ação antimutagênica e antirecombinogênica foi evidenciado em todas as doses testadas.

Palavras-chave: antimutagênico, anti-recombinogênico, jatobá, SMART, *Drosophila*.

Hymenaea courbaril L. (Family Fabaceae), popularly known in Brazil as jatobá, is a species that occurs in semi-deciduous forest of the South America. The species has been used in Brazil for making popsicles, flour, breads, cookies and in folk medicine to treat arthritis, gastric dysfunction, inflammation and respiratory diseases. Despite the widespread use of the species as a food and in folk medicine no studies were found in the literature about the toxic, genotoxic, and antigenotoxic effects. Thus, the present study aimed to evaluate the toxic, mutagenic, recombinogenic, antimutagenic and antirecombinogenic effects of *Hymenaea courbaril* sap (Hycs) using the somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. To evaluate the genotoxic and recombinogenic activities by SMART, three-day-old larvae derived from standard (ST) and high bioactivation (HB) crosses were treated with 3 doses of Hycs (0.3; 1.5 or 3mL) for approximately 48 hours. To evaluate the antigenotoxic activity, larvae derived from both crosses were cotreated with 3 doses of Hycs (0.3; 1.5 or 3mL) and doxorubicin (0.125 mg/mL). Our results showed that Hycs did not exhibit mutagenic and recombinogenic effects in SMART in both crosses of *D. melanogaster*. On the other hand, antimutagenic and anti-recombinogenic effects were evidenced in all doses tested.

Key words: antimutagenic, anti-recombinogenic, jatobá, SMART, *Drosophila*.

1. INTRODUÇÃO

O consumo de componentes de plantas pode diminuir a taxa de acumulação de danos no DNA e pode ser uma estratégia eficaz para modulação ou inibição do processo de mutagênese e carcinogênese (Ferguson *et al.*, 2004; De Flora e Ferguson, 2005). Apesar disso, muitas delas também possuem compostos tóxicos que são capazes de induzir eventos mutacionais em células somáticas ou germinativas (Almeida, 1993). Por isso, é de vital importância avaliar os efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e antígenotóxicos de substâncias fitoterápicas desde que o seu uso tem grande impacto sobre a saúde de um grande número de pessoas (Marques *et al.*, 2002; Siddique *et al.*, 2008).

A espécie *Hymenaea courbaril* L. (família Fabaceae) é popularmente conhecida no Brasil como jatobá, é uma espécie tropical que ocorre na floresta semi-decídua da América do Sul. A espécie têm sido utilizada no Brasil para fins culinários e na medicina popular para tratar a artrite, disfunção gástrica, inflamação e doenças respiratórias (Silva *et al.*, 2001; Lorenzi e Matos, 2002). Plantas do gênero *Hymenaea* (família Fabaceae) são comumente usadas na medicina tradicional brasileira no tratamento de processos inflamatórios, infecções bacterianas, reumatismo e anemia (Gazzaneo *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2005; Agra *et al.*, 2007).

A análise fitoquímica de *H. courbaril* revelou a presença de compostos fenólicos (taninos, flavonóides e procianidinas), óleos essenciais e terpenos na resina exsudada pelo tronco, em extratos da casca, folhas, frutos e seiva (Martins *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2001). Os flavonóides possuem ação antioxidante, removem os radicais livres e exibem atividade antígenotóxica. Procianidinas possuem uma variedade de atividades, como por exemplo, antioxidante, antiinflamatória e inibidora da tirosinase (Miyake *et al.*, 2008). No entanto, em altas concentrações pode apresentar efeitos genotóxicos (Park *et al.*, 2004; Aguiar, 2009).

Devido à ampla utilização de *H. courbaril*, o objetivo do presente trabalho foi avaliar seus efeitos tóxicos, genotóxicos e antígenotóxicos pelo teste de recombinação e mutação somática (SMART/asa) em *Drosophila melanogaster* (Graf *et al.*, 1984).

O teste SMART usando asas de *D. melanogaster* é um ensaio de curto prazo, caracterizado por ser rápido, barato, produzir resultados confiáveis e facilmente reproduzíveis. Esse ensaio vem sendo amplamente utilizado na detecção de efeitos citotóxicos, mutagênicos,

e antirecombinogênicos de agentes químicos e misturas complexas e é adequado para a detecção da atividade recombinagênica de agentes genotóxicos (Graf *et al.*, 1984; 1989; Graf e Van Schaik, 1992; Spanó *et al.*, 2001). Este ensaio permite a detecção e quantificação simultânea de recombinação mitótica e mutação (Andrade *et al.*, 2004).

2. MATERIAL e MÉTODOS

2.1. Material Botânico

A seiva da *H. courbaril* (SHyc) foi coletada em Pirenópolis, estado de Goiás, Brasil. Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás sob o número 22.972/UFG. A SHyc foi extraída através de incisões no tronco de *H. Courbaril*, sendo transferida para frascos de vidro e mantida a 5°C até o momento do uso.

2.2. Linhagens de *Drosophila melanogaster*

Para a realização desse ensaio foram utilizadas três linhagens de *D. melanogaster* que são portadoras de diferentes marcadores genéticos em seus cromossomos (Graf e Van Schaik, 1992). As linhagens apresentam a seguinte constituição genética:

- multiple wing hairs (mwh): *mwh/mwh*, com constituição fenotípica apresentando múltiplos pelos por célula;
- flare³(flr³): *flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*, com constituição fenotípica apresentando pelos com a base alargada;
- ORR; flare³(ORR; flr³): *ORR; flr³ /In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*, com constituição fenotípica apresentando altos níveis de enzimas de metabolização da classe citocromo P450.

2.3.1. Controles

- Foi utilizado como controle positivo o Cloridrato de Doxorrubicina (DXR-0.125 mg/mL, Doxolen liofilizado, Eurofarma Laboratórios Ltda., São Paulo, SP, Brazil, lot. n° 23214-92-8) e como controle negativo água destilada estéril.

2.4. Cruzamentos

Foram utilizados nesse bioensaio, dois tipos de cruzamentos:

a- Cruzamento Padrão (ST)-fêmeas virgens da linhagem flr^3 foram cruzadas com machos *mwh*. Esse cruzamento apresenta níveis basais de expressão de enzimas de metabolização, complexo citocromo P450 (Graf *et al.*, 1989).

b- Cruzamento de Alta Bioativação Metabólica (HB) - fêmeas da linhagem ORR; flr^3 foram cruzadas com machos *mwh*. Este cruzamento apresenta níveis elevados de expressão de enzimas de metabolização, especialmente as do complexo citocromo P450 (Graf e Van Schaik, 1992).

Os cruzamentos tiveram a duração de 48 horas, realizados em garrafas contendo uma proporção de 80 fêmeas para 40 machos, previamente preparadas com meio de cultura banana-água. Posteriormente, os reprodutores dos cruzamentos ST e HB foram transferidos para o meio de cultura de ovoposição por um período de 8 horas, para obtenção de larvas de terceiro estágio. De ambos os cruzamentos foram obtidos dois tipos de descendentes: heterozigoto para os marcadores *mwh* e flr^3 (*mwh/flr⁻* - **MH**)-apresentando asas arredondadas; e heterozigoto para o balanceador TM3 (*mwh/TM3* - **BH**)-que possuem asas serrilhadas devido à presença do cromossomo balanceador TM3 (Graf *et al.*, 1996).

2.5. Meios de Cultura e Condições de Cultivo

Para a manutenção das linhagens de *D. melanogaster* e para a realização dos cruzamentos das moscas adultas foi utilizado o meio de cultura banana-água modificado (Marques *et al.*, 1966), distribuído em garrafas estéreis de 250 mL (Graf *et al.*, 1984). A coleta de larvas de terceiro estágio provenientes dos cruzamentos ST e HB foi realizada a

feito por uma camada de fermento biológico (*Sachamyces cerevisiae*) e açúcar sobre uma base sólida (1 cm) de ágar a 3% (Graf *et al.*, 1984). Para o tratamento crônico das larvas foi utilizado, por tubo, 900mg de purê de batata comercial (Yoki alimentos S.A), hidratados com 3 mL das diferentes concentrações selecionadas da SHyc e os respectivos controles positivo (doxorubicina a 0,125 mg/mL) e negativo (água destilada).

As linhagens foram mantidas em uma câmara com temperatura constante a 25°C e umidade relativa de aproximadamente 60%.

2.6. Procedimento Experimental - Tratamento Crônico

Os experimentos foram realizados de acordo com Graf e colaboradores (1984). Após 72±4 horas do início da ovoposição as larvas de terceiro estágio de ambos cruzamentos foram coletadas por flotação em água corrente com auxílio de peneiras de malha fina. Para a avaliação do efeito tóxico, foram utilizadas 100 larvas em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) submetidas a tratamento crônico por administração oral da SHyc. Para cada tubo foram adicionados 0,9 g de meio de cultura purê de batata instantâneo (Yoki Alimentos S.A.) hidratados com 3 mL de 13 diferentes doses da SHyc (0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,28; 0,3; 1,5 ou 3 mL) para determinar as curvas de sobrevivência das larvas em função da dose e também os controle negativo (água destilada estéril) e positivo (DXR a 0,125 mg/mL).

Na avaliação da atividade genotóxica, seguindo os mesmos procedimentos adotados para a curva de sobrevivência, foram usados 150 larvas/tubo provenientes de ambos os cruzamentos selecionados (ST e HB). Cada tubo foi previamente preparado com 0,9 g de purê de batata, que foram hidratados com 3 mL de 3 diferentes doses da SHyc selecionadas a partir dos resultados dessa curva de sobrevivência (0,3; 1,5 ou 3 mL).

Para avaliação da antigenotoxicidade também foram colocadas 150 larvas/tubo de ambos os cruzamentos. Os tubos contendo 0,9 g de purê de batata, foram hidratados com 3 mL do controle positivo (solução de DXR a 0,125mg/mL) associadas com as mesmas doses da SHyc utilizadas para avaliação da genotoxicidade (0,3; 1,5 ou 3 mL).

Os adultos emergentes de cada tubo foram conservados em etanol 70% e armazenados à temperatura ambiente, até o momento da montagem das asas e posterior análise microscópica.

As moscas, conservadas em etanol 70%, tiveram suas asas retiradas com o auxílio de pinças de relojoeiro, distendidas e fixadas sobre a superfície de lâminas secas e embebidas com solução de FAURE (30g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 1,5g de hidrato cloral e 50 mL de água destilada). As lâminas foram mantidas a 40°C, em uma placa aquecedora, por um período mínimo de 24 horas. Posteriormente, foram colocadas lamínulas (24 x 32 mm), contendo uma gota da solução de FAURE, permanecendo por mais 24 horas a 40°C (Graf *et al.*, 1984). Cada lâmina foi composta por 20 asas, sendo 10 asas de machos e 10 asas de fêmeas. Para cada dose foram analisadas 80 asas.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com 400X de ampliação. A análise constitui-se no registro da frequência, tipo de manchas encontradas (simples ou gêmeas), bem como o tamanho das mesmas e a posição em que se encontram na asa.

2.8. Análise Estatística

Para análise estatística de possíveis efeitos genotóxicos foi realizada uma comparação entre a frequência de manchas mutantes dos grupos tratados com a SHyc e o controle negativo. Estas comparações foram realizadas utilizando-se o teste binomial condicional de Kastenbaum e Bowman (1970), com nível de significância de 5%. Esse procedimento utilizado baseou-se em duas hipóteses:

(I) **H₀**: não há diferença entre as frequências de mutações do grupo controle e dos grupos tratados com a SHyc.

(II) **H_a**: as frequências de mutação induzida nos grupos tratados são m vezes maiores que a frequência de mutações espontâneas obtida no grupo controle negativo.

Onde ω é o fator de multiplicação inserido para minimizar os riscos de falso-positivo: $m=2$ para manchas simples pequenas e total de manchas, pois elas apresentam altas frequências espontâneas e $m=5$ para manchas simples grandes e gêmeas, porque raramente surgem de forma espontânea (Graf *et al.*, 1984; Frei e Wurgler, 1988; Frei *et al.*, 1992).

Com base nos resultados obtidos dessa análise estatística foi feito um procedimento de múltiplas decisões de acordo com Frei e Wurgler (1988):

(I) **Aceita-se ambas as hipóteses**, como elas não podem ser verdadeiras simultaneamente, nenhuma decisão pode ser tomada, tendo-se assim, **resultados inconclusivos**.

(II) Aceita-se **H₀** e rejeita-se **H_a**, o resultado será negativo.

resultado será **positivo**.

(IV) Rejeitam-se ambas as hipóteses e o resultado será fraco-positivo.

Para análise estatística da antigenotoxicidade, a frequência de manchas mutantes dos grupos tratados com a SHyc foram comparadas com o controle positivo [agente genotóxico isolado (DXR) versus SHyc + agente genotóxico-DXR], por meio do teste-U não paramétrico de Mann-Whitney (Frei e Würigler,1995).

Devido a fraca expressão do marcador de flr³ em clones pequenos e sua letalidade em clones grandes de células mutantes (Graf, 1995), apenas os clones mwh (manchas mwh simples e gêmeas) foram utilizados para calcular as frequências formação de clones por 10⁵ células. Estes valores foram depois utilizadas para estimar a contribuição de recombinação e mutação para a incidência do total de manchas mutantes em moscas MH (Andrade *et al.*, 2004). As percentagens de inibição (PI) foram calculados usando o total de manchas por asa com a seguinte fórmula (Abraham, 1994):

$$PI = \frac{\text{Genotoxina (DXR)} - \text{Genotoxina (DXR) + SHyc}}{\text{Genotoxina (DXR)}} \times 100$$

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos a partir da curva de sobrevivência das larvas em função da dose são mostrados na **Figura 1**. De acordo com a curva de sobrevivência obtida no presente estudo, as doses de SHyc (0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,28; 0,3; 1,5 ou 3 mL) utilizadas não tiveram efeitos significativos sobre o número de sobreviventes. Pode-se observar que a frequência de sobrevivência foi superior a 90% para todas as concentrações analisadas.

Dessa maneira, as diferentes concentrações da SHyc não provocaram uma diminuição significativa ($p > 0,05$) na taxa de sobrevivência das larvas de *D. melanogaster* em ambos os cruzamentos (ST e HB) quando comparados ao controle negativo. Demonstrando assim, que a SHyc não apresentou efeito tóxico para larvas de *D. melanogaster* nas condições experimentais realizadas.

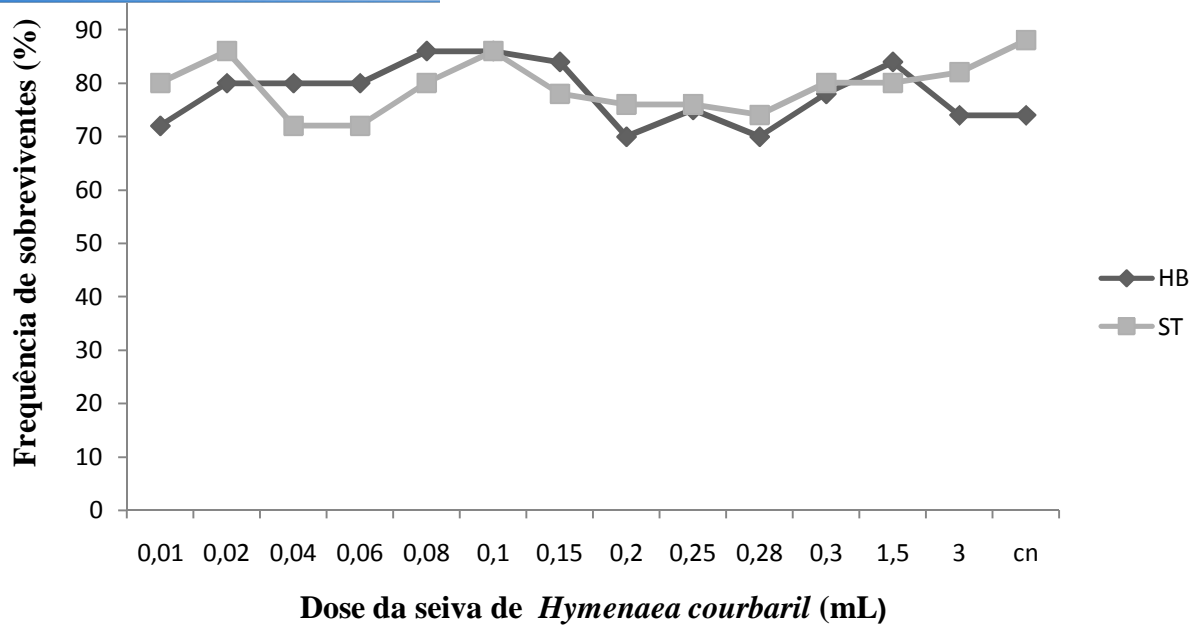


Figura 1. Curva de sobrevivência dos descendentes de *Drosophila melanogaster* provenientes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB) tratadas com diferentes doses (0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,28; 0,3; 1,5 ou 3 mL) da seiva de *H. courbaril* (SHyc) diluída em água destilada; cn: controle negativo.

Os resultados obtidos da frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes MH e BH provenientes do cruzamento ST tratados com SHyc isoladamente ou simultaneamente com DXR são mostrados na **Tabela 1**. Na avaliação da genotoxicidade, as três doses utilizadas de SHyc (0,3; 1,5 ou 3mL) não provocaram um aumento significativo ($p > 0,05$) sobre a frequência de nenhuma das categorias de manchas mutantes (simples pequenas, simples grandes e gêmeas) ou no total de manchas em relação ao grupo controle negativo, levando à conclusão de que a SHyc não é mutagênica e /ou recombinogênica.

Na avaliação da antigenotoxicidade em descendentes do cruzamento ST (**Tabela 1**), a SHyc reduziu significativamente a genotoxicidade induzida por DXR em todas categorias de manchas mutantes (simples pequenas, simples grades e gêmeas) ou no total de mancha nos descendentes MH e BH ($p < 0,05$). A porcentagem de inibição (PI) nos descendentes MH do cruzamento ST variou entre 67% a 75,46%.

de manchas mutantes observadas nos descendentes MH e BH provenientes do cruzamento HB tratados com SHyc isoladamente ou simultaneamente com DXR são mostrados na **Tabela 2**. Na avaliação da genotoxicidade, as três doses utilizadas de SHyc (0,3; 1,5 ou 3mL) também não mostraram aumento significativo ($p > 0,05$) sobre a frequência de nenhuma das categorias de manchas mutantes (simples pequenas, simples grades e gêmeas) ou no total de manchas, levando à conclusão de que a SHyc também não é genotóxica para descendentes do cruzamento HB.

Na avaliação da antigenotoxicidade em descendentes do cruzamento HB (**Tabela 2**), SHyc reduziu a genotoxicidade induzida por DXR em todas categorias de manchas mutantes (simples pequenas, simples grades e gêmeas) ou no total de manchas nos descendentes MH e BH. A porcentagem de inibição de manchas nos descendentes MH do cruzamento HB variou de 74,56 a 80,55%. Portanto, nossos resultados mostraram que a SHyc modula fortemente a atividade genotóxica da DXR para os descendentes dos cruzamentos ST e HB, evidenciando seu efeito antigenotóxico.

No presente estudo, a DXR produziu uma resposta positiva em ambos descendentes MH e BH dos cruzamentos ST e HB, indicando que este composto foi genotóxico neste ensaio (**Tabelas 1 e 2**). Este resultado está de acordo com o valor esperado e também confirma a sensibilidade do teste SMART/asa.

Com base na frequência de indução de clones por 10^5 células, foram comparados o número de manchas observadas nos descendentes MH e BH e quantificado a contribuição de mutação e de recombinação para o número total de manchas observadas (Frei et al, 1992;. Graf et al., 1992; Abraham, 1994).

Comparando a frequência de indução de clones em ambos os tipos genótipos obtidos nos tratamentos realizados com o controle positivo (DXR), observou-se que 15,14% dos clones mutantes produzidos em descendentes ST foram resultados de mutação e 84,86% de recombinação. Já para os descendentes do cruzamento HB, 13,08% das manchas ocorreram devido a mutação e 86,92% devido a eventos de recombinação.

Nos tratamentos realizados em descendentes do cruzamento ST, tratados com SHyc (0,3, 1,5 e 3 mL) associada a DXR a frequência de recombinação foi de 82,62; 86,07 e 86,51%, respectivamente (**Figura 2**). Nos descendentes do cruzamento HB, a frequência de recombinação produzida nos tratamentos com SHyc (0,3, 1,5 e 3 mL) em combinação com DXR foram de 72,13; 77,07 e 84,68%, respectivamente (**Figura 3**). Estes resultados indicam que as manchas observadas foram induzidas principalmente devido a eventos de recombinação (**Tabelas 1 e 2**).

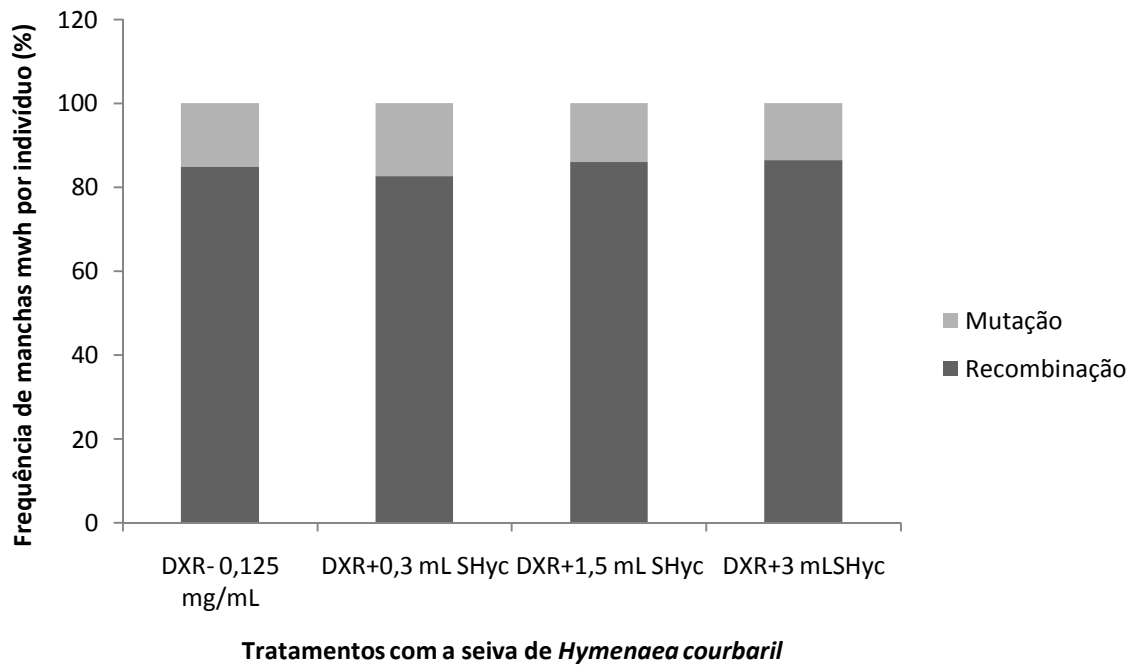


Figura 2. Contribui o das frequências de muta o e recombina o em rela o a frequência total de manchas mwh por indivíduo, do cruzamento ST, após tratamento crônico com a seiva de *Hymenaea courbaril* associado   Doxorubicina.

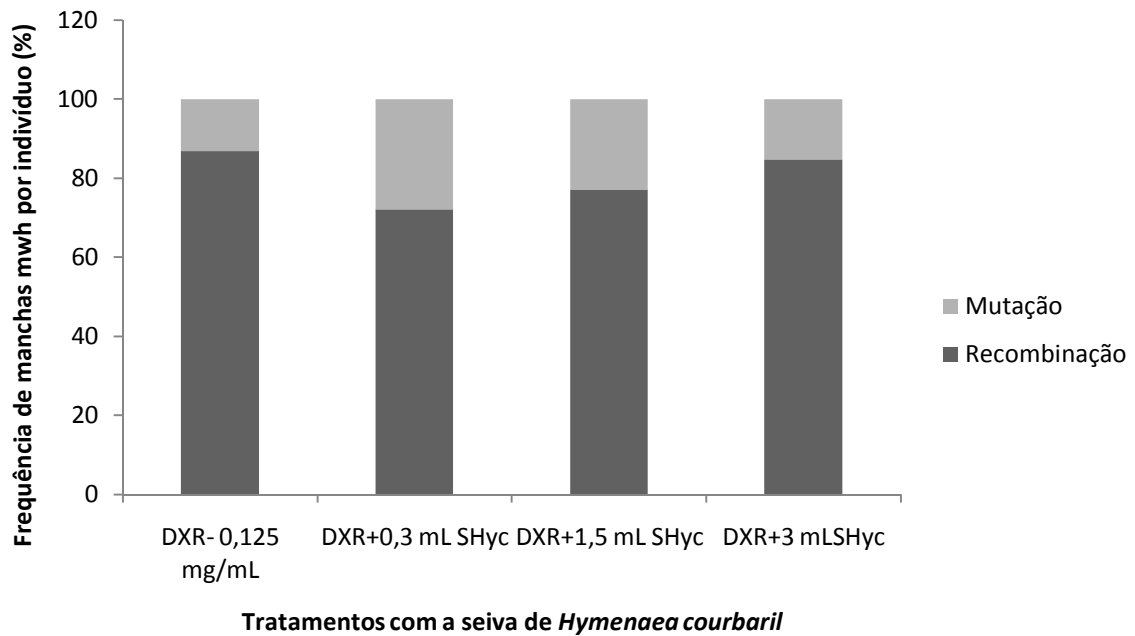


Figura 3. Contribui o das frequências de muta o e recombina o em rela o a frequência total de manchas mwh por indivíduo, do cruzamento HB, após tratamento crônico com a seiva de *Hymenaea courbaril* associado   Doxorubicina.

O objetivo do presente estudo foi investigar a atividade tóxica, genotóxica e antigenotóxica da SHyc em células somáticas de *D. melanogaster* pelo teste SMART/asa.

O Teste de Recombinação e Mutação Somática (SMART) é um teste de curta duração que utiliza a *D. melanogaster* como organismo teste. Esse ensaio pode detectar um amplo espectro de eventos genotóxicos, tais como mutações gênicas, cromossômicas e eventos de recombinação mitótica (Graf *et al.*, 1984; Graf e Singer, 1992). O SMART também é um método eficiente e rápido para a quantificação do potencial mutagênico e recombinagênico de agentes químicos e físicos (Graf *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1999; Spanó *et al.*, 2001).

Os resultados obtidos a partir da curva de sobrevivência em função da dose permitiram observar que não houve diferença significativa no número de sobreviventes nos dois cruzamentos realizados (ST e HB) comparados ao controle negativo, demonstrando assim que a SHyc não foi tóxica nas condições experimentais realizadas.

A atividade tóxica de *H. courbaril* para larvas de *Aedes aegypti* foi investigada por Aguiar (2009) e foi demonstrado que óleos essenciais presente em frutos de *H. courbaril* apresentaram atividade tóxica em doses de 14,85 e 28,44 ppm. Já Silveira (2010) observou que polissacarídeos da semente de *H. courbaril* não apresentaram atividade tóxica quando administrado em concentrações de 5, 10, 25, 100 e 200 g/mL em células de carcinoma de cérvix uterino humano (HeLa) através do ensaio colorimétrico do MTT. Essa diferença pode ser atribuída a diferentes componentes presentes na espécie *H. courbaril*, bem como, ao tipo de célula analisado.

Os resultados da avaliação da atividade genotóxica mostraram que SHyc não induziu um aumento significativo na frequência de todas as classes de manchas nos cruzamentos ST e HB ($p > 0,05$). Estes resultados indicam que SHyc não induziu mutação somática e/ou recombinação em *D. melanogaster*.

Muitos compostos são convertidos a metabólitos altamente reativos por enzimas oxidativas, principalmente pela família do citocromo P450 (CYPs). Pela ação dessas enzimas um pró-carcinógeno pode se tornar um carcinógeno (Gregory, 1996). Assim, pelos resultados obtidos com descendentes do cruzamento HB, que apresentam níveis elevados de enzimas de metabolização, pode-se obter informações da ação indireta de um mutágeno, sobre danos causados no DNA (Locatelli, 2008). No presente trabalho não foi constatado variações consideráveis de manchas mutantes entre os cruzamentos ST e HB, indicando, assim, que a

resultados apresentados e que a SHyc não apresenta efeito

genotóxico direto e/ou indireto.

Uma grande variedade de compostos tem sido estudados quanto às suas propriedades antigenotóxicas, tais como, vitaminas (Kaya *et al.*, 2002), componentes dietéticos naturais (Abraham e Stopper, 2004) e também plantas medicinais. Há um crescente interesse em identificar esses agentes antigenotóxicos efetivos, pois podem ser utilizados em dietas com a tentativa de se reduzir as taxas de mutações nos seres humanos (Nunes, 2004).

Na avaliação da antigenotoxicidade de SHyc pelo teste SMART/asa, o tratamento com diferentes doses de SHyc simultaneamente com DXR promoveram uma redução significativa em todas as três categorias de manchas mutantes (simples pequenas, simples grande e gêmeas) e no total de manchas quando comparado com o controle positivo, ($p < 0,05$). Estes resultados indicam que SHyc atua como modulador da ação genotóxica induzida pela DXR.

Miyake e colaboradores (2008) evidenciaram efeitos moduladores de *H. courbaril* contra artrite induzida por colágeno em camundongos a uma concentração de 5 mg/kg. Outros trabalhos evidenciaram que procianidinas presentes na espécie foram capazes de inibir a progressão da encefalomielite auto-imune (Miyake *et al.*, 2008).

Estudos têm demonstrado que o teste SMART em *Drosophila* é adequado para a detecção de atividade recombinagênica de produtos químicos genotóxicos (Spanó *et al.*, 2001). Utilizando os descendentes MH e BH, é possível separar os eventos mutacionais dos eventos de recombinação (Lehmann *et al.*, 2003).

Na avaliação da frequência de recombinação em relação ao número total de eventos genotóxicos observados, foi comparado o número de manchas mutantes observadas nos descendentes MH e BH, tratados com SHyc em combinação com a DXR. Para ambos os cruzamentos verificou-se que as manchas foram induzidas principalmente devido a recombinação. Foi observado que SHyc exibe tanto a atividade antimutagênica quanto antirecombinagênica.

Estudos fitoquímicos da espécie *H. courbaril* detectaram a presença de compostos fenólicos (flavonóides, procianidinas e taninos), óleos essenciais e terpenos na resina exsudada pelo tronco, em extratos da casca, frutos, folhas e seiva (Martins *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2001; Aguiar, 2009).

Dados da literatura têm demonstrado que os compostos fenólicos podem desempenhar atividade antioxidante, antiinflamatória, anticarcinogênica, diuréticos, antimicrobianos e antiviróticos (Aruoma, 2002; Zuanazzi, 2002; Almasy Júnior *et al.*, 2005;

emorrágicos, anti-hipertensivos e antitumoral (Carvalho *et al.*, 2003). Os taninos podem exibir efeitos antígenotóxicos (Weisburger *et al.*, 1996; Mejía *et al.*, 1999). Os flavonóides são capazes de eliminar radicais livres, atuando como antioxidantes (Manosroi *et al.*, 2006), são inibidores de crescimento de células tumorais, indutores da apoptose, e inativadores de cancerígenos (Duthie e Dobson, 1999; Yokozawa *et al.*, 1998). Já os terpenos são um grupo importante de produtos químicos presentes em plantas e têm sido demonstrado propriedades antioxidantes particularmente contra a peroxidação lipídica (Grassmann *et al.*, 2002).

O provável mecanismo de ação da SHyc, bem como o principal constituinte químico responsável pela antigenotoxicidade, não foram esclarecidos, considerando que a SHyc contém uma mistura complexa de metabólitos secundários. Contudo, em função da DXR gerar radicais livres e produzir danos no DNA é possível sugerir que os metabólitos secundários presentes na seiva podem ter inativado a ação genotóxica da DXR pela captura de radicais livres gerados por esse agente. Dessa forma, a atividade antigenotóxica detectada em nossos experimentos pode ser mediada, possivelmente, pela ação de compostos fenólicos e/ou terpenos que desempenha atividade antioxidante.

A capacidade antioxidante de *H. courbaril* já foi demonstrada pelo método DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), onde foi demonstrado que a espécie foi eficiente em capturar radicais livres em concentrações inferiores a 0,04 mg/mL (Aguiar, 2009). Resultados similares foram encontrados por Dias (2008) em estudos com *D. melanogaster* pelo teste SMART/asa, onde o betacaroteno atuou como um poderoso agente antioxidante.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados obtidos indicaram que seiva de *Hymenaea courbaril* não apresentou ação tóxica, mutagênica e/ou recombinagênica para *Drosophila melanogaster* nas condições experimentais utilizadas no presente estudo. Entretanto, a seiva de *Hymenaea courbaril* protegeu células contra os efeitos genotóxicos da DXR em células somáticas de *D. melanogaster* e assim apresentou atividade antimutagênica e/ou anti-recombinogênica.

U. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, S.K. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. **Mutagenesis**, v.9, p.383-386 (1994).

ABRAHAM, S.K., GRAF, U. Protection by coffee against somatic genotoxicity in *drosophila*: Role of bioactivation capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v.34, p.1-14 (1996).

ABRAHAM, S.K., STOPPER, H. Antigenotoxicity of coffee against N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, v.561, p.23-33 (2004).

AGRA M.F., FREITAS P.F., BARBOSA FILHO J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** (2007). 17: 114-140.

AGUIAR, J.C.D. **Etudo fitoquímico e biológico de *Hymenaea courbaril* L.** Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Química. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2009.

ALMEIDA, ER. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos.** São Paulo: Hemus, 1993, 341p.

ANDRADE, H.H.R., REGULY, M.L., LEHMANN, M. Wing somatic mutation and recombination test (SMART). In: Henderson, D.S. ***Drosophila* Cytogenetics Protocols.** Totowa: Humana Press Inc, p.389-412 (2004).

ARAÚJO, B.C. Efeito protetor do chá verde (*Camellia sinensis*) contra a ação genotóxica da Doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

ARUOMA, O. Neuroprotection by dietary antioxidants: New age of research. **Journal Nahrung/Food**, v.46, p.381-382 (2002).

CARVALHO, J.C.T., GOSMAN, G., SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SCHENKEL, E.P., GOSMAN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: Editora UFRGS, 5ª edição (2003).

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

DIAS, C.D. **Efeito protetor do Betacaroteno contra a ação genotóxica da doxorubicina, em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.** Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2008.

Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack *in vitro*. **European Journal of Nutrition**, v.38, p.286-34 (1999).

FERGUSON, L.R., PHILPOTT, M., KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. **Toxicology**, v.198, p.147-159 (2004).

FREI H, CLEMENTS J., HOWE D., WURGLER F.E. The genotoxicity of the anticancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.279, p.21-33 (1992).

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

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

GAZZANELO, L.R.S., LUCENA, R.F.P., ALBUQUERQUE, U.P. Knowledge and use of Medicinal plants by local specialists in region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **Journal Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.1, p.1-11 (2005).

GONÇALVES, A.L., ALVES FILHO, A., MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas arvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, p.353-8 (2005).

GRAF, U. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Experientia**, v.51, p.168-173 (1995).

GRAF U., FREI H., KAGI A., KATZ A.J., WURGLER F.E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v.222, p.359-373 (1989).

GRAF, U., HDEO, O.S., OLVERA RAMIREZ, O. The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. **Mutation Research**, v.266, p.197-203 (1992).

GRAF. U., SINGER D. Genotoxicity testing of promutagens in the wing Somatic Mutation and Recombination Test In *Drosophila melanogaster*. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v.8, p.15-27 (1992).

GRAF, U.; SPANÓ, M.A., GUZMÁN-RINCÓN, J., ABRAHAM, S.K., ANDRADE, H.H.R. The wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. **African newslett on occupational Health and Safety**, v.6, p.9-13 (1996).

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

GRAP, S., WURGLER, F.E., KATZ, A.J., FREI, H., JUON, H., HALL, C.B., KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v.6, p.153-188 (1984).

GRASSMANN, J., HIPPELI, S., ELSTNER, E.F. Plant defense and its benefits for animals and medicine: Role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. **Plant Physiology Biochemistry**, v.40, p.471-478 (2002).

GREGORY, P. Azo dyes: structures Carcinogenicity Relationship. Dyes and Pigments. **Applied Science Publishers**, v.7, p.45-56 (1996).

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

KAYA, B., CREUS, A., VELÁSQUEZ, A., YANIKOGLU, A., MARCOS, R. Genotoxicity is modulated by ascorbic acid studies the wing spot test in *Drosophila*. **Mutation Research**, v.520, p.93-101 (2002).

LEHMANN, M., FRANCO, A., SOUZA, P.V.K., LUKZA, R.M. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.539, p.167-175 (2003).

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais no Brasil**. São Paulo: Editora Plantarum, 2002.

MANOSROI, J., DHUNTANOM, P., MANOSROI, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Letter**, v.235, p.114-120 (2006).

MARQUES, E. K., NAPP, M., WINGE, H., CORDEIRO, A. R. A corn meal, soybean flour, wheat germ medium for *Drosophila*. **Drosophila Information Service**, v.41, p.187 (1966).

MARQUES, M.C.S., CARDOSO, M.G., SOUZA, P.E., GAVILANES, M.L., SOUZA, J.A., PEREIRA, N.E., NEGRAO, I.O. Efeito fungitóxico dos extratos *Caryocar brasiliense* Camb. Sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. **Ciência Agrotecnologia**, v.26, p.1410-1419 (2002).

MARTINS, E.R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C., DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Editora UFV (2000). 220p.

MEJÍA, E.G., CASTANÕ-OSTADO, E.C., LOARCA-PINÃ, G. Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans. **Mutation Research**, v.441, p.169 (1999).

MIYAKE, M., IDE, K., SASAKI, K., MATSUKURA, Y., SHIJIMA, K., FUJIWARA, D. Oral administration of highly oligomeric procyanidins of Jatoba reduces the severity of collagen induced arthritis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.72, p.1781-1788 (2008).

YAMAMOTO, T.M. Cterodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v. 58, p.1153-1157 (2001).

NUNES, W. B. Efeito modulador do extrato padronizado de *Ginkgo biloba* (EGB 761) contra mutações e recombinações somáticas induzidas pela doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2004.

PARK, K.Y., JUNG, G.O., LEE, K.T., CHOI J., CHOI, M.Y., KIM, G.T., JUNG, H.J., PARK, H.J. Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. **Journal Ethnopharmacol**, v.90, p.73679 (2004).

SILVA, M.R., SILVA, M.S., MARTINS, K.A., BORGES, S. Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e de jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, p.176-182 (2001).

SILVEIRA, J.C. **Avaliação dos efeitos imunomoduladores e citotóxicos de polissacarídeos de *Chorisia speciosa* e *Hymenaea courbaril***. Dissertação (Mestrado) Curso de Pós-Graduação em Ciência-Bioquímica. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2010.

SPANÓ, M.A., FREI, H., WURGLER, F.E., GRAF, U. Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. **Mutagenesis**, v.16, p.385-394 (2001).

VOGEL, E.W., GRAF, U., FREI, H.J., NIVERD, M.M.J. The results of assay in *Drosophila* of exposure to carcinogens. **International for research on Cancer**, v.146, p.427-470 (1999).

WEISBURGER, J.H., HARA, Y., DOLAN, L., LUO, F.Q., PITTMAN, B., ZANG, E. Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens. **Mutation Research**, v.371, p.57663 (1996).

YOKOZAWA, T., CHEN, C.P., DONG, E., TANAKA, T., NONAKA, G.I., NISHIOKA, G.I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Biochemical Pharmacology**, v.56, p.2136222 (1998).

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMAN, C., MELLO, B.C.P., MENTZ, Z.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. Florianópolis: UFSC, p499-528 (2002).

Capítulo III



Manuscript submetido a revista Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis:

Assessment of the toxic, genotoxic, antigenotoxic and recombinogenic, activities of the *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae) in *Drosophila melanogaster* and mice.

CAMILA REGINA DO VALE

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral
Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese

antigenotoxic, and recombinogenic activities of *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae) in *Drosophila melanogaster* and mice

Camila Regina do Vale^a, Carolina Ribeiro e Silva^a, Cecília Maria Alves de Oliveira^b, Alessandro Lopes Silva^b, Salvador de Carvalho^a and Lee Chen-Chen^{a,*}

^a Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus II, 74001-97, Goiânia, Goiás, Brazil

^b Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus II, 74001-97, Goiânia, Goiás, Brazil

Corresponding author at: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus II, 74001-97, Goiânia, Goiás, Brazil.

Tel.: +55 62 3521-1483; fax: +55 62 3521-1190.

E-mail address: chenleego@yahoo.com.br (L. Chen-Chen).

Abstract: *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae), popularly known in Brazil as jatobá, is a tropical species that occurs in semi-deciduous forests in South America. The species has been used in Brazil for culinary purposes and in folk medicine to treat arthritis, gastric dysfunction, inflammations, and respiratory diseases. Due to the spreading use of this plant as a therapeutic resource and food, the present study aimed to evaluate the toxic, genotoxic, recombinogenic, and antigenotoxic effects of *Hymenaea courbaril* sap (Hycs) using the mouse bone marrow micronucleus test and the somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. To evaluate the genotoxicity by the micronucleus test, the animals were treated with three doses of Hycs (5, 10, and 15 mL/kg body weight). To evaluate the antigenotoxic activity, the animals were simultaneously treated with Hycs and mitomycin C (4 mg/kg of body weight). To assess the genotoxic and recombinogenic activities using SMART, three-day-old larvae derived from standard (ST) and high bioactivation (HB) crosses were treated with three doses of Hycs (3.0, 1.5, and 0.3 mL) for approximately 48 hours. To evaluate the antigenotoxic activity, larvae derived from both crosses were co-treated with three doses of Hycs (3.0, 1.5, and 0.3 mL) and doxorubicin (0.125 mg/mL). Our results showed that Hycs did not exhibit cytotoxic and genotoxic effects in mouse bone marrow test and also did not exhibit mutagenic and recombinogenic effects using SMART in *D. melanogaster*. On the other hand, antigenotoxic action was evidenced in both tests.

Keywords: Antigenotoxicity, *Hymenaea courbaril* L, Micronucleus, SMART.

1. Introduction

For centuries, plants have been widely used as food and for medicinal purposes in different cultures. In the last few years, the interest in medicinal plants has increased worldwide. Because of the immense flora all over the world and the cultural aspects, the use of medicinal plants in the form of crude extracts, infusions, or plasters has been revived as a usual practice to treat common diseases [1,2].

Although plants have been increasingly used as complementary or alternative medicines for the treatment of a variety of diseases [3], in many cases, scientific evidence of their therapeutic efficacy or their potential risk to health is still limited [4,5].

Consequently, the indiscriminate use of plants can pose risks to human health, since many of them possess toxic compounds that are able to induce mutational events in somatic or germ cells [6]. In contrast, plant consumption could decrease the rate of DNA damage accumulation and may be an effective strategy for either the modulation or the inhibition of the mutagenic and carcinogenic processes [7,8]. Therefore, it is very important to assess the mutagenic potential or modulating activity of plant extracts [9].

Hymenaea courbaril L. (Fabaceae), popularly known in Brazil as jatobá, is a tropical species that occurs in semi-deciduous forests in South America. For centuries, the species has been used in Brazil for culinary purposes and in folk medicine to treat arthritis, gastric dysfunction, inflammations, and respiratory diseases [10,11]. Plants of the genus *Hymenaea* are commonly used in traditional Brazilian medicine to treat inflammatory processes, bacterial infections, rheumatism, and anemia [12-14].

The trunk of *H. courbaril* exudes a sap which is used in folk medicine for the treatment of wounds, bronchitis, and stomach disorders [15]. Analgesic and anti-inflammatory activities were also reported for the hydroalcoholic extract obtained from the bark of this species [16]. The jatobá fruit provides high-fiber flour containing 66 g/kg protein, which presents potential use for the production of high-fiber snacks [17].

The phytochemical analysis of *H. courbaril* revealed the presence of the phenolic compounds, such as tannins, flavonoids and procyanidins, essential oils, and terpenes in the resin exuded by the trunk, in extracts of bark, leaves, fruits, and sap. Flavonoids have antioxidant action, remove free radicals, and exhibit antigenotoxic activity. Procyanidins have

-oxidative, anti-inflammatory, and tyrosinase inhibitory [18]; however, in high concentrations, they may present genotoxic effects [15,19621].

Due to the large utilization of jatobá herein described, the aim of the present work was to evaluate the toxic, genotoxic, recombinogenic, and antigenotoxic activities of *H. courbaril* sap using the micronucleus test in mice [22] and the somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster* [23].

The micronucleus test in mice is used to detect the genotoxicity of chemicals through their ability to induce the formation of small membrane-bound DNA fragments [24]. The evaluation of micronucleus induction is very important in *in vivo* genotoxicity tests and it is recommended by regulatory agencies around the world as part of product safety assessment. The assay detects both clastogenic and aneugenic effects [25].

SMART, using wings of *Drosophila melanogaster*, is a flexible and sensitive short-term test for the detection of genotoxicity of inductor agents and has been proven to be the most suitable technique for the detection of recombinogenic activity of genotoxic agents [23,26628]. This assay allows the simultaneous detection and quantification of mitotic recombination and mutations [29].

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The *H. courbaril* sap (Hycs) was collected in Pirenópolis, in the state of Goiás, Brazil. A voucher specimen was deposited at the Herbarium of the Universidade Federal de Goiás (no. 22.972/UFG). The sap was extracted through incisions in the trunk of *H. courbaril*, transferred to glass flasks, and kept at 5°C until the moment of use.

2.2. Mouse bone marrow micronucleus test

2.2.1. Animals

This protocol was approved by the Animal Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Goiás (CEP/UFG no.183/2011).

Healthy, young male adult outbred mice (*Mus musculus*, Swiss-Webster strain), obtained from the Central Animal House of the Universidade Federal de Goiás, were

ups. All animals were brought to the laboratory 7 days before the experiments and housed in plastic cages (40 cm x 30 cm x 16 cm), in groups of five animals, at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ and $55 \pm 10\%$ of humidity, with a light-dark natural cycle of 12 h. All the animals received food (appropriate commercial rodent diet, Labina, Ecibra Ltda., Inhumas, GO, Brazil) and water *ad libitum*. On the day of dosing, the animals were approximately 769 weeks old and weighed 25635 g.

2.2.2. Experimental procedure

The experiments were performed according to Heddle [22] and Schmid [30]. To assess genotoxicity, three doses of Hycs (5, 10, and 15 mL/kg body weight) were orally administered to groups of five animals for each treatment. To evaluate antigenotoxicity, groups of five animals were orally treated with three doses of Hycs (5, 10, and 15 mL/kg) simultaneously with mitomycin C (MMC, 4 mg/kg, lot no. 237AEL, Bristol, Mayers Squibb, São Paulo, SP, Brazil) administered intraperitoneally (ip). For both experiments, a positive control group (MMC, 4 mg/kg ó PC) and a negative control group (sterile distilled water ó NC) were included. Mice were euthanized by cervical dislocation 24 h and 48 h after Hycs administration.

After the period of treatment (24 h and 48 h), mice femurs were dissected, opened, the bone marrow cells were gently flushed out with fetal calf serum (FCS, lot no. 30721063, Laborclin, Campinas, SP, Brazil), and centrifuged (300 x g, 5 min). The bone marrow cells were smeared on glass slides, coded for blind analysis, air-dried, and fixed with absolute methanol (CH_4O , lot no. 55026, Synth, Diadema, SP, Brazil) for 5 min at room temperature. The smears were stained with Giemsa (lot no. 1081, Doles, Goiânia, GO, Brazil), dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, lot no. 982162, Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil), and monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, lot no. 983831, Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil) for the detection of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) [22].

In order to evaluate the genotoxic and/or antigenotoxic effect, we prepared four slides for each mouse, and scored 2,000 polychromatic erythrocytes (PCE) to determine the frequency of MNPCE. Cytotoxicity was evaluated by the polychromatic erythrocytes (PCE) and normochromatic erythrocytes (NCE) ratio (PCE/NCE). We counted the frequency of both PCE and NCE; when the PCE count reached 2,000 cells, the frequency for NCE was scored. The slides were analyzed by microscopy (10 x 100, BH-2 microscope, Olympus, Center Valley, PA, USA).

2.2.3. Statistical analysis

To analyze the genotoxic activity of Hycs, we compared the frequency of MNPCE detected in the treated groups to the results obtained from the NC. To analyze the antigenotoxic activity of Hycs, the frequency of MNPCE in the treated groups was compared with the results of the PC. One-way ANOVA was applied, followed by all pairwise comparisons via a multiple comparison procedure (Tukey test) and a value of $P < 0.05$ was taken as the criterion of statistical significance.

To evaluate the cytotoxicity of Hycs, the PCE/NCE ratio of all treated groups was compared with the results obtained from the NC. To evaluate the anticytotoxicity of Hycs, the PCE/NCE ratio of all treated groups was compared with the results obtained from the PC. A nonparametric χ^2 test was applied to determine the statistical significance of the results and a value of $P < 0.05$ was considered significant.

2.3. Somatic mutation and recombination test (SMART)

2.3.1. *Drosophila* strains and crosses

Three strains of *D. melanogaster* were used for the SMART wing assay: 1) multiple wing hairs: $y;mwh\ j$ (mwh , 3-0.3); 2) flare³ (flr^3 , 3-38.8) ($flr^3/In(3LR)TM3, ri\ pp\ sep\ I(3)89Aa\ bx34e\ Bd^S$); 3) ORR/ORR; $flr^3/In(3LR)TM3, ri\ pp\ sep\ I(3)89Aa\ bx34e$ and Bd^S . To produce the standard (ST) cross, stocks of flare³ virgin females were crossed with stocks of mwh males [26]. The high bioactivation (HB) cross was obtained by crossing ORR; flare³ virgin females with mwh males [27]. The HB cross is characterized by a high sensitivity to promutagens and procarcinogens because the ORR; $flr^3/TM3, Bd^S$ strain carries chromosomes 1 and 2 from a DDT-resistant Oregon R(R) line [31], which is characterized by an increased level of cytochrome P-450 [32,33].

Both crosses produce two types of progeny phenotypically distinguished by the Bd^S marker, i.e., marker-heterozygous (MH) flies ($mwh\ +/+ \ flr^3$) with phenotypically wild type wings or (ii) balancer-heterozygous (BH) flies ($mwh/TM3, Bd^S$) with phenotypically serrate wings. A detailed analysis of genetic markers is given by Lindsley and Zimm [34].

2.3.2. Experimental procedure

The experiments were performed according to Graf et al. [23]. Eggs from both crosses were collected over an 8h period and maintained in culture bottles containing a solid agar base (3%, w/v) covered with a layer of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplemented with sucrose. Third instar (72 ± 4 h) larvae were removed from the culture bottles, washed in tap water, and collected in a stainless steel strainer.

Batches of equal numbers of larvae (100 larvae/dose) were collected from the two crosses and transferred to glass vials containing 0.9 g of mashed potato flakes hydrated with Hycs or PC and NC. To assess toxic potential, we employed different doses of Hycs (0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.28, 0.3, 1.5, and 3.0 mL) to generate the larvae survival curves. To assess genotoxicity, doses of Hycs (0.3, 1.5, and 3.0 mL) were administered to the larvae. To evaluate antigenotoxicity, doses of Hycs (0.3, 1.5, and 3.0 mL) were administered to the larvae simultaneously with doxorubicin (DXR, 0.125 mg/mL, Doxolen lyophilized, Eurofarma Laboratórios Ltda., São Paulo, SP, Brazil, CAS no. 23214-92-8). NC (distilled water) and PC (DXR, 0.125 mg/mL) were included in both experiments. Larvae were allowed to feed on the medium for the remainder of their larval life (~ 48 h). The experiments were performed at 25°C and 60% relative humidity.

After hatching, flies were killed and stored in 70% ethanol, in which they remained until used for analysis. Wings of the MH flies were removed, mounted on glass slides with Faureø solution (30 g gum Arabic, 20 mL glycerol, 50 g chloral hydrate, and 50 mL water), and examined for spots using a compound microscope at 400x magnification. The wings of BH flies were mounted and analyzed whenever a positive response was obtained in the MH progeny. During the analysis, the positions of the spots were recorded according to the wing sections [23].

Single spots resulted from point mutations, chromosome aberrations, or recombination events, while twin spots (flare and mwh) were produced by mitotic recombination between the proximal marker flare and the centromere of chromosome 3. A comparison of the results obtained from MH and BH flies was used to quantify the recombinogenic potential [28, 35, 36].

2.3.3 Statistical analysis

The frequencies of spots per fly were compared with the concurrent control series according to Frei and Würgler [36,

37]. Statistical comparisons were made using the conditional binomial test according to Kastenbaum and Bowman [38] and followed a multiple-decision procedure according to Frei and Würgler [37], which makes it possible to obtain four different diagnoses: positive, weakly positive, negative, or inconclusive. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Because of the weak expression of the flr^3 marker in small clones and its lethality in large clones of mutant cells [39], only the mwh clones (mwh single and mwh twin spots) were used to calculate the clone formation frequencies per 10^5 cells. These values were then employed to estimate the contribution of recombination and mutation to the incidence of total mutant spots per fly in trans-heterozygous flies [29]. The inhibition percentages (IP) were calculated using the total spots per wing with the following formula [40]:

$$IP = \frac{\text{Genotoxin alone} - \text{Genotoxin plus Hycs}}{\text{Genotoxin alone}} \times 100$$

3. Results

3.1. Mouse bone marrow micronucleus test

The results obtained from mouse bone marrow cells 24 h and 48 h after administration of Hycs and Hycs co-treated with MMC are shown in Table 1.

The NC presented a low MNPCE value (3.2), and the PC caused a significant increase in MNPCE compared with the NC (32.6 and 11.8 at 24 h and 48 h, respectively) ($P < 0.05$). This result is in accordance with the expected value and confirms the sensitivity of the test.

The groups that received 5, 10, and 15 mL/kg Hycs showed a mean of 2.0, 2.6, and 3.4 (24 h), 2.8, 2.2, and 3.8 (48 h) of MNPCE (per 2,000 PCEs), respectively, whereas in the NC it was 3.2. Consequently, all the doses tested did not indicate any significant increase in MNPCE frequencies (both at 24 h and 48 h) when compared with the NC ($P > 0.05$), leading to the conclusion that Hycs does not harbor a genotoxic effect.

he PCE/NCE ratio was 1.25, 1.36, and 1.21 (24 h), 1.23, 1.20, and 1.27 (48 h) in the groups treated with 5, 10, and 15 mL/kg Hycs, respectively, whereas in the NC it was 1.20. Thus, Hycs exhibited no cytotoxicity effect 24 h or 48 h after treatment ($P > 0.05$).

In the antigenotoxicity evaluation, the MNPCE means (per 2,000 PCEs) were 26.8, 16.0, and 12.8 (24 h), 6.6, 6.2, and 5.4 (48 h), respectively, for the groups exposed to 5, 10, and 15 mL/kg Hycs added with MMC, whereas in the PC they were 32.6 (24 h) and 11.8 (48 h). These results demonstrate that the simultaneous treatment with Hycs and MMC led to a reduction in the frequency of MNPCE compared with MMC alone significant for all treatments ($P < 0.05$). The results indicate decreases of 17, 50, and 55% (24 h), 33, 35, and 43% (48 h) in the frequency of MNPCE. Thus, our results showed that Hycs strongly modulates the genotoxic activity of MMC, demonstrating its antigenotoxic effect.

In the evaluation of the anticytotoxic activity of Hycs, we observed increases in PCE/NCE ratio at all doses of Hycs co-treated with MMC compared with the PC ($P < 0.05$). Therefore, using the simultaneous treatment (Hycs + MMC), Hycs attenuated the cytotoxic action of MMC.

ination test (SMART)

The results obtained for the larvae survival curve according to Hycs dose are shown in Fig. 1. Based on the survival curves generated in the present study, the Hycs doses (0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.28, 0.3, 1.5, and 3.0 mL) used had no significant effects on the number of survivors and, consequently, the doses tested were not toxic to *D. melanogaster* larvae.

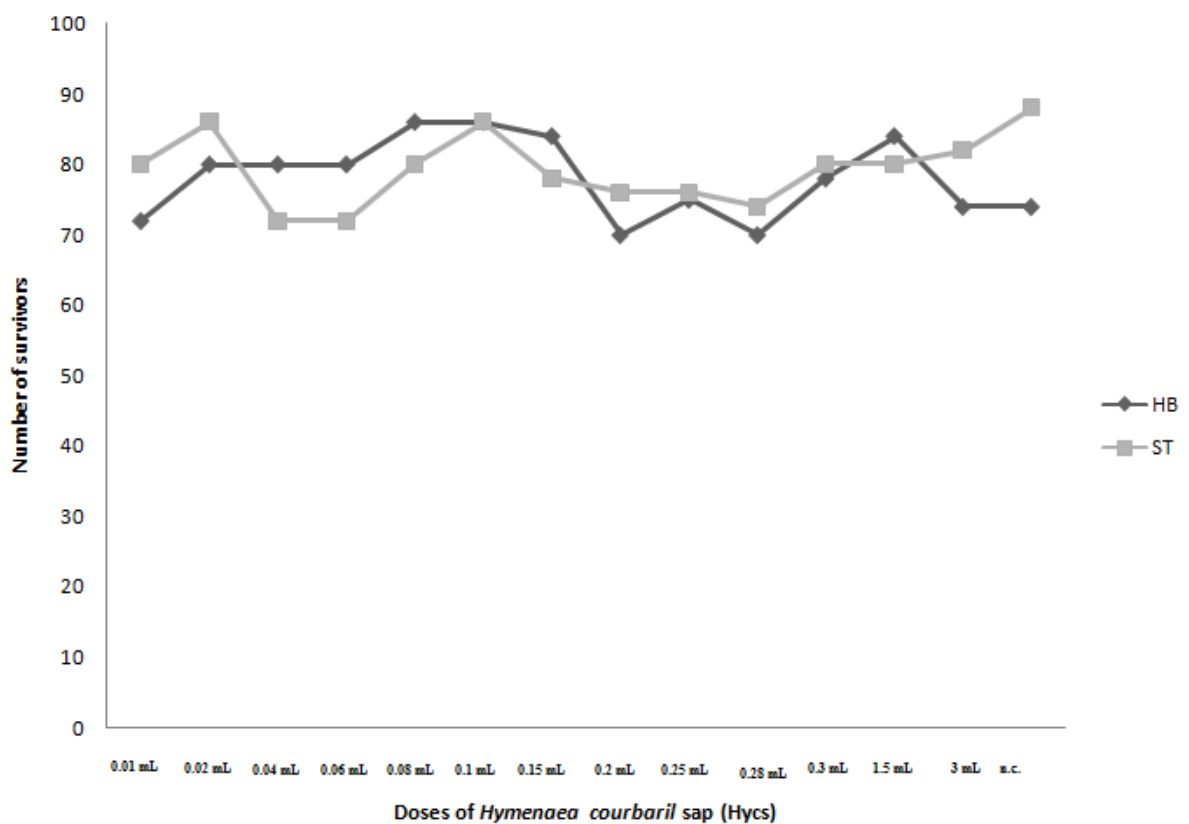


Fig 1. Survival curves of descendants of *Drosophila melanogaster* from standard (ST) and high bioactivation (HB) crosses fed with different doses (0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.28, 0.3, 1.5, and 3 mL) of *Hymenaea courbaril* sap; nc: negative control.

In this study, DXR alone produced a positive response in both MH and BH descendants of ST and HB crosses, indicating that this compound was genotoxic in this assay (Tables 2 and 3). This finding is in accordance with the expected value and confirms the sensitivity of the test.

of mutant spots observed in the MH and BH descendants from ST cross treated with Hycs alone or co-treated with DXR are shown in Table 2. In the genotoxicity evaluation, the three doses of Hycs employed (0.3, 1.5, and 3.0 mL) did not show significant increase ($P > 0.05$) in the frequency of any category of spots or total spots, leading to the conclusion that, at these doses, Hycs is not genotoxic.

In the antigenotoxicity evaluation in ST cross (Table 2), Hycs reduced the genotoxicity induced by DXR in all mutant spot categories in MH and BH descendants. The inhibition in the MH descendants from the ST cross ranged from 67.00 to 75.46%.

The results of the frequency of mutant spots observed in the MH and BH descendants from HB cross treated with Hycs alone or co-treated with DXR are shown in Table 3. In the genotoxicity evaluation, the three doses of Hycs (0.3, 1.5 and 3.0 mL) did not show significant increase ($P > 0.05$) in the frequency of any category of spots or total spots, leading to the conclusion that, at the doses tested, Hycs is not genotoxic to HB cross.

In the antigenotoxicity evaluation in HB cross (Table 3), Hycs reduced the genotoxicity induced by DXR in all mutant spot categories in MH and BH descendants. The inhibition in the MH descendants from the HB cross ranged from 74.56 to 80.55%. Therefore, our results showed that Hycs strongly modulates the genotoxic activity of DXR, demonstrating its antigenotoxic effect.

Based on the clone induction frequency per 10^5 cells, we compared the number of observed spots in the MH and BH flies and quantified the contribution (%) of mutation and recombination to the total number of observed spots [35,40,43]. Comparing the clone induction frequency in both genotypes obtained with DXR alone, we observed that 15.14% of the mutant clones produced in ST flies were a result of mutation and 84.86% of recombination, whereas 13.08% of the spots induced in HB flies occurred due to mutation and 86.92% to recombination. In ST cross descendants, recombination produced by DXR in combination with 0.3, 1.5, and 3.0 mL of Hycs were 82.62, 86.07, and 86.51%, respectively. Also, in HB cross descendants, the frequency of recombination produced by DXR in combination with 0.3, 1.5, and 3.0 mL of Hycs were 72.13, 77.07, and 84.68%, respectively. These findings indicate that the induced spots were mainly due to recombination (Tables 2 and 3).

The aim of the present work was to evaluate the genotoxic, recombinogenic, antigenotoxic, toxic, and/or cytotoxic activities of Hycs using the micronucleus test in mice and SMART in *D. melanogaster*.

The mouse bone marrow micronucleus test consists of a short term assay widely used to detect the genotoxic (clastogenic and/or aneugenic), antigenotoxic, and cytotoxic effects of substances *in vivo* [44]. Micronuclei in young erythrocytes arise primarily from acentric fragments or chromosomes that are unable to migrate and follow the mitotic spindle during cell division [24,45]. An increase in the MNPCE frequency is an indication of induced chromosome damage [25].

SMART using *D. melanogaster* was developed to detect the loss of heterozygosity of suitable gene markers that have detectable phenotypes expressed on the wings. This assay is an efficient and quick method for quantifying the recombinogenic and mutagenic potential of chemical and physical agents [28,46,47].

The results of the genotoxic assessment of Hycs using the mouse bone marrow micronucleus test did not show a significant increase in MNPCE frequency in the groups treated with the three different Hycs doses compared with the NC ($P > 0.05$). This indicates that Hycs did not exhibit the genotoxic (aneugenic and/or clastogenic) effects in PCE in mouse bone marrow.

The bone marrow micronucleus test used in this study also detects cytotoxic effects through the PCE/NCE ratio. When normal proliferation of the bone marrow cells is affected by a toxic agent, the number of immature erythrocytes (PCE) decreases in relation to that of mature erythrocytes (NCE), leading to a decrease in the PCE/NCE ratio [44]. Our results indicated that Hycs did not present cytotoxicity at all applied doses because none of them caused significant reduction in the PCE/NCE ratio compared with the NC ($P > 0.05$).

In the antigenotoxicity evaluation of Hycs, we observed that it acted effectively against the genotoxic activity of the alkylating agent MMC at all doses tested, which suggests the possible presence of antigenotoxic compounds.

The results of the genotoxic assessment of Hycs by SMART showed that it did not induce a significant increase in the frequencies of all classes of spots in both ST and HB crosses. These results indicate that Hycs did not induce somatic mutation and recombination in *D. melanogaster* in ST or HB crosses.

evaluation of Hycs by SMART, the chronic co-treatment of ST and HB larvae with different concentrations of Hycs co-treated with DXR produced significant reduction in all three categories of spots and in total spots for flies when compared with the PC ($P < 0.05$). These results indicate that Hycs acts as an antigenotoxic agent on DXR-induced DNA lesions.

Studies have demonstrated that the wing spot test in *Drosophila* is suitable for the detection of recombinogenic activity of genotoxic chemicals [28]. Using marker-heterozygous (MH) and balancer-heterozygous (BH) flies, it is possible to separate mutational events from recombinational events [48].

Comparing the number of observed spots in MH and BH flies in both crosses, we found that the induced spots were mainly due to recombination. We also observed that Hycs displays both anti-mutagenic and anti-recombinogenic activity.

Some plants may possess substances that can modulate the genotoxicity of other compounds [9]. Antigenotoxic activity of substances derived from plants may be due to a variety of mechanisms, such as inhibition of genotoxic effects, signal transduction, antioxidant activity, scavenging of free radicals, neutralization of premutagenic or mutagenic lesions by chemical compounds or by DNA repair mechanisms, or increase in metabolic inactivation of mutagens [49,51].

In the present work, Hycs revealed antigenotoxic effect against chromosome damage induced by MMC and DXR in somatic cells. The antigenotoxic effect of Hycs observed in our study might be attributed to its action in reducing alkylation and also to its antioxidant activity, since the genotoxic action of MMC is related to its ability to alkylate DNA and/or produce reactive free radicals and the genotoxic action of DXR is related to produce reactive free radicals, which cause different types of cellular damage, including DNA breaks [48,52]. Thus, Hycs action might be related to the protection of the nucleophilic site in DNA.

Free radicals generated by exogenous chemicals, such as MMC and DXR, or endogenous metabolites may cause oxidative damage by oxidizing biomolecules and result in cell death and tissue damage [53]. The genotoxic potential is directly proportional to the number of oxidative injuries to DNA that escape the repair mechanism [54]. Data from numerous experiments suggest that oxidative damage to DNA contributes to aging as well as in the etiology of many human diseases, including atherosclerosis, neurodegenerative diseases, and even cancer [55,56].

Antioxidants can protect the human body from free radicals and retard the progress of many chronic diseases [57]. Antioxidants that scavenge free radicals may retard the process

of age-related degenerative diseases, such as cancer, cardiovascular diseases, immune system decline, and brain dysfunction [58].

The phytochemical analysis of *H. courbaril* revealed the presence of phenolic compounds, such as tannins, flavonoids, and procyanidins, as well as essential oils and terpenes [15,19,21].

Several studies have demonstrated that phenolic compounds exhibit various physiological activities [59,60], tannins have antigenotoxic effects [61,62], and flavonoids have been shown to scavenge reactive oxygen species [63], inhibit tumor cell growth, induce apoptosis, and exert anti-carcinogenic effects [64,65]. The antioxidant activity of flavonoids may both inactivate lipid peroxidation and reactive oxygen species and also have an indirect effect on *in vivo* endogenous antioxidant systems [66,67]. Terpenes are a major group of chemicals present in plants and they have been shown to possess antioxidative properties particularly against lipid peroxidation [68]. Therefore, the antigenotoxic activity detected in our experiment might be mediated, at least partially, by the action of flavonoids, tannins, and/or terpenes.

5. Conclusion

In conclusion, the present results indicate that Hycs was not toxic, recombinogenic, or genotoxic at the doses tested. Additionally, it protected cells against the genotoxic effects of MMC in mouse bone marrow cells and DXR in *D. melanogaster* somatic cells. The two assays used in the present work clearly indicated that Hycs is an efficient modulator of genotoxic action and could be used in primary health care.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

- [1] G. Samuelsson, Drugs of natural origin: a textbook of pharmacognosy. fifth ed., Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, 2004.
- [2] V. Marques, A. Farah, Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions, Food Chem. 113 (2009) 137061376.
- [3] I. Meijerman, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, Herbódrug interactions in oncology: focus on mechanisms of induction, Oncologist 11(2006) 7426752.
- [4] D.G. Pereira, L.M.G. Antunes, U. Graf, M.A. Spanó, Protection by *Panax ginseng* C.A. Meyer against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, Genet. Mol. Biol. 31(2008) 9476955.
- [5] J.B. Vilar, P.H. Ferri, L. Chen-Chen, Genotoxicity investigation of araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test, Braz. J. Biol. 71 (2011) 1976202.
- [6] E.R. Almeida, Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos, Hemus, São Paulo, 1993.
- [7] L.R. Ferguson, M. Philpott, N. Karunasinghe, Dietary cancer and prevention using antimutagens, Toxicology 198 (2004) 1476159.
- [8] S. De Flora, L.R. Ferguson, Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents, Mutat. Res. 591 (2005) 8615.
- [9] Y.H. Siddique, G. Ara, T. Beg, M. Faisal, M. Ahmad, M. Afzal, Antigenotoxic role of *Centella asiatica* L. extract against cyproterone acetate induced genotoxic damage in cultured human lymphocytes, Toxicol. In Vitro 22 (2008) 10617.
- [10] M.R. Silva, M.S. Silva, K.A. Martins, S. Borges, Utilização tecnológica dos frutos de jatobá-do-cerrado e de jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares, Ciênc. Tecnol. Aliment. 21 (2001) 1766182.
- [11] H. Lorenzi, F.J.A. Matos, Plantas medicinais no Brasil, Plantarum, Nova Odessa, 2002.
- [12] L.R.S. Gazzaneo, R.F.P. Lucena, U.P. Albuquerque, Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in a region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil), J. Ethnobiol. Ethnomed. 1 (2005) 9.
- [13] A.L. Gonçalves, A. Alves Filho, H. Menezes, Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas arvores nativas, Arq. Inst. Biol. 72 (2005) 3536358.

- s, J.M. Barbosa Filho, Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil, *Rev. Bras. Farmacogn.* 17 (2007) 1146140.
- [15] R.T. Nogueira, G.J. Shepherd, A. Laverde Jr., A.J. Marsaioli, P.M. Imamura, Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*, *Phytochemistry* 58 (2001) 115361157.
- [16] M.C.A. Neves, P.C.A. Neves, J.C. Zanini Jr., Y.S. Medeiros, R.A. Yunes, J.B. Calixto, Analgesic and anti-inflammatory activities of the crude hydroalcoholic extract obtained from the bark of *Hymenaea martiana*, *Phytother. Res.* 7 (1993) 3566362.
- [17] Y.K. Chang, M.R. Silva, L.C. Gutkoski, L. Sebio, M.A.A.P. Silva, Development of extruded snacks using jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart) flour and cassava starch blends, *J. Sci. Food Agric.* 78 (1998) 59666.
- [18] M. Miyake, K. Ide, K. Sasaki, Y. Matsukura, K. Shijima, D. Fujiwara, Oral administration of highly oligomeric procyanidins of Jatoba reduces the severity of collagen induced arthritis, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72 (2008) 178161788.
- [19] E. R. Martins, D. M. Castro, D. C. Castellani, J. E. Dias, Plantas medicinais, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.
- [20] K.Y. Park, G.O. Jung, K.T. Lee, J. Choi M.Y. Choi, G.T. Kim, H.J. Jung, H.J. Park, Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*, *J. Ethnopharmacol.* 90 (2004) 73679.
- [21] J.C.D. Aguiar, Estudo fitoquímico e biológico de *Hymenaea courbaril* L., Master's Dissertation, Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2009.
- [22] J.A. Heddle, A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, *Mutat. Res.* 18 (1973) 1876190.
- [23] U. Graf, F.E. Würgler, A.J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall, P.G. Kale, Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagen.* 6 (1984) 1536188.
- [24] Z. Ouanes, S. Abid, I. Ayed, R. Anane, T. Mobio, E.E. Creppy, H. Bacha, Induction of micronuclei by Zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of vitamin E, *Mutat. Res.* 538 (2003) 63670.
- [25] G. Krishna, M. Hayashi, *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation, *Mutat. Res.* 455 (2000) 1556166.
- [26] U. Graf, H. Frei, A. Kägi, A.J. Katz, F.E. Würgler, Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test, *Mutat. Res.* 222 (1989):3596373.

, Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.* 271 (1992) 59667.

[28] M.A. Spanó, H. Frei, F.E. Würgler, U. Graf, Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test, *Mutagenesis* 16 (2001) 3856394.

[29] H.H.R. Andrade, M.L. Reguly, M. Lehmann, Wing somatic mutation and recombination test (SMART), in: D.S. Henderson (Ed.), *Drosophila cytogenetics protocols*, Humana Press, Totowa, 2004, 3896412.

[30] W. Schmid, The micronucleus test, *Mutat. Res.* 31 (1975) 9615.

[31] D. Dapkus, D.J. Merrell, Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*, *Genetics* 87 (1977) 6856697.

[32] I. Hällström, A. Blanck, Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P-450-dependent reactions. *Chem. Biol. Interact.* 56 (1985) 1576171.

[33] C. Saner, B. Weibel, F.E. Würgler, C. Sengstag, Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*, *Environ. Mol. Mutagen.* 27 (1996) 46658.

[34] D.L. Lindsley, G.G. Zimm, *The genome of Drosophila melanogaster*, Academic Press, San Diego, 1992.

[35] H. Frei, J. Clements, D. Howe, F.E. Würgler, The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.* 279 (1992) 21633.

[36] H. Frei, F.E. Würgler, Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*, *Mutat. Res.* 334 (1995) 2476258.

[37] H. Frei, F.E. Würgler, Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result, *Mutat. Res.* 203 (1988) 2976308.

[38] M.A. Kastenbaum, K.O. Bowman, Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat. Res.* 9 (1970) 5276549.

[39] U. Graf, Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Experientia* 51 (1995) 1686173.

nototoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination, *Mutagenesis* 9 (1994) 3836386.

[41] S.K. Abraham, U. Graf, Protection by coffee against somatic genotoxicity in *Drosophila*: role of bioactivation capacity, *Food Chem. Toxicol.* 34 (1996) 1614.

[42] H. Frei, F.E. Würzler, Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*, *Mutagenesis* 11 (1996) 3156325.

[43] U. Graf, O.S. Heo, O. Olvera Ramirez, The genotoxicity of chromium(VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination, *Mutat. Res.* 266 (1992) 1976203.

[44] M. Hayashi, J.T. MacGregor, D.G. Gatehouse, I.D. Adler, D.H. Blakey, S.D. Dertinger, G. Krishna, T. Morita, A. Russo, S. Sutou, *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay.II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 2346252.

[45] M.F. Salamone, J.A. Heddle, The bone marrow micronucleus assay: rationale for a revised protocol, in: FJ Serres (ed.), *Chemical mutagens: principles and methods for their detection*, v. 8, Plenum Press, New York, 1983, pp 1116149.

[46] U. Graf, M.A. Spanó, J. Guzmán-Rincón, S.K. Abraham, H.H.R. Andrade, The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity, *Afr. Newsl. Occup. Health Saf.* 6 (1996) 9613.

[47] E.W. Vogel, U. Graf, H.J. Frei, M.M.J. Nivard, The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens, *IARC Sci. Publ.* 146 (1999) 4276470.

[48] M. Lehmann, A. Franco, K.S.P. Vilar, R.M. Lukza, H.H.R. Andrade, Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res.* 539 (2003) 1676175.

[49] P.E. Hartman, D.M. Shankel, Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules, *Environ. Mol. Mutagen.* 15 (1990) 1456182.

[50] S. De Flora, M. Bagnasco, H. Vainio, Modulation of genotoxic and related effects by carotenoids and vitamin A in experimental models: mechanistic issues, *Mutagenesis* 14 (1999) 1536172.

rd, A.T. Pickering, Therapeutic applications of medicinal plants in the treatment of breast cancer: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability, *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.* 19 (2000) 2236240.

[52] Y.H. Kang, K.A. Lee, C.J. Ryu, H.G. Lee, J.S. Lim, S.N. Park, S.G. Paik, D.Y. Yoon, Mitomycin C induces apoptosis via Fas/FasL dependent pathway and suppression of IL-18 in cervical carcinoma cells, *Cancer Lett.* 237 (2006) 33644.

[53] J.P. Kehrer, Free radicals as mediators of tissue injury and disease, *Crit. Rev. Toxicol.* 23 (1993) 21648.

[54] M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C.J. Rhodes, J. Telser, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol. Cell. Biochem.* 266 (2004) 37656.

[55] L.J. Marnett, Oxyradicals and DNA damage, *Carcinogenesis* 21 (2000) 3616370.

[56] R. Olinski, D. Gackowski, M. Foksinski, R. Rozalski, K. Roszkowski, F. Jaruga, Oxidative DNA damage: assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 1926200.

[57] N.G. Baydar, G. Özkan, S. Ya ar, Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts, *Food Control* 18 (2007) 113161136.

[58] T. Finkel, N.J. Holbrook, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature* 408 (2000) 2396247.

[59] O.I. Aruoma, Neuroprotection by dietary antioxidants: new age of research, *Nahrung.* 46 (2002) 3816382.

[60] B.C. Araújo, Efeito protetor do chá verde (*Camellia sinensis*) contra a ação genotóxica da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, Master's Dissertation, Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Belo Horizonte, 2008.

[61] J.H. Weisburger, Y. Hara, L. Dolan, F.Q. Luo, B. Pittman, E. Zang, Tea polyphenols as inhibitors of mutagenicity of major classes of carcinogens, *Mutat. Res.* 371 (1996) 57663.

[62] E.G. Mejía, E.C. Castaño-Tostado, G. Loarca-Pinã, Antimutagenic effects of natural phenolic compounds in beans, *Mutat. Res.* 441 (1999) 169.

[63] J. Manosroi, P. Dhumtanom, A. Manosroi, Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines, *Cancer Lett.* 235 (2006) 1146120.

son, Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack *in vitro*, *Eur. J. Nutr.* 38 (1999) 28634.

[65] T. Yokozawa, C.P. Chen, E. Dong, T. Tanaka, G.I. Nonaka, G.I. Nishioka, Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Biochem. Pharmacol.* 56 (1998) 2136222.

[66] K. Yang, S.A. Lamprecht, Y. Liu, H. Shinozaki, K. Fan, D. Leung, H. Newmark, V.E. Steele, G.J. Kelloff, M. Lipkin, Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon, *Carcinogenesis* 21 (2000) 165561660.

[67] J. Hong, T.J. Smith, C.T. Ho, D.A. August, C.S. Yang, Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues, *Biochem. Pharmacol.* 62 (2001) 117561183.

[68] J. Grassmann, S. Hippeli, E.F. Elstner, Plantø defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress, *Plant Physiol. Biochem.* 40 (2002) 4716478.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente estudo avaliou as atividades tóxica, citotóxica, genotóxica e antigenotóxica da Seiva de *Hymenaea courbaril* L. pelo teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos e em células somáticas de *Drosophila melanogaster* pelo teste SMART/ asa e os resultados obtidos permitiram concluir que:

- I) A seiva de *Hymenaea courbaril* não apresentou efeito citotóxico em células de medula óssea de camundongos;
- II) A seiva de *Hymenaea courbaril* não apresentou efeito clastogênico e/ou aneugênico em células de medula óssea de camundongos;
- III) A seiva de *Hymenaea courbaril* apresentou atividade anticitotóxica, anticlastogênica e/ou antianeugênica em células de medula óssea de camundongos;
- IV) A seiva de *Hymenaea courbaril* não apresentou efeito tóxico em células somáticas de *Drosophila melanogaster*;
- V) A seiva de *Hymenaea courbaril* não apresentou efeito mutagênico e/ou recombinogênico em células somática de *Drosophila melanogaster*;
- VI) A seiva de *Hymenaea courbaril* apresentou atividade antimutagênica e antirecombinogênica em células somáticas de *D. melanogaster*.

Dessa forma, os dois ensaios utilizados no presente trabalho indicaram que a Seiva de *Hymenaea courbaril* é um potente modulador da ação genotóxica de agentes clastogênicos, aneugênicos, mutagênicos e/ou recombinogênicos. Espera-se com este trabalho contribuir como base para outros trabalhos sobre *Hymenaea courbaril* que ofereçam formas de uso mais seguras para cuidados básicos a saúde.