

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA**

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO, MUTAGÊNICO,
ESTROGÊNICO E ANTIBACTERIANO DE FLAVONOIDES**

FLÁVIA APARECIDA RESENDE

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Eliana Aparecida Varanda

Araraquara – SP

2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA**

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO, MUTAGÊNICO,
ESTROGÊNICO E ANTIBACTERIANO DE FLAVONOIDES**

FLÁVIA APARECIDA RESENDE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, área de concentração: Mutagênese, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliana Aparecida Varanda

Araraquara – SP

2011

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Resende, Flávia Aparecida
R433e Estudo do potencial antimutagênico, mutagênico, estrogênico e
antibacteriano de flavonoides / Flávia Aparecida Resende. – Araraquara,
2011
158 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Eliana Aparecida Varanda

1. Flavonoides. 2. Mutagenicidade. 3. Estrogenicidade. 4. Atividade
antibacteriana. I. Varanda, Eliana Aparecida, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Apresentação

“Talvez a razão por quê todas as portas se fecharam, seja pra você poder abrir uma que te levará ao rumo perfeito” (Katy-Perry)

*Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de
Mutagênese do Departamento de Ciências Biológicas da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade
Estadual Paulista (UNESP) - Campus de Araraquara-SP*

Dedicatoria

“E se por acaso a dor chegar

Ao teu lado vão estar

Pra te acolher e te amparar

Pois não há nada como um lar”

(trecho da música Tua Família – Anjos de Resgate)

Ao meu pai, Ilton (*in memoriam*),

que vi sofrendo amargamente as dores dessa terrível doença, lutando pela vida com fé e esperança e, mesmo assim, me incentivando a continuar assistindo as aulas de Genética do Câncer. A partir deste momento, sei que meu caminho foi traçado por Deus e decidi que seria mais uma pessoa a dar uma pequena contribuição do que poderia proteger e/ou danificar o DNA. A minha dedicação a mutagênese foi por você Pai e a tantas outras pessoas que sofreram e ainda sofrem por causa do câncer.

À minha mãe, Edina,

que me ensinou o quanto é necessário o conhecimento. Uma guerreira, que sempre cuidou de mim com um amor incondicional. Que me apoiou, acreditou no meu potencial, que não me ensinou a desistir e que me sustentou principalmente financeiramente quando muitos diziam que não teria mais condição. Que doou e se sacrificou inúmeras vezes colocando em primeiro lugar o meu bem-estar. Mãe, vendo você, uma mulher com garra que vive provações todos os dias e que mesmo cansada das tribulações do dia-a-dia tem forças para acolher quem precisa com um sorriso e uma palavra amiga, eu aprendo como ser humano. Você é meu maior exemplo!

Agradecimentos

*“A realização profissional, os títulos acadêmicos
e o dinheiro só terão valor se houver harmonia
na família, afinidade entre os amigos, serenidade
no amor e paz de espírito”*

À LUZ DIVINA de JESUS CRISTO que iluminou meu caminho e permitiu que eu chegasse até aqui;

À Professora ELIANA APARECIDA VARANDA, minha orientadora, por ter acreditado e me acolhido como orientanda. Obrigada pelo conhecimento compartilhado sobre ciência e sobre vida. Obrigada por sempre me incentivar a buscar meios para eu atingir meus objetivos na vida profissional e principalmente na vida pessoal. Obrigada pela confiança e paciência. Foi muito gratificante fazer parte do seu grupo de pesquisa!

À Professora DENISE CRISPIM TAVARES por ter me iniciado na pesquisa e me indicado ao doutoramento com a Professora Eliana Varanda. Você ajudou a construir o alicerce da minha vida profissional. Serei eternamente grata por tudo que me ensinou;

À Professora TAÍS BAUAB por ceder o laboratório para eu fazer os testes de atividade antibacteriana e muito mais importante que isso por acreditar em mim e por me lembrar que eu posso ser mais diante das dificuldades da vida. Obrigada “Chefa do Léo” por ouvir meus choros e risos, por me aconselhar e pelos vários momentos de descontração;

Aos Professores André Gonçalves dos Santos e Lusânia Greggi Antunes, por terem aceitado compor a Banca Examinadora do Exame de Qualificação deste trabalho, cujas sugestões o engrandeceram significativamente;

Aos professores da FCFar-UNESP pelos conhecimentos acadêmicos, técnicos e científicos aprendidos durante as disciplinas e estágios em docência;

Sou grata também à minha família a quem devo grande parte de quem eu sou e por terem me ensinado o significado de valores humanos inestimáveis, os quais trago sempre em minha vida. A minha mãe Edina, que me ensinou que vale a pena lutar por um sonho; ao meu padrasto Adilar, que sempre me lembrou que o estresse e cobrança constante fazem mal a saúde e que momentos de tranquilidade principalmente com a natureza rejuvenesce a alma; aos meus irmãos Junior e Itale (minha preta), meu amor por vocês é incondicional, são vocês que deixam a minha vida mais alegre e é muito bom ver a pessoa que vocês estão se tornando; aos meus irmãos de coração Taismara (minha branca), Douglas e Alessandro por nunca se esquecerem da importância de uma

família e por ajudarem a manter a nossa em harmonia. Agradeço todos vocês por terem me incentivado, contribuindo em todos os sentidos na minha formação. Amo muito todos vocês!

À família Gorla Nogueira: João Roberto, Angela, Camila Gorla, Léo, Caio e a sua esposa Camila. Foi muito bom conquistar cada um de vocês e hoje agradeço por terem me acolhido. É com vocês que aprendo a PALAVRA DE DEUS e com certeza isso me faz sentir uma pessoa muito melhor. Que o ESPIRITO SANTO proteja vocês e nos faça viver em paz e alegria;

Às companheiras de jornada, as meninas do laboratório de Mutagênese da FCFar-UNESP: Mariana Santoro, Ana Paula Oliveira, Paula Boldrim, Lívia Espanha, Aline Miranda e Juliana Ferreira. Cada uma de vocês me ajudou de alguma maneira, fazendo com que eu amaduresse e aprendesse. Agradeço em especial a graduanda Carolina, cuja colaboração foi de extrema importância;

Ao meu amigo Dr. Marcelo Gonzaga Freitas Araújo. Chegamos juntos neste lugar, vi você construindo sua história entre tantos desafios e concretizando o sonho de ser Doutor. Agora é minha vez! Sei que está muito feliz por mim e te agradeço MUITO por todo carinho que sempre teve por mim. Sucesso e sorte para você!

À Margarete, Marisa, Néia e Sílvia, por serem tão disponíveis e solícitas em ajudar;

Às funcionárias da seção de pós-graduação, pela orientação e atenção que sempre me foi dada;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, pela oportunidade de concretizar esse trabalho;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior) pela concessão da bolsa de estudo;

E por ultimo, mas uma das pessoas mais importantes, eu quero agradecer Leonardo Gorla Nogueira que é um anjo na minha vida, que está comigo quando penso que nem eu mesma estou. Um anjo que me protege, que me cuida e que me defende. Um anjo que me diz como melhorar, que possui o sorriso mais lindo do mundo e que sabe me fazer sorrir! Com você minha carga ficou mais leve e por isso quero dividir todos os outros momentos importantes na minha vida.

Agradeço à todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho. Acredito que ninguém consegue nada sozinho e que sempre existem em nossas vidas pessoais especiais e passantes que não menos importantes, nos ajudam a trilhar nossos caminhos. E cabe a nós agradecermos e quando possível e necessário ajudar, assim como fomos ajudados.

Muito obrigado a todos!!

“A sabedoria da vida não está em fazer aquilo que se gosta, mas gostar daquilo que se faz.”

Leonardo da Vinci

CAPÍTULO I

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Flavonoides.....	25
1.2. Mutagenicidade e antimutagenicidade.....	30
1.3. Teste de Ames.....	35
1.4. Interferentes endócrinos.....	37
1.5. Ensaio de estrogénicidade <i>in vitro</i> (RYA e <i>E-screen</i>).....	42
1.6. Atividade antibacteriana.....	46

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral.....	49
2.2. Objetivos Específicos.....	49

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Substâncias-teste.....	51
3.2. Teste de Ames.....	51
3.2.1. Linhagens de <i>S. typhimurium</i>	51
3.2.2. Verificação das características genéticas das cepas de <i>S. typhimurium</i>	52
3.2.3. Manutenção e estoque das cepas de <i>S. typhimurium</i>	52
3.2.4. Preparo dos inóculos de <i>S. typhimurium</i>	52
3.2.5. Meios de cultura e soluções.....	52
3.2.6. Preparo da mistura S9.....	53

3.2.7. Ensaio de mutagenicidade.....	53
3.2.8. Análise dos resultados.....	54
3.2.9. Ensaio de antimutagenicidade.....	55
3.2.10. Teste de viabilidade.....	57
3.3. Ensaio com leveduras recombinantes (RYA).....	57
3.3.1. Linhagem e plasmídeos.....	57
3.3.2. Meios de cultura e soluções.....	58
3.3.3. Preparo dos inóculos de <i>S. cerevisiae</i>	58
3.3.4. Controles.....	58
3.3.5. Ensaio de estrogénicidade (RYA).....	58
3.3.6. Cálculo de equivalentes de estradiol (EEQ).....	60
3.4. Ensaio de proliferação celular (<i>E-screen</i>).....	60
3.4.1. Linhagem celular.....	60
3.4.2. Meios de cultura e soluções.....	61
3.4.3. Tripsinização das culturas celulares.....	61
3.4.4. Preparo dos estoques celulares.....	62
3.4.5. Descongelamento dos estoques celulares.....	62
3.4.6. Remoção dos estrógenos endógenos.....	62
3.4.7. Preparo das substâncias-teste.....	63
3.4.8. Ensaio de citotoxicidade.....	63
3.4.9. Ensaio de estrogénicidade e antiestrogénicidade (<i>E-screen</i>).....	64
3.4.10. Ensaio colorimétrico da sulforodamina B.....	65
3.4.11. Análise dos resultados.....	65
3.5. Atividade antibacteriana.....	66
3.4.1. Preparo das substâncias.....	66
3.4.2. Meios de cultura e soluções.....	66
3.4.3. Amostras bacterianas.....	67
3.4.4. Estocagem e manutenção das amostras bacterianas.....	67
3.4.5. Padronização da suspensão bacteriana.....	67
3.4.6. Controle positivo.....	68
3.4.7. Ensaio de atividade antibacteriana.....	68
3.4.8. Leitura espectrofotométrica.....	69

4. RESULTADOS

4.1. Atividade mutagênica.....	72
4.2. Atividade antimutagênica.....	76
4.3. Atividade estrogênica (RYA).....	83
4.4. Atividade estrogênica e antiestrogênica (<i>E-screen</i>).....	84
4.5. Atividade antibacteriana.....	89
4.6. Resumo dos resultados.....	93

5. DISCUSSÃO

5.1. Atividade mutagênica.....	95
5.2. Atividade antimutagênica.....	99
5.3. Atividade estrogênica.....	105
5.4. Atividade antibacteriana.....	112

6. CONCLUSÕES

6.1. Atividade mutagênica.....	117
6.2. Atividade antimutagênica.....	117
6.3. Atividade estrogênica.....	118
6.4. Atividade antibacteriana.....	119
6.5. Geral.....	120

7. REFERÊNCIAS.....	122
----------------------------	------------

ANEXOS

ANEXO I.....	151
ANEXO II.....	155
ANEXO III.....	157
ANEXO IV.....	158

CAPÍTULO II

“Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (Ames) test”...	160
---	-----

Capítulo I

*“Em cada hoje se cria um episódio novo,
Em cada ontem um capítulo que fica marcado,
Em cada amanhã é algo que nunca se sabe,
mas poderá ser um novo capítulo
ou um novo rumo na história da vida.”
(Paula Santos – blog: Viva sem sentido)*

RESENDE, Flávia Aparecida. “Estudo do potencial antimutagênico, mutagênico, estrogênico e antibacteriano de flavonoides”. Defesa (Doutorado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, SP.

Os flavonoides exibem uma multiplicidade de atividades biológicas tanto *in vivo* como *in vitro*. No entanto, não existem dados suficientes para fornecer provas conclusivas sobre os efeitos benéficos da maioria das subclasses de flavonoides. Dessa maneira, neste estudo tornou-se relevante avaliar a mutagenicidade, antimutagenicidade, estrogenicidade e atividade antibacteriana dos flavonoides, com o objetivo de traçar o perfil relação estrutura-atividade, uma vez que a atividade biológica dos flavonoides depende da sua estrutura química. A mutagenicidade e antimutagenicidade foram avaliadas pelo teste de Ames, em cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 e TA102, com e sem ativação metabólica. Para comparação do efeito protetor dos flavonoides foram utilizados 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (NPD), azida sódica (AZS) e mitomicina C (MMC) como mutágenos de ação direta e benzo[*a*]pireno (B[*a*]P), aflatoxina B₁ (AFB₁) e 2-aminoantraceno (2-AA) como mutágenos de ação indireta. A atividade estrogênica foi avaliada por meio do ensaio com leveduras recombinantes (RYA - *Recombinant Yeast Assay*) e pelo ensaio de proliferação de células de câncer de mama humano (MCF-7/BUS) responsivas à estrógeno (*E-screen*). A determinação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada neste estudo utilizando a técnica de diluição em microplacas, com as bactérias *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Os compostos avaliados foram: quercetina, kaempferol, luteolina, fisetina, crisina, galanina, flavona, 3-hidroxi-flavona, 5- hidroxi-flavona e 7- hidroxi-flavona. No teste de Ames, a quercetina mostrou-se diretamente mutagênica na linhagem TA98 e antimutagênica contra as mutações induzidas pelo NPD. Além disso, sua mutagenicidade também foi evidente em presença de ativação metabólica na linhagem TA98, TA100 e TA102, enquanto que na linhagem TA102 foi capaz de reduzir o número de revertentes induzidos pelo 2-AA. O kaempferol e a galangina apresentaram atividade mutagênica na linhagem TA98 após ativação metabólica. Entretanto, ambos exibiram um efeito protetor contra NPD, B[*a*]P e AFB₁, enquanto que o kaempferol ainda foi antimutagênico contra MMC e a galangina foi capaz de reduzir as mutações induzidas pelo 2-AA na linhagem TA102. Nenhum dos outros compostos demonstraram atividade mutagênica, mas foram antimutagênicos em mais de uma linhagem e eficientes por diferentes mecanismos de ação, indicando que o número de hidroxilas e a posição desses grupos funcionais podem, aumentar ou diminuir o efeito de proteção, dependendo do tipo e concentração dos flavonoides e mutágeno usado. Com relação a atividade estrogênica, o kaempferol mostrou-se ser o único flavonoide com atividade estrogênica mediada pela interação direta ao receptor de estrógeno (RE), além de atuar como um agonista total pela estimulação da proliferação

de células MCF-7/BUS. Os outros compostos não apresentaram níveis detectáveis de estrogenicidade nas condições utilizadas no teste RYA. No entanto, no ensaio *E-screen* compostos como a galangina, luteolina e fisetina também estimularam a proliferação de células MCF-7/BUS, atuando dessa maneira como agonistas parciais. Na avaliação da antiestrogenicidade, os compostos quercetina, crisina e 3-hidroxi-flavona inibiram estatisticamente a proliferação celular induzida pelo 17- β -estradiol no ensaio *E-screen*, indicando que esses compostos podem atuar como antagonista do 17- β -estradiol. Os resultados obtidos na determinação da atividade antibacteriana mostram que a cepa de *S. aureus* foi mais sensível aos diferentes flavonoides, sendo o kaempferol o composto mais ativo. Com relação à cepa de *E. coli*, os compostos avaliados não inibiram completamente o crescimento bacteriano, apenas reduziram a porcentagem das células Gram-negativas nas condições utilizadas neste trabalho. Esses estudos contribuem para esclarecer os mecanismos pelos quais esses compostos agem nas atividades avaliadas, na segurança e eficácia antes que eles possam ser amplamente utilizados em benefício.

Palavras-chave: flavonoides; mutagenicidade; estrogenicidade; atividade antibacteriana

ABSTRACT

RESENDE, Flávia Aparecida. "Study of the antimutagenic, mutagenic, estrogenic and antibacterial potential of flavonoids". Defesa (Doutorado em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, SP.

The flavonoids exhibit a wide range of biological activities both *in vivo* and *in vitro*. However, there are insufficient data to provide conclusive evidence on the health effects of most flavonoid subclasses. Thus, it is relevant to assess the mutagenicity, antimutagenicity, estrogenicity and antibacterial activity of flavonoids with the aim of tracing the structure-mutagenicity relationship profile, since the biological activity of flavonoids is governed by their chemical structure. The mutagenicity and antimutagenicity was assayed by the Ames test, with *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100 and TA102, carried out with and without metabolic activation. To compare the protective effect of flavonoids were used 4-nitro-*o*-phenylenediamine (NPD), sodium azide (AZS) and mitomycin C (MMC) as direct acting mutagens and benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P), aflatoxin B₁ (AFB₁) e 2-aminoanthracene (2-AA) as indirect acting mutagens. The estrogenic activity was assayed by recombinant yeast assay (RYA) and by proliferation assay of cells of human breast cancer (MCF-7/ BUS) responsive to estrogen (*E-screen*). The determination of antibacterial activity *in vitro* was performed in this study by technique of dilution in microplates, with the bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The evaluated compounds were: quercetin, kaempferol, luteolin, fisetin, chrysin, galangin, flavones, 3-hydroxyflavone, 5- hydroxyflavone and 7- hydroxyflavone. In the Ames test, quercetin was directly mutagenic in strain TA98 and antimutagenic against mutations induced by NPD. Moreover, its mutagenicity was also evident in the presence of metabolic activation in the strains TA98, TA100 and TA102, while in the strain TA102 was able to reduce the number of revertants induced by 2-AA. Kaempferol and galangin showed mutagenic activity in the strain TA98 after metabolic activation. However, both exhibited a protective effect against NPD, B[*a*]P and AFB₁, while kaempferol was still antimutagenic against MMC and galangin was able to reduce mutations induced by 2-AA in the strain TA102. None of the other compounds showed mutagenic activity, but were antimutagenic in more than one strain and efficient by different mechanisms of action, indicating that the number of hydroxyl groups and position these functional groups may increase or decrease the protective effect, depending on the type and concentration of flavonoids and mutagen used. With respect to estrogenic activity, kaempferol proved to be the only flavonoid with estrogenic activity mediated by direct interaction with estrogen receptor (ER), besides acting as a full agonist for stimulation of proliferation of cells MCF-7/BUS. The other compounds did not show detectable levels of estrogenicity under the conditions used in the RYA. However, in the *E-screen* assay compounds such as galangin, luteolin and fisetin also stimulated the proliferation of cells MCF-7/BUS, thus acting as partial agonists. In the evaluation of antiestrogenic,

the compounds quercetin, chrysin and 3-hydroxyflavone inhibited statistically the cell proliferation induced by 17- β -estradiol in the E-screen assay, indicating that these compounds may act as an antagonist of 17- β -estradiol. The results obtained in the determination of the antibacterial activity showed that the strain of *S. aureus* was more sensitive to different flavonoids, whereas kaempferol was the most active compound. With respect to the strain of *E.coli*, the compounds evaluated did not inhibited completely bacterial growth, only reduced the percentage of Gram-negative cells, under the conditions used in this work. These studies contribute to clarify the mechanisms by which these compounds act in the activities evaluated in the safety and efficacy before they might be widely used for the benefit.

Keywords: flavonoids; mutagenicity; estrogenicity; antibacterial activity.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- Abs – absorvância
- A, C, G, T – bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina e timina, respectivamente)
- AFB₁ - aflatoxina B₁
- AMG - ágar mínimo glicosado
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- ATV - tripsina/ versene
- AZS - azida sódica
- 2-AA - 2-aminoantraceno
- 2-AF - 2-aminofluoreno
- B[a]P - benzo[a]pireno
- bax, bcl -2 - produtos gênicos relacionados à apoptose
- BY4741 – linhagem de *Saccharomyces cerevisiae*
- CDC - Centros de Prevenção e Controle de Doenças
- CHCl₃ - clorofórmico
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CMH - caldo Müller-Hinton
- DMEM - *Dulbecco's modification of Eagle's medium*
- DMSO - dimetilsufóxido
- DNA - ácido desoxirribonucléico
- D.O. - densidade óptica
- DP – desvio padrão
- EC₅₀ - concentração efetiva mediana
- EP – efeito proliferativo
- EPA - Associação de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Association*)
- EPR - efeito proliferativo relativo
- EUA – Estados Unidos da América
- His – histidina
- IM – índice de mutagenicidade
- Leu – leucina
- MCF-7 – linhagem celular de câncer de mama (*Michigan Cancer Foundation*)

MeOH – metanólico

Met – metionina

MMC – mitomicina C

MuGal - 4-metilumbeliferil β - D –galactosídeo

NCCLS – *Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards*

NPD - 4-nitro-*o*-fenilenodiamina

OGG₁, XPD, Ni – enzimas de reparo

(·OH) – radical hidroxil

(OCH₃) – radical metoxil

(2 OHE₂) - 2-hidroxiestradiol

(4 OHE₂) - 4- hidroxiestradiol

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

pH5HE0; pVitBX2; pAAH5; pSFL Δ -178K – plasmídeos

p53, Rb – proteínas de controle do ciclo celular

RE - receptor de estrógeno

RE α - receptores α -estrogênico

RE β - receptores β -estrogênico

ROS - espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)

rpm – rotação por minuto

RYA – Ensaio com leveduras recombinantes (*Recombinant Yeast Assay*)

SERMs - Moduladores seletivos dos receptores de estrógenos (*Selective estrogen receptor modulators*)

SDS - dodecilo sulfato de sódio

S9 – fração microsomal de fígado de ratos tratados com Aroclor 1254

TA97a, TA98, TA100, TA102 e TA1535 – cepas de *Salmonella typhimurium*

T47D – linhagem de células epiteliais tumorais ductais de mama humano

UFC - unidades formadoras de colônias

Ura – uracila

UV – ultravioleta

YPD – *Yeast Nitrogen Base*

Y-PER – tampão de lise

	Pag.
Figura 1 – Estruturas químicas de flavonoides. A – Estrutura básica dos flavonoides (C6-C3-C6). B – Estado de oxidação e de saturação do anel C definindo os subgrupos de flavonoides (Fonte: MARTENS <i>et al.</i> , 2010).....	27
Figura 2 –Biossíntese dos flavonóides – CHS: chalcona sintetase; CHI: chalcona isomerase; FHT: flavanona 3-β-hidroxilase; DFR: dihidroflavonol-4-redutase; LDOX (ANS): antocianidina sintetase; FGT: flavonoide glicosiltransferase; FNS: flavona sintetase; FLS: flavonol sintetase; LAR: leucoantocianidina redutase; ANR: antocianidina redutase; IFS: isoflavona sintetase; HID: 2-hidroxiisoflavanona desidratase; F2H: flavanona 2-hidroxilase; HFD: 2-hidroxiiflavanona desidratase (Fonte: MARTENS <i>et al.</i> , 2010).....	28
Figura 3 - Resumo dos mecanismos diretos e indiretos dos mutágenos e outras moléculas que podem desempenhar um papel na carcinogênese.....	32
Figura 4 – Placas com <i>Salmonella typhimurium</i> (Teste de Ames).....	36
Figura 5 - Mecanismos de transdução de sinal promovidos por estrógenos endógenos e xenoestrógenos.....	39
Figura 6 – Disfunções endócrinas: a) resposta natural, b) efeito agonista, c) efeito antagonista.....	40
Figura 7 - Fotomicrografia óptica de células MCF-7.....	43
Figura 8 - Mecanismo de ação exercido pelo RYA.....	45
Figura 9 – Padrão de hidroxilação dos flavonóides avaliados.....	51
Figura 10 – Esquema do Teste de Ames.....	54
Figura 11 - Fotomicrografia óptica de <i>Staphylococcus aureus</i> (A) e <i>Escherichia coli</i> (B) (Coloração de Gram; aumento 1000x).....	67
Figura 12 – Esquema de organização das unidades experimentais empregadas no teste de micropalacas para avaliação da atividade antibacteriana dos flavonoides, frente aos micro-organismos.....	69
Figura 13 - Valores totais de estrogenicidade expressos em equivalentes de estradiol (EEQ).....	83
Figura 14 – Pontos lineares do aumento da fluorescência (em unidades de fluorescência) em relação ao tempo de diferentes concentrações de kaempferol no teste RYA. Os valores de atividade β-galactosidase foram calculados a partir da	

inclinação da reta por métodos de regressão linear. A fluorescência foi gravada por 20 minutos (uma medição por minuto).....	84
Figura 15 - Efeito antiestrogênico de diferentes concentrações dos flavonoides sobre a proliferação celular induzida pelo 17-β-estradiol (1×10^{-8} M). C+ = controle positivo (17-β-estradiol), C- = controle negativo (meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro livre de estrógenos), CS = controle solvente (0,01 % de DMSO, máxima concentração de solvente utilizada no teste), CM = controle do meio (meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal). *Significativamente diferente do controle positivo (one-way ANOVA, teste de Dunnett; $p \leq 0,05$).....	87
Figura 16 - Viabilidade de <i>S. aureus</i> tratado com os flavonoides em diferentes concentrações.....	89
Figura 17 - Viabilidade de <i>E. coli</i> tratada com os flavonoides em diferentes concentrações.....	90
Figura 18 - Viabilidade de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> tratados com cloridrato de ciprofloxacino em diferentes concentrações.....	90
Figura 19 – Isomerização quinona e quinona metide da quercetina.....	97
Figura 20 – Características estruturais responsáveis pela atividade antioxidante dos flavonoides.....	100
Figura 21 – Estrutura química do 17-β-estradiol.....	108
Figura 22 - Mecanismos pelos quais os flavonoides podem reduzir o número de unidades formadoras de colônia (UFC) (Fonte: CUSHNIE e LAMB, 2011).....	114

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1 – Estruturas químicas dos agentes mutagênicos utilizados.....	56
Tabela 2 - Atividade mutagência expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100 e TA102 de <i>S. typhimurium</i> tratadas com os flavonoides (quercetina, kaempferol, luteolina, fisetina, galangina, crisina, flavona, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona, 7-hidroxiflavona), em várias doses, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.....	73
Tabela 3 – Atividade antimutagência expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e a porcentagem de inibição na linhagem TA98 e TA100 de <i>S. typhimurium</i> tratadas com os flavonoides (quercetina, kaempferol, galangina, luteolina, fisetina, crisina, flavona, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona, 7-hidroxiflavona), em várias doses, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica...	77
Tabela 4 - Atividade antimutagência expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e a porcentagem de inibição na linhagem TA102 de <i>S. typhimurium</i> tratadas com os flavonoides (quercetina, kaempferol, galangina, luteolina, fisetina, crisina, flavona, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona, 7-hidroxiflavona), em várias doses, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.....	80
Tabela 5 – Atividade estrogênica expressa pela média e desvio padrão do efeito proliferativo (EP) e o valor do efeito proliferativo relativo (EPR) dos flavonoides (quercetina, kaempferol, galangina, luteolina, fisetina, crisina, flavona, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona, 7-hidroxiflavona), em diferentes concentrações avaliada pelo ensaio <i>E-screen</i>	85
Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos flavonoides (fisetina, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona, 7-hidroxiflavona, quercetina, flavona, kaempferol, luteolina, crisina e galangina) pela técnica de diluição em microplaca.	91
Tabela 7 – Resultados da avaliação da mutagenicidade (teste de Ames), antimutagenicidade (teste de Ames), estrogenicidade (RYA e <i>E-Screen</i>), antiestrogenicidade (<i>E-screen</i>) e potencial antibacteriano (microdiluição) dos flavonoides.....	93

1. *Introdução*

"Aqui, no entanto nós não olhamos para trás por muito tempo, nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas, porque somos curiosos, e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos.

Siga em frente."

Walt Disney

1.1. Flavonoides

O nome flavonoide é derivado de *flavus*, que significa amarelo, seu principal pigmento (PENGELLY, 2004). São compostos fenólicos, onipresentes na fotossíntese celular e responsáveis pela maior parte da coloração amarela, alaranjada, vermelha, violeta e azul de flores e frutos. Comumente, são encontrados em frutas, legumes, nozes, sementes, caules, flores, vinho, chá, própolis e mel, representando o grupo mais comum de compostos fenólicos na alimentação humana (CUSHNIE e LAMB, 2005; SPENCER *et al.*, 2009).

Os flavonoides são metabólitos secundários de plantas, de baixo peso molecular, com cerca de 10.000 variantes estruturais conhecidas, representando o terceiro maior grupo de produtos naturais, logo após dos alcalóides (≈ 12.000) e terpenóides (≈ 30.000) (MARTENS *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011). A diversidade de tamanho, forma tridimensional e propriedades físicas e bioquímicas dos flavonoides lhes permitem interagir com alvos em uma variedade de localizações subcelulares, para influenciar a atividade biológica em plantas, animais e micro-organismos (TAYLOR e GROTEWOLD, 2005; BUER *et al.*, 2010).

Nas flores, os flavonoides oferecem cores atrativas para polinizadores. Nas folhas, acredita-se que estes compostos são essenciais nas interações da planta com o meio ambiente, protegendo-a, por exemplo, contra fungos e radiação UV-B (CUSHNIE e LAMB, 2005). Evidências de estudos *in vivo* e *in vitro* têm sugerido que os flavonoides também são benéficos para a saúde humana e animal (LIN *et al.*, 2008).

Durante séculos, preparações contendo estes compostos como principais componentes ativos têm sido utilizadas para tratar doenças humanas (CUSHNIE e LAMB, 2005).

Os flavonoides exibem uma multiplicidade de atividades biológicas tanto *in vivo* como *in vitro*, tais como antioxidante, antibacteriana, antialérgica, vasodilatadora, hepatoprotetora, anticarcinogênica, estimulante imunológico, anti-inflamatória, antiviral e efeitos estrogênicos, bem como sendo inibidores de várias enzimas como a fosfolipase A2, ciclooxigenase, lipoxigenase, glutatona redutase e xantina oxidase (FERGUSON, 2001; RICE-EVANS *et al.*, 2001; CUSHNIE e LAMB, 2005; MOON *et al.*, 2006; GONZÁLEZ-GALLEGO *et al.*, 2010).

Devido a sua abundância em produtos alimentares e seus efeitos farmacológicos e nutricionais, os flavonoides são de grande interesse para o desenvolvimento de novos

fármacos e suplementos alimentares (CHEBIL *et al.*, 2007). No entanto, segundo Kay (2010) não existem dados suficientes para fornecer provas conclusivas sobre os efeitos benéficos da maioria das subclasses de flavonoides.

Estima-se que o consumo de flavonoides na dieta humana esteja entre 23 a 1000 mg/ dia (STOPPER *et al.*, 2005). De acordo com Chun *et al.* (2007) a ingestão média diária de flavonoides totais na dieta de adultos nos Estados Unidos é de 189,7 mg/ dia, sendo principalmente flavan-3-ols (83,5%), flavanonas (7,6%), flavonóis (6,8%), antocianidinas (1,6%), flavonas (0,8%) e isoflavonas (0,6%).

Em geral, a absorção dos flavonoides glicosilados é baixa, necessitando hidrólise prévia para a sua forma aglicona para poderem ser absorvidos (DAY *et al.*, 1998, GEE *et al.*, 1998). Quando ingerimos flavonoides glicosilados, a β -ligação desses açúcares resiste à hidrólise pelas enzimas pancreáticas, sendo a microbiota intestinal responsável pela quebra das ligações glicosídicas (HEIM *et al.*, 2002).

A biodisponibilidade dos flavonoides é extremamente baixa, variando em torno de 3 a 5%, apesar da quantidade de flavonoides consumidos na dieta humana (COLDHAM *et al.*, 2002). A distribuição destes compostos no organismo é complexa, sendo extensivamente metabolizados no intestino e fígado e os metabólitos formados são excretados pela urina e fezes (ABRAHAMSE *et al.*, 2005; SPENCER *et al.*, 2009).

Liu e Hu (2002) demonstraram que genisteína e apigenina, uma isoflavona e uma flavona respectivamente, eram bem absorvidas no intestino e que sua absorção não era a causa da sua baixa disponibilidade e sim o intenso metabolismo sofrido por esses flavonoides.

Por outro lado, Zhu *et al.* (2000) relataram que apesar da baixa disponibilidade obtida após a administração oral e intravenosa de catequinas, esses flavonoides permanecem na circulação por um longo período. Além disso, flavonas metiladas têm uma biodisponibilidade oral superior, bem como um maior acúmulo tecidual do que as suas correspondentes estruturais não-metiladas (WALLE *et al.*, 2007).

Resumidamente, a atividade dos flavonoides *in vivo* é dependente da absorção intestinal, sendo este seguido por reações metabólicas e interação subsequente com tecidos-alvo (HAMADA *et al.*, 2010).

Do ponto de vista químico, a estrutura básica de um flavonoide (Fig. 1A) consiste de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C6 – C3 – C6), que são denominados A, C e B (PIETTA, 2000). Este esqueleto molecular é derivado benzo- γ -pirona (MAURICH *et al.*, 2004), contendo os dois anéis aromáticos, os anéis A e B,

sendo que o anel C, o qual contém o grupamento pirona, não é aromático e apresenta-se sob diferentes estados de oxidação, em especial entre as posições 2 e 3 (SIMÕES *et al.*, 2007). O anel A possui o grupo benzoil e hidroxilas predominantemente nas posições 5 e 7, enquanto o anel B possui o grupo cinamoil e as hidroxilas nas posições 3', 4' e 5' (BRAVO, 1998; ROSS e KASUM, 2002). Algumas dessas hidroxilas são frequentemente metiladas, acetiladas ou sulfatadas. Quando glicosídeos são formados, a ligação glicosídica é normalmente nas posições 3 ou 7, e os carboidratos são comumente L-ramnose, D-glicose, glucoramnose, galactose ou arabinose. A prenilação usualmente ocorre diretamente no átomo de carbono nos anéis aromáticos, mas a O-prenilação também tem sido encontrada (HAVSTEEN, 2002).

Os flavonoides podem ser divididos em vários subgrupos com base no grau de oxidação do anel C, padrão de hidroxilação da estrutura do anel e do substituinte na posição 3 (DUARTE SILVA *et al.*, 2000; SPENCER *et al.*, 2009). Entre as muitas subclasses de flavonoides estão as flavanonas (dihidroflavonas), dihidroflavonóis, flavan-3,4-dióis, antocianidinas, flavonas, flavonóis, flavan-3-óis, proantocianidinas e isoflavonas (Fig. 1B) (MARTENS *et al.*, 2010).

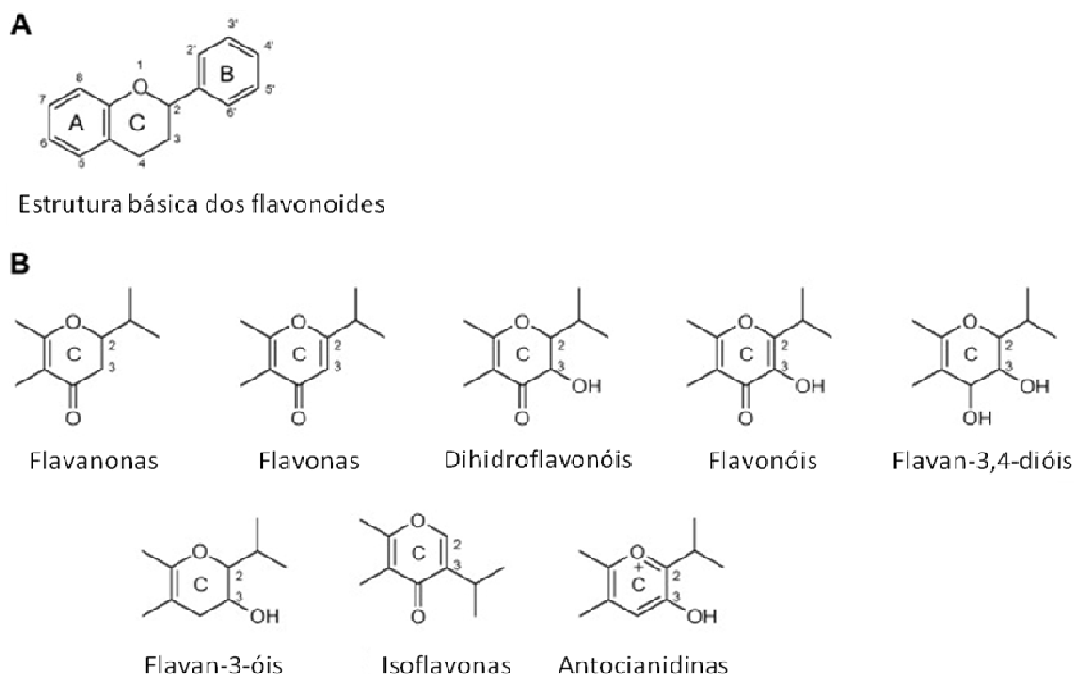


Figura 1 - Estruturas químicas de flavonoides. A – Estrutura básica dos flavonoides (C6-C3-C6). B – Estado de oxidação e de saturação do anel C definindo os subgrupos de flavonoides (Fonte: MARTENS *et al.*, 2010).

Os flavonoides são sintetizados como parte da via metabólica de fenilpropanóides, sendo considerados produtos de origem biossintética mista, devido ao envolvimento das vias do ácido chiquímico (ou chiquimato) e do acetato-malonato (ROSS e KASUM, 2002; MARTENS *et al.*, 2010). A via do ácido chiquímico origina o ácido cinâmico e seus derivados (ácidos cafeico, ferúlico, sinápico, etc) com nove átomos de carbono (C₉), na forma de coenzima A, e a via do acetato origina um tricetídeo com seis átomos de carbono (C₆); a condensação de um destes derivados de ácido cinâmico com o tricetídeo gera uma chalcona com quinze átomos de carbono, que é o precursor inicial de toda a classe dos flavonoides (Fig. 2). A partir da chalcona, todos os demais derivados flavonoídicos são formados (FERRER *et al.*, 2008).

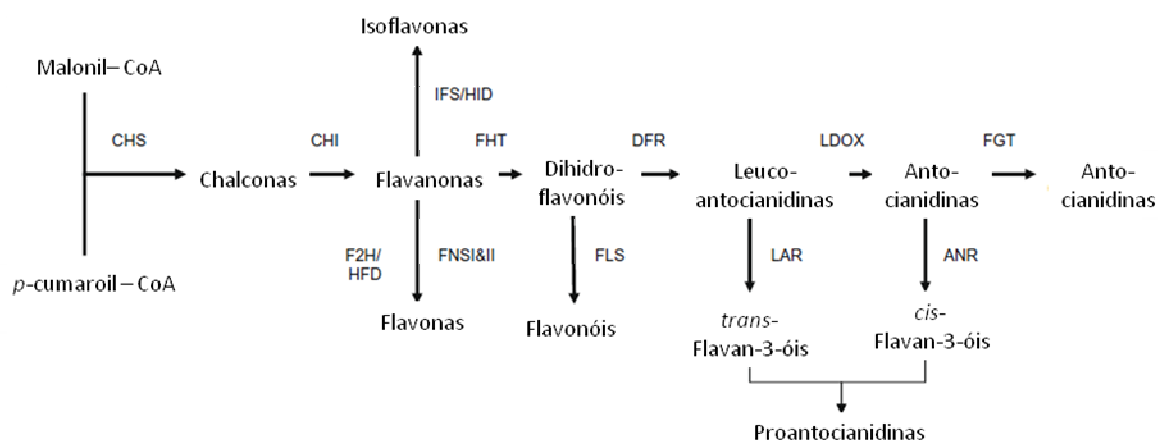


Figura 2 – Biossíntese dos flavonóides – CHS: chalcona sintetase; CHI: chalcona isomerase; FHT: flavanona 3-β-hidroxilase; DFR: dihidroflavonol-4-redutase; LDOX (ANS): antocianidina sintetase; FGT: flavonoide glicosiltransferase; FNS: flavona sintetase; FLS: flavonol sintetase; LAR: leucoantocianidina redutase; ANR: antocianidina redutase; IFS: isoflavona sintetase; HID: 2-hidroxiisoflavanona desidratase; F2H: flavanona 2-hidroxilase; HFD: 2-hidroxiflavanona desidratase (Fonte: MARTENS *et al.*, 2010).

De uma maneira mais específica, o anel B e parte do anel heterocíclico do esqueleto dos flavonoides provem de 4-cumaroil-CoA enquanto que o anel A origina-se a partir de três unidades de acetato-malonato. A enzima chave para a formação do esqueleto do flavonoide é a chalcona sintetase, que catalisa a etapa de condensação das

três unidades de acetado da via do malonato com 4-cumaroil-CoA formando um intermediário com quinze átomos de carbono (2',4',6',4-tetraidroxichalcona) (ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

Em vista das inúmeras propriedades biológicas descritas, muitos dados são publicados direcionando alguns pontos dos mecanismos de ação dos flavonoides, entretanto, ainda existem várias questões que devem ser discutidas, principalmente com relação aos efeitos tóxicos e genotóxicos e também sobre os mecanismos de absorção, distribuição e biotransformação, o que torna difícil prever se uma exposição aumentada desses compostos, como, por exemplo, através da ingestão, não traz mais efeitos maléficos do que benéficos (SILVA *et al.*, 2000).

Dessa maneira, tornou-se relevante investigar a relação entre a estrutura dos flavonoides: quercetina, kaempferol, luteolina, fisetina, galangina, crisina, flavona, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona, e sua (anti) mutagenicidade, já que os estudos são muito conflitantes. A proteção dessas substâncias contra danos no DNA (ácido desoxirribonucléico) ainda não está completamente esclarecida, provavelmente devido às diferentes características da estrutura química e da variação inter e intra-ensaio (CUSHNIE e LAMB, 2005).

Além disso, neste estudo foi avaliada a atividade estrogênica dos flavonoides por meio dos ensaios com leveduras recombinantes (RYA - *Recombinant Yeast Assay*) e de proliferação celular com células MCF-7/BUS (*E-screen*). As crescentes evidências de que alguns compostos conhecidos como disruptores endócrinos, podem mimetizar ou antagonizar a ação dos hormônios esteróides (CÉSPEDES *et al.*, 2004), despertou o interesse da comunidade científica em identificar tais compostos para esclarecer os efeitos e assegurar seu uso para seres humanos.

A determinação da atividade antibacteriana *in vitro* dos flavonoides também foi realizada neste estudo utilizando a técnica de diluição em microplacas, uma vez que o elevado potencial de recombinação genética das bactérias tem provocado o aumento de cepas multirresistentes e, conseqüentemente, tornando ineficazes muitos fármacos antimicrobianos disponíveis no mercado (TRIAS e GORDON, 1997; PENNA *et al.*, 2001).

1.2. Mutagenicidade e antimutagenicidade

O DNA é o material genético de todos os seres vivos e de muitos vírus, sendo a sequência de bases nitrogenadas a forma na qual a informação genética é armazenada (LEWIN, 2001). Por apresentar essa função fundamental, o DNA é bastante protegido, sendo a única molécula biológica que apresenta um mecanismo próprio para prevenção e reparo de falhas em seu metabolismo (LEHNINGER *et al.*, 1995). Entretanto, ainda assim está sujeito a mutações que, segundo Zaha (1996), são alterações súbitas no conjunto gênico de um organismo que não são explicáveis pela recombinação da variabilidade genética preexistente. Estas alterações, segundo Lewin (2001) podem ser decorrentes de processos celulares normais (mutações espontâneas) ou devido à exposição do organismo a agentes químicos ou físicos (mutações induzidas).

Os compostos mutagênicos podem induzir alterações genômicas visando diretamente e/ ou indiretamente o DNA, através da ligação às proteínas envolvidas na manutenção da integridade do genoma (MATEUCA *et al.*, 2006).

Estima-se que a média da frequência de mutações espontâneas por pares de bases em células humanas seja de 10^{-8} a 10^{-10} , sendo que essa frequência pode aumentar de 1 a 10 vezes quando há exposição a um agente mutagênico (AJITH e SOJA, 2006).

As consequências das interações mutágeno-alvo podem levar a diferentes tipos de danos ao DNA (aductos de DNA, sítios alcali-lábeis, quebras de fitas) e as mutações vão de alterações de um único nucleotídeo (mutação gênica ou puntiforme) a aberrações cromossômicas que atingem cromossomos inteiros ou pedaços de cromossomos (MATEUCA *et al.*, 2006). Basicamente, as mutações gênicas podem ser subdivididas em substituição de pares de bases e alteração na matriz de leitura, ocorrendo por adição ou deleção de nucleotídeos. Já as mutações cromossômicas podem ser divididas em numéricas, que por sua vez são subdivididas em euploidias (envolvem genomas inteiros) e aneuploidias (envolvem parte do genoma), e mutações cromossômicas estruturais, sendo elas: deleção, duplicação, translocação e inversão (GRIFFITHS *et al.*, 2006).

Os mecanismos indiretos de genotoxicidade que podem ser definidos como interações com alvos que não seja o DNA, mas que leva à efeitos genotóxicos, abrange essencialmente a peroxidação lipídica e os aductos de proteínas. Várias pesquisas também focam a inibição de enzimas de reparo (por exemplo, OGG₁, XPD, Ni), proteínas de controle do ciclo celular (por exemplo, p53, Rb, ciclinas), produtos gênicos

relacionados à apoptose (por exemplo, p53, bax, bcl -2), lâminas nucleares, proteínas de defesa contra danos oxidativos (glutathiona), enzimas de metabolização e tubulinas do fuso mitótico/ meiótico. A Figura 3 mostra os mecanismos pelos quais os mutágenos (de ação direta e indireta) e outras moléculas desempenham um papel na carcinogênese (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003).

Resumidamente, mutagenicidade é definida como uma alteração permanente no conteúdo ou estrutura do material genético de um organismo (DEARFIELD *et al.*, 2002).

As fontes de exposição à mutágenos podem ser de vários tipos, como por exemplo, endógenos (óxido nítrico, radicais livres de oxigênio); provenientes da dieta (mutágenos gerados durante o cozimento de alimentos ou presentes na dieta); radiação (exposição aos raios-X para diagnóstico e radioterapia); poluição (efluentes industriais, pesticidas, incineração do lixo), entre outros (RIBEIRO e MARQUES, 2003).

Geralmente, o câncer começa após um episódio mutacional em uma única célula e gradualmente se transforma em uma doença maligna de múltiplos estágios, através da aquisição sequencial de mutações adicionais. Dessa maneira, a inibição seria, portanto, uma medida eficaz de prevenção, já que esses eventos iniciais são as causas subjacentes de toda a progressão da carcinogênese (LOH *et al.*, 2009). Estudos revelam que a carcinogenicidade e a mutagenicidade de alguns produtos químicos pode ser modulada por outros produtos químicos e a dieta pode ser um fator chave na determinação da estabilidade genômica e dessa maneira na prevenção de doenças humanas (RIBEIRO e SALVADORI, 2003).

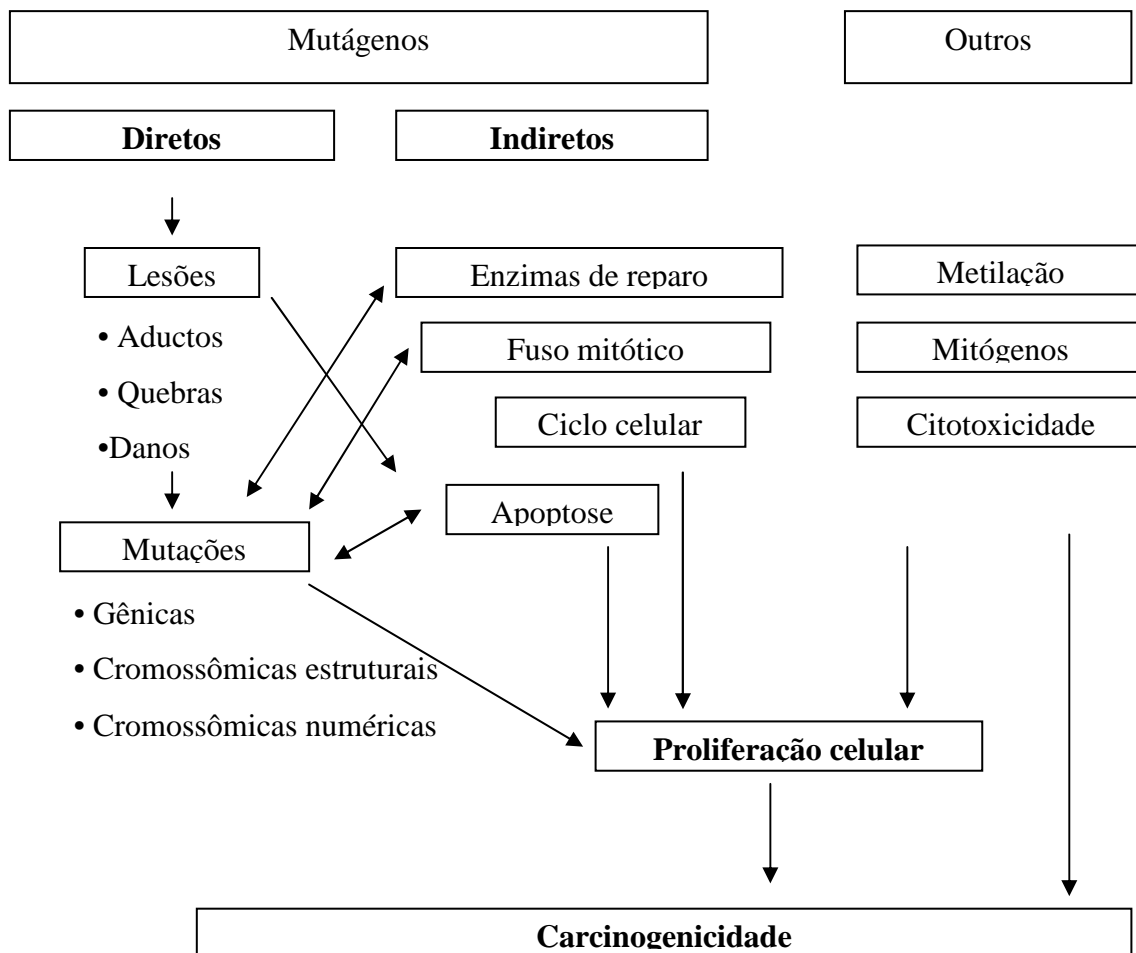


Figura 3 - Resumo dos mecanismos diretos e indiretos dos mutágenos e outras moléculas que podem desempenhar um papel na carcinogênese (Adaptado de Kirsch-Volders *et al.*, 2003)

É natural que o nosso organismo apresente mecanismos de defesa, em vista do contato contínuo do homem com agentes mutagênicos. Esses mecanismos incluem a inativação enzimática pelas superóxidos desmutases, catalases, glutionas peroxidases e glutionas S-transferases; e não enzimática, por ação de micronutrientes, como as vitaminas C, E e β -caroteno, que em conjunto, atuam na estabilização de espécies altamente reativas que danificam o DNA, mantendo a integridade funcional e estrutural das células (KITANI *et al.*, 1999; VALKO *et al.*, 2006). Entretanto, os mecanismos naturais de defesa acabam muitas vezes sendo intensamente desafiados, o que enfatiza a importância das investigações por compostos exógenos que possam evitar ou minimizar os danos induzidos no DNA (FERGUSON *et al.*, 2004).

Muitas destas substâncias provocam, além de suas propriedades antimutagênica e anticarcinogênica, outros efeitos benéficos, como a ativação do sistema imune e / ou proteção contra doenças cardiovasculares (KNASMÜLLER *et al.*, 2002).

A quimioprevenção do câncer, por exemplo, pode ser definida como a prevenção da indução, inibição ou atraso da progressão do câncer, ou a reversão da carcinogênese até o estágio pré-maligno pela administração de agentes farmacológicos adequados ou a ingestão de macronutrientes, micronutrientes ou metabólitos secundários vegetais (DE FLORA e FERGUSON, 2005; NAMASIVAYAM, 2011). Há pelo menos dois mecanismos principais para a quimioprevenção do câncer. Um deles é a antimutagênese (NAMASIVAYAM, 2011).

O termo antimutagênico foi usado originalmente para descrever os compostos que reduzem a frequência ou a taxa de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente dos mecanismos de proteção envolvidos (NOVICK e SZILARD, 1952).

Entretanto De Flora *et al.* (2001) propôs uma classificação de pontos de intervenção nos quais é possível prevenir a mutação e o câncer, que inclui uma variedade de mecanismos extracelulares e celulares, desde a iniciação até estágios posteriores da carcinogênese, ou seja, promoção, progressão, invasão e metástase. Entre os processos extracelulares, podem-se citar os físicos, como a remoção mecânica dos agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos, e os químicos, tais como a modificação da microbiota intestinal, complexação, diluição e desativação de mutágenos e carcinógenos endógenos e exógenos (DE FLORA, 1998; GENTILE *et al.*, 2001; KNASMÜLLER *et al.*, 2002). Os processos celulares compreendem a inibição de mutação e da iniciação do câncer, dos quais se pode citar: modificação do transporte transmembrana; modulação do metabolismo; atividade antioxidante; controle da replicação celular; modulação dos mecanismos de reparo do DNA; controle da expressão gênica e neutralização dos produtos oncogênicos (DE FLORA, 1998; HEO *et al.*, 2001).

Os agentes antimutagênicos podem ser colocados em duas categorias gerais: aqueles que inibem a formação de lesões e são classificados como desmutagênicos, e aqueles que colaboram no reparo das lesões que já estão presentes no DNA, denominados bioantimutagênicos (LIVIERO e von BORSTEL, 1996). Os agentes desmutagênicos são compostos capazes de inativar química, física ou enzimaticamente um agente mutagênico. As inativações química e física ocorrem por ligação direta com o agente mutagênico, impedindo sua ativação por sequestro ou adsorção de agentes

mutagênicos e radicais livres, impossibilitando que os mesmos estabeleçam contato com o material genético. A inativação enzimática de um mutágeno pode ocorrer por dois mecanismos: a inativação por enzimas de fase I da biotransformação, como as enzimas da família P450, ou a indução de enzimas de fase II, como a glutatona S-transferase. Já os compostos bioantimutagênicos podem atuar como moduladores do reparo e replicação do DNA, agindo em nível celular ao aumentar a fidelidade na replicação do material genético, estimular o reparo livre de erros de danos no material genético ou inibir os sistemas de reparo sujeitos a erro (KADA *et al.*, 1982; KURODA *et al.*, 1992).

Outro mecanismo de quimioprevenção é a antiprogessão/antiproliferação (NAMASIVAYAM, 2011), que envolvem a inibição da promoção e da progressão tumoral, bem como bloqueio de metástases. Estes mecanismos envolvem, basicamente, a ação de antioxidantes, bloqueio da angiogênese e atividades hormonais (DE FLORA, 1998; HEO *et al.*, 2001). O termo anticarcinogênico também é usado de uma maneira geral para descrever qualquer agente que reduz ou inibe o desenvolvimento de tumores (WATERS *et al.*, 1996).

Os agentes quimiopreventivos podem ser usados não somente para prevenir o câncer, mas também na terapêutica, pois muitos deles podem ser usados em combinação com agentes quimioterápicos para intensificar o efeito com o uso de menores doses e assim, minimizar a toxicidade induzida pelos quimioterápicos (DORAI e AGGARWAL, 2004).

Entretanto, a utilização de agentes protetores só é possível com base na análise cuidadosa da avaliação segura do risco-benefício após vários modelos experimentais em uma variedade de testes *in vitro*, *in vivo* e clínicos (STEELE e KELLOFF, 2005), além de ser fundamental estabelecer o mecanismo de ação inibidora (DE FLORA e RAMEL, 1998).

1.3. Teste de Ames

O desenvolvimento de cânceres ocorre, muitas vezes, como consequência de mutações sucessivas e expansão do clone mutante. Mutações que inativam genes supressores de tumor, ativam proto-oncogenes e telomerasas, estimulam a proliferação e inibem a morte celular, fornecem um grande estímulo na iniciação de um câncer (HAHN e WEINBERG, 2002). Mutações do tipo substituição de bases e deslocamento do quadro de leitura do DNA são encontradas nesses genes, numa grande variedade de tipos de câncer (GREENBLATT *et al.*, 1994).

O teste para a avaliação da mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, também conhecido como *Salmonella*/ microssomo, ou Teste de Ames é amplamente aceito pela comunidade científica e pelas agências e corporações governamentais como um ensaio utilizado para identificar substâncias puras, em misturas e em amostras ambientais que podem produzir danos genéticos que levam a mutações gênicas (MORTELMANS e ZEIGER, 2000; ZEIGER, 2001).

O método emprega linhagens de *S. typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas para histidina (His-), apresentando diferentes mutações no operon deste aminoácido, sendo desenvolvidas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) ou substituições de bases no DNA (MARON e AMES, 1983; MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Essas linhagens são incapazes de sintetizar o aminoácido histidina (histidina-dependentes), e, portanto, são incapazes de crescer e formar colônias na sua ausência. Novas mutações no local dessas mutações pré-existentes, ou nas proximidades dos genes, podem restaurar a função do gene e permitir que as células sintetizem histidina. Estas células recém-mutadas podem crescer na ausência de histidina e formar colônias. Por esta razão, o teste é muitas vezes referido como um “ensaio de reversão”. O número de revertentes é facilmente medido pela contagem de uma população de bactérias à amostra a ser testada (Fig. 4) (MORTELMANS e ZEIGER, 2000; ZEIGER, 2001).

As linhagens bacterianas não apresentam enzimas de metabolização, o que impossibilita sua capacidade para identificação de agentes mutagênicos de ação indireta. Para superar essa dificuldade, adiciona-se às culturas durante os ensaios a chamada fração S9, que contém enzimas de metabolização de xenobióticos e é obtida a partir do fígado de ratos (MARON e AMES, 1983). Todas essas características conferem ao teste

de Ames uma grande capacidade de identificação e caracterização de diferentes agentes mutagênicos, com grande eficiência e sensibilidade (SANTOS *et al.*, 2006).

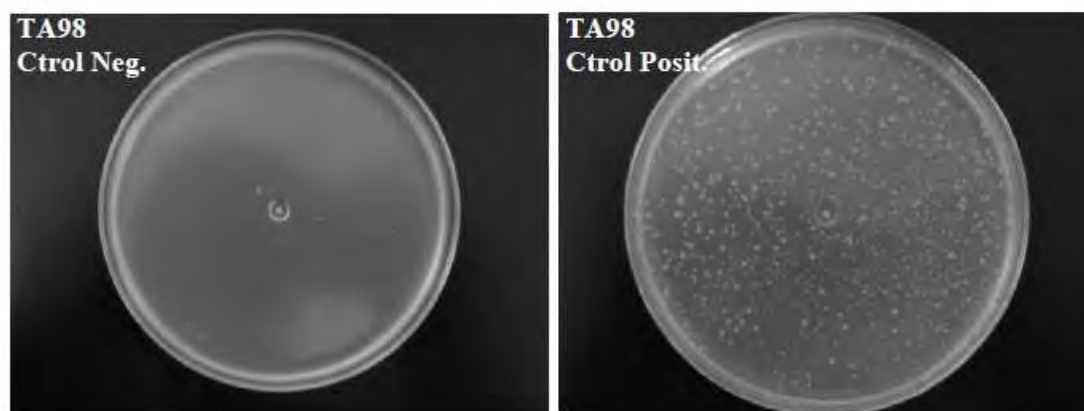


Figura 4 - Placas com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames)

Além da atividade mutagênica, vários estudos utilizam o teste de Ames para avaliar a atividade antimutagênica.

Lira *et al.* (2008) avaliaram o efeito mutagênico e antimutagênico de extratos metanólicos (MeOH) e clorofórmicos (CHCl₃) de *Byrsonima basiloba* pelo teste de Ames, usando cepas TA97, TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*. Nenhuma atividade mutagênica foi observado em nenhum dos extratos, mas ambos apresentaram atividade antimutagênica, com o valor mais elevado do nível de inibição (89%) no extrato MeOH de *B. basiloba* com a linhagem TA100 na presença de aflatoxina B₁ (AFB₁). Recentemente, Sghaier *et al.* (2010) verificaram o potencial mutagênico e antimutagênico do óleo essencial extraído das partes aéreas de *Teucrium ramosissimum* pelo teste de Ames em linhagens de *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535 com e sem ativação metabólica. O óleo essencial de *T. ramosissimum* não apresentou efeito mutagênico, mas os resultados mostraram efeitos antimutagênicos contra azida sódica (AZS), AFB₁, benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) e 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (NPD).

Dessa maneira, vários trabalhos são realizados e justificam que metodologias usadas para avaliar a mutagenicidade de agentes químicos e físicos também podem ser empregadas para avaliação e identificação de agentes antimutagênicos (GEBHART, 1992).

1.4. Interferentes endócrinos

Por definição, interferentes endócrinos são os compostos, sintéticos ou naturais, que influenciam a atividade hormonal de organismos vivos, em uma grande variedade de formas. Também podem ser definidos como substância exógena que causa efeitos adversos na saúde de um organismo intacto, devido a mudanças na função endócrina (HARRISON *et al.*, 1997; BRIX *et al.*, 2010). Os interferentes endócrinos comumente são denominados de estrógenos ambientais (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Devido à sua hidrofobicidade, os estrógenos ambientais entram facilmente no organismo por difusão através de membranas biológicas, são difíceis de ser excretados de forma inalterada na urina e bile, e se acumulam em compartimentos hidrofóbicos da célula (ROY *et al.*, 1998), onde podem se ligar ao receptor de estrógeno (RE) humano e, conseqüentemente, mimetizar ou bloquear a ação do próprio hormônio, modificando a resposta natural (SANTAMARTA, 2001; GHISELLI e JARDIM, 2007). Os estrógenos ambientais podem ser encontrados em plásticos, detergentes e surfactantes, pesticidas, herbicidas, produtos químicos industriais, plantas e fungos (HAN *et al.*, 2002).

Apesar da possibilidade de perturbação do sistema endócrino por compostos sintéticos estar sendo discutida desde a década de 70, o interesse por este assunto, introduzindo, inclusive, vários conceitos, foi despertado pela conferência em Wingspread em 1991, que discutiu as observações de problemas reprodutivos e de desenvolvimento em diversos animais (SOTO e SONNENSCHNEIN, 2010).

A Associação de Proteção ao Meio Ambiente (EPA - *Environmental Protection Association*) considera a identificação dos interferentes endócrinos como uma das cinco principais áreas de pesquisa da organização, havendo ainda muito a ser conhecido sobre efeitos e formas de neutralizá-los (PATLAK, 1996).

Em animais, os resultados de tais disfunções no sistema hormonal têm sido associados com função anormal de tireóide em aves e peixes; decréscimo de fertilidade de peixes, aves e mamíferos; emasculação e feminização de peixes, aves e gastrópodes e função alterada do sistema imunológico em aves e mamíferos (COLBORN *et al.*, 1993).

Nos seres humanos, acredita-se que estes compostos, mesmo em concentrações extramentes baixas, possam estar envolvidos na diminuição da espermatogênese, que em alguns países estes dados coincidem com o aumento de câncer de testículos, além do aumento da incidência de malformações congênitas do trato genital masculino, tais como hipospádia e criptorquidia (DHOOGHE *et al.*, 2006), disfunção da tireóide e

alterações relacionadas com o sistema neurológico (GHISELLI e JARDIM, 2007; SOTO e SONNENSCHNEIN, 2010). Entretanto, há diferenças importantes entre compostos estrogênicos de origem industrial e os que vêm das plantas (HAN *et al.*, 2002).

Ao contrário dos poluentes ambientais com atividade estrogênica, que têm um impacto negativo sobre o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos masculinos e fertilidade, acreditam-se principalmente nos efeitos benéficos dos fitoestrógenos (NAEYER *et al.*, 2004).

Os fitoestrógenos são metabólitos secundários polifenólicos não-esteroidais de plantas (WARD e KUHNLE, 2010), que exercem atividades estrogênicas ou antiestrogênicas (WANDA *et al.*, 2006), através de mecanismos que dependem e/ ou independem dos REs (PIERSEN, 2003).

As principais classes de fitoestrógenos são as isoflavonas (encontrado principalmente em legumes, grão de bico e soja), flavonoides prenilados (presente no lúpulo), cumestanos (encontrado em legumes jovens como brotos de alfafa ou trevo) e lignanas (encontrada em cereais, linhaça e outras frutas e legumes). Nas plantas, fitoestrógenos ocorrem predominantemente como glicosídeos que no momento do consumo são hidrolisadas por glicosidases intestinais para liberar agliconas (WARD e KUHNLE, 2010).

A interação direta dos fitoestrógenos ocorre através dos receptores α -estrogênico (RE α) e receptores β -estrogênico (RE β) (PIERSEN, 2003). Compostos não-esteroidais que se ligam aos REs são referidos como moduladores seletivos dos receptores de estrógenos (SERMs - *Selective Estrogen Receptor Modulators*) (FONTENOT *et al.*, 2007).

Os RE α e RE β são membros da superfamília dos genes que compreendem receptores nucleares de diversos ligantes hidrófobos, como os hormônios esteróides (estrógeno, progesterona, glucocorticóides, mineralocorticóides), ácidos retinóicos (vitamina A), vitamina D, prostaglandina e hormônios da tireóide (MANGELSDORF *et al.*, 1995). Essas duas subclasses são diferencialmente expressas e localizadas em diversos tecidos e células, onde codificam uma variedade de funções fisiológicas reprodutivas e não reprodutivas envolvidas no metabolismo energético, equilíbrio de sal, sistema imunológico, desenvolvimento e diferenciação (HASENBRINK *et al.*, 2006). Apresentam elevada homologia no domínio de ligação ao DNA, mas possuem homologia moderada no domínio de ligação ao ligante e apenas homologia parcial nas

caudas C e N-terminal (GUSTAFSSON, 1999; SHEN *et al.*, 2007). Estudos da distribuição de tecidos e padrões de expressão destes receptores indicam que o RE α tem um padrão de expressão amplo e está concentrado no útero, glândula mamária, testículos, supra-renal e hipófise, no pulmão e no hipotálamo são encontrados os dois subtipos, os RE α e RE β . Já o RE β tem um padrão mais concentrado, com níveis elevados no ovário, próstata e epidídimo e no cérebro em desenvolvimento, com diferenças entre seres humanos em comparação com outras espécies (PINTO *et al.*, 2008).

Quando os RE α e/ou RE β ligam-se ao estradiol, os receptores formam dímeros. Esses dímeros, então, ligam-se a elementos de resposta a estrógenos no DNA e recrutam outros componentes da maquinaria de transcrição, que levam à expressão gênica (Fig. 5) (OGAWA *et al.*, 2009).

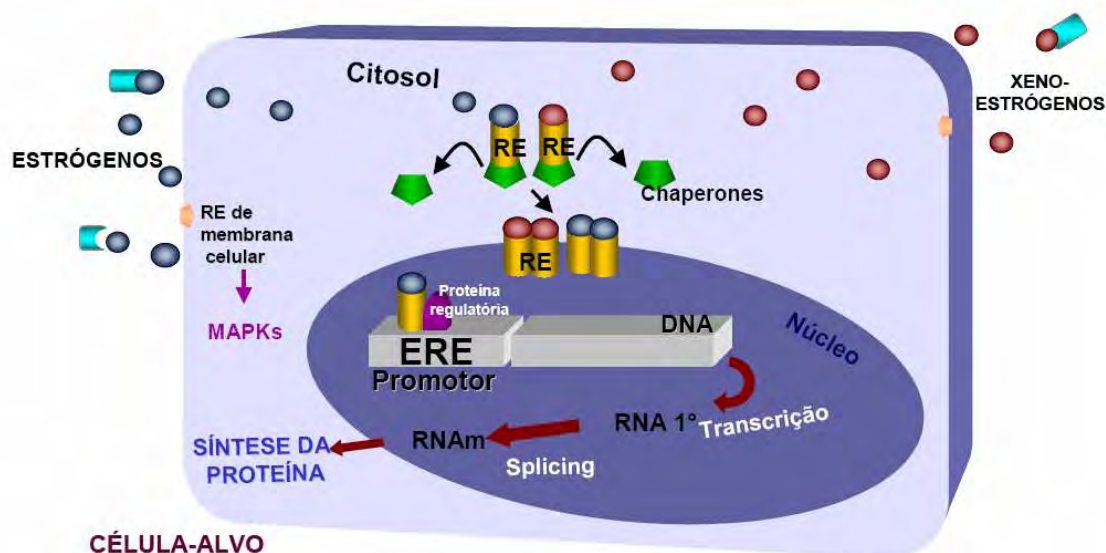


Figura 5 - Mecanismos de transdução de sinal promovidos por estrógenos endógenos e xenoestrógenos (FRIEDRICH, 2003)

Como consequência, além dos estrógenos exercerem influência determinante no sistema reprodutor, ainda agem sobre o sistema nervoso central, atuam sobre o tecido ósseo, promovendo a deposição de cálcio, alteram a composição da parede vascular, levando a redução da permeabilidade, ativam a coagulação sanguínea, diminuem os níveis de colesterol plasmático e aumentam os do fígado (AIRES *et al.*, 1999; KANG *et al.*, 2006).

Os fitoestrógenos podem atuar como agonistas de estrógeno, imitando os estrógenos endógenos e causando efeitos estrogênicos ou como antagonistas de estrógeno, que podem bloquear ou alterar os REs e modificar a resposta estrogênica (Fig. 6) (PINTO *et al.*, 2008). Além disso, podem afetar a síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção dos hormônios, alterando as concentrações dos hormônios naturais (SANTAMARTA, 2001; GHISELLI e JARDIM, 2007; FERNANDEZ *et al.*, 2009).

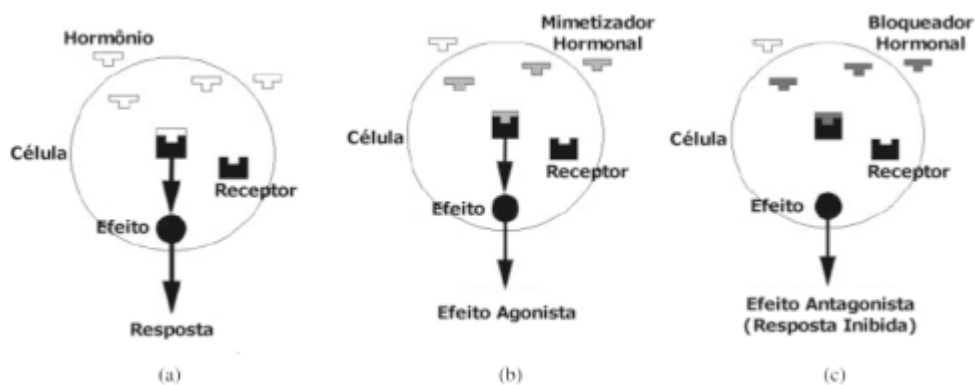


Figura 6 – Disfunções endócrinas: a) resposta natural, b) efeito agonista, c) efeito antagonista

Como mecanismos independentes dos REs, os fitoestrógenos podem agir por meio da inibição de aromatase (RICE *et al.*, 2007; VIRK-BAKER *et al.*, 2010), estimulação da globulina que se liga aos hormônios sexuais, especificamente a testosterona e o estradiol, alterações no metabolismo do estrogênio e inibição da reciclagem entero-hepática de estrógenos endógenos e xenobióticos (PIERSEN, 2003).

Além de suas propriedades estrogênicas, os fitoestrógenos podem exibir outras propriedades, como a inibição da proteína tirosina-quinase (AKIYAMA *et al.*, 1987); do fator alfa de necrose tumoral (DANG *et al.*, 2003; VIRK-BAKER *et al.*, 2010); das enzimas DNA topoisomerases I e II (NAEYER *et al.*, 2004) e da quinase ribossomal (MOL e MONTALBÁN, 2001). Existem também estudos sobre seus efeitos antioxidantes (WEI *et al.*, 1995; BARNES, 2010), anti-hipertensivos e antiinflamatórios (KNIGHT e EDEN, 1995), propriedades de interferir em uma infinidade de vias de sinalização do ciclo celular e eventos de apoptose, além do sinergismo com fatores de crescimento induzindo a síntese ou ativação de receptores (NAEYER *et al.*, 2004). Dados epidemiológicos tem revelado que a ingestão de alimentos contendo

fitoestrógenos podem prevenir o câncer de mama e outros cânceres hormônio-dependentes (INNOCENTI *et al.*, 2007; VIRK-BAKER *et al.*, 2010).

Apesar de décadas de estudos, os riscos e benefícios da terapia de reposição hormonal com estrógenos sintéticos em mulheres na pós-menopausa saudáveis permanece incerto (NAEYER *et al.*, 2004; INNOCENTI *et al.*, 2007). A deficiência de estrogênio durante a menopausa, pode provocar o risco de muitos problemas de saúde, tais como ondas de calor, também chamadas de fogachos, insônia, secura vaginal, dores articulares, alterações do humor, redução da densidade óssea, doenças cardiovasculares e osteoporose (KANG *et al.*, 2006).

A terapia estrogênica é muito empregada na sintomatologia vasomotora e nas repercussões genitais do hipoestrogenismo. Por estes motivos, pode melhorar a qualidade de vida da mulher na pós-menopausa (VIEIRA *et al.*, 2007). Contudo, por exemplo, na etiologia do câncer de mama, os estrógenos sintéticos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do tumor. Sugere-se que os mecanismos do estrógeno envolvidos na carcinogênese, seja estimulando a transformação e proliferação celular e/ ou agindo como iniciador do tumor através da indução de danos ao DNA pelos seus metabólitos. A ação inicial do tumor pode ser devido a hidroxilação do principal estrógeno utilizado por mulheres na pré-menopausa, 17- β -estradiol em estrógeno catecol 2-hidroxiestradiol (2 OHE₂) e 4-hidroxiestradiol (4 OHE₂). Quando não inativado, o estrogênio catecol pode ser oxidado a quinonas reativas. Quinonas de 2 OHE₂ podem formar aductos de DNA que se mantêm estáveis no DNA, quando não reparado, mas quinonas de 4 OHE₂ pode formar aductos de DNA depurinados, um evento comum de iniciação de tumor em cânceres humanos (van DUURSEN *et al.*, 2004).

Em vista desses riscos clínicos, esforços extensivos têm sido devotados ao desenvolvimento de diferentes preparações que rendessem os benefícios da terapia hormonal, mas com mínimos riscos e inconveniências (BRZEZINSKI e DEBI, 1999). Dentre as opções terapêuticas estão os fitoestrógenos (VIEIRA *et al.*, 2007), pois acredita-se que estes podem colaborar na prevenção de desconfortos relacionados com o desequilíbrio hormonal (NAEYER *et al.*, 2004). Além disso, o papel dos fitoestrógenos em modificar o risco de câncer pode não estar associado somente às suas propriedades estrogênicas, mas também por exercer papel mediador em outros eventos bioquímicos relacionados (THAM *et al.*, 1998).

Entretanto, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos moleculares, segurança e eficácia dos compostos bioativos naturais antes que eles possam ser amplamente utilizados em benefício das mulheres na pós-menopausa.

1.5. Ensaios de estrogenicidade *in vitro* (RYA e *E-screen*)

A necessidade de estabelecer métodos simples, rápidos e capazes de detectar e caracterizar a presença de desreguladores endócrinos no meio ambiente (PASSOS *et al.*, 2009) e/ou fitoestrógenos que podem ser uma alternativa à terapia hormonal pós-menopausa (KURZER, 2003), tem levado ao desenvolvimento de um grande número de ensaios *in vitro* e *in vivo* (PASSOS *et al.*, 2009).

Os ensaios *in vivo* são amplamente utilizados, porém, eles não são adequados para *screening* em larga escala e suas vantagens ainda são limitadas pela sensibilidade relativamente baixa, alto custo e desenvolvimento experimental demorado em comparação com os ensaios *in vitro* (ZACHAREWSKI, 1997; CÉSPEDES *et al.*, 2004), como por exemplo, o ensaio uterotrófico em roedores. Esse ensaio avalia a proliferação do tecido uterino em resposta aos estrógenos, é um ensaio confiável, mas inviável, exatamente devido às desvantagens citadas com relação aos ensaios *in vivo* (VILLALOBOS *et al.*, 1995; PAYNE *et al.*, 2000). Sendo assim, uma bateria de testes *in vitro* vem sendo proposta (PAYNE *et al.*, 2000). Os bioensaios *in vitro*, principalmente aqueles baseados nos mecanismos de ação dos estrógenos, estão se tornando cada vez mais importante para identificar e avaliar os estrógenos ambientais. Eles são meios eficazes e eficientes de avaliação rápida da estrogenicidade de um grande número de amostras ambientais e compostos, minimizando o uso de animais de laboratório (ZACHAREWSKI, 1997; CÉSPEDES *et al.*, 2004).

A maioria desses ensaios *in vitro* está classificada dentro de uma das três categorias: a) ensaios de ligação competitiva ao RE, que verificam a afinidade de ligação de um composto químico ao RE; b) ensaios de informação gênica, que determinam se a transcrição e tradução gênica são dependentes da interação do RE com seu ligante; e c) ensaios de proliferação celular, que avaliam o aumento do número de células alvo, durante a fase exponencial de proliferação. Assim, esses ensaios atuam em diferentes níveis de complexidade biológica na resposta celular aos estrógenos (FANG *et al.*, 2000).

Predominantemente baseado em linhagens celulares derivadas de humanos, as técnicas de proliferação utilizam parâmetros que avaliam a multiplicação celular induzida pela exposição a compostos estrogênicos. As linhagens celulares comumente usadas são células de câncer de mama humano responsivas a estrógenos, MCF-7 (Fig. 7) ou T47-D (ZACHAREWSKI, 1997). Todavia, para assegurar a confiabilidade da técnica, é necessário garantir que a linhagem celular empregada apresente elevada especificidade de resposta a estrógenos e não prolifere em resposta à ligação a outros receptores, como por exemplo, àqueles responsáveis por fatores de crescimento (JONES *et al.*, 1998).

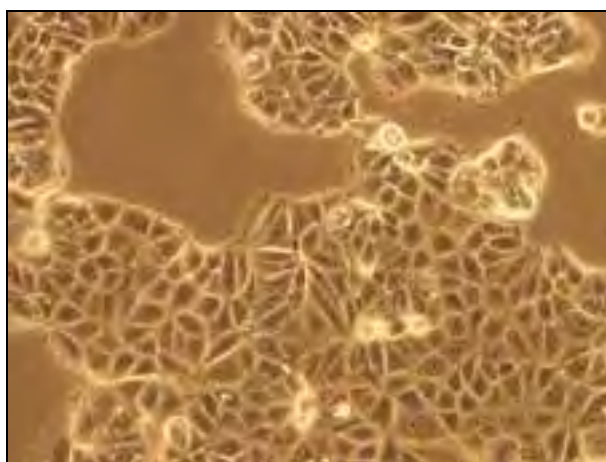


Figura 7 - Fotomicrografia óptica de células MCF-7

(Fonte: TGR Biosciences)

As propriedades antiestrogênicas e citotóxicas dos fitoestrógenos podem ser avaliadas em algumas linhagens tumorais. Muitos estudos *in vitro* ilustram o efeito bifásico dos fitoestrógenos em células de cultura. Quando em baixas concentrações, estimulam a proliferação, porém, quanto em concentrações supra-fisiológicas, ocorre inibição do crescimento celular. Se um fitoestrogênio “forte” e um estrogênio natural estiverem presentes em concentrações fisiológicas, os fitoestrógenos irão antagonizar a ação do estrogênio, reduzindo a proliferação celular (HARGREAVES *et al.*, 1999).

O ensaio *E-screen*, utilizado neste estudo, foi desenvolvido por Soto *et al.* (1992, 1995) com este propósito. Além disso, é também baseado no crescimento das células MCF-7, na presença de estrógenos ou compostos que os mimetizam. Essas células são recomendadas devido a sua reprodutibilidade e sensibilidade estável a esses hormônios. O método pode diferenciar compostos agonistas, agonistas parciais ou inativos

(KORACH e MCLACHLAN, 1995), comparando a proliferação celular obtida em concentrações variáveis da substância em análise com aquelas observadas após exposição a controles positivos e negativos (SOTO *et al.*, 1992; OH e CHUNG, 2004).

A linhagem celular de câncer de mama (MCF-7) foi derivada de uma efusão pleural de uma paciente com carcinoma mamário metastático, previamente tratado com radioterapia e terapia hormonal (SOULE *et al.*, 1973). Desde aquela época, essas células passaram por inúmeras mudanças, e os estudos demonstram que variantes da linhagem MCF-7 mostram diferenças intrínsecas em características como a taxa de proliferação de estrogênio-dependentes, tempo de duplicação e susceptibilidade a apoptose (VILLALOBOS *et al.*, 1995).

Para desenvolver um bioensaio é necessário escolher qual o efeito será avaliado. A proposta para um bioensaio pode se basear na definição que diz que os estrógenos são substâncias capazes de interferir na proliferação de órgãos do trato genital feminino. Os estrógenos induzem a proliferação dessas células e o *E-screen* baseia-se nessa propriedade (SOTO *et al.*, 2006). Segundo Rajapakse (2004), de todos os ensaios utilizados para triagem de substâncias químicas com atividade endócrina, o *E-screen* apresenta o maior nível de complexidade biológica, podendo isso ser considerado como um ponto de eficácia. Muitos fatores devem ser considerados durante o planejamento experimental, desenvolvimento e avaliação da combinação de efeitos estrogênicos e antiestrogênicos por diferentes mecanismos.

Outro ensaio também utilizado neste trabalho e muito usado para avaliar o potencial de desregulação endócrina de uma substância é o ensaio de levedura recombinante (RYA) (CÉSPEDES *et al.*, 2004). No ensaio RYA, utilizado neste estudo, a atividade estrogênica é resultado da interação direta com o RE (ZACHAREWSKI, 1998; WANDA *et al.*, 2006). Esses ensaios com gene repórter utilizando células de levedura é uma alternativa rápida de triagem quando comparados com estudos *in vivo* ou cultura de células (PASSOS *et al.*, 2009).

No RYA, as cepas de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) são geneticamente modificadas e expressam dois elementos genéticos: um gene sensor, o RE humano, e um gene repórter, contendo o elemento responsivo a estrogênio do gene da vitelogenina B₁ de *Xenopus laevis*, o qual promove a expressão da enzima β -galactosidase pela ativação do gene lacZ (Fig. 8) (GARCIA-REYERO *et al.*, 2001; 2005). O gene repórter é construído de uma forma que esta enzima só será expressa na presença do complexo receptor-ligante, imitando o mecanismo pelo qual muitos genes responsivos a

hormônios são regulados nos vertebrados (CÉSPEDES *et al.*, 2005; NOGUEROL *et al.*, 2006). A expressão do gene repórter é então monitorada por sua atividade enzimática utilizando substratos, cujos produtos são fáceis de detectar e quantificar (NOGUEROL *et al.*, 2006).

Neste teste é utilizado como substrato 4-metilumbeliferona β -D-galactopiranosídeo (MuGal). A hidrólise deste substrato promove a formação de um produto fluorescente 4-metilumbeliferona, o qual é medido em espectrofotômetro (355 nm de excitação e 460 nm de emissão). Uma curva dose-resposta relacionando a atividade da enzima β -galactosidase com a concentração de estradiol é usada para atribuir um valor estradiol-equivalente (EEQ) (NOGUEROL *et al.*, 2006; FERNANDEZ *et al.*, 2009).

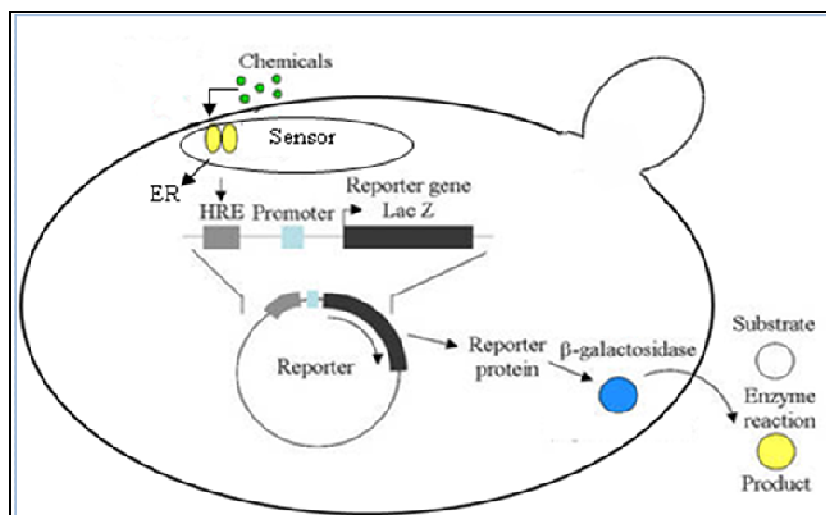


Figura 8 - Mecanismo de ação exercido pelo RYA

Duas características da célula leveduriforme são fundamentais para o sucesso do RYA. Primeiro, a levedura não tem um sistema endógeno homólogo de receptores nucleares de vertebrados que poderiam interferir com o ensaio. Em segundo lugar, o processo de alteração conformacional e pós-transducional da proteína de vertebrados em levedura é muito semelhante ao das células de mamíferos, o que resulta na preservação da estrutura do receptor quando expresso em levedura. Essa característica é primordial, uma vez que a estrutura correta do domínio de ligação do receptor determina a especificidade do sistema, isto é, sua capacidade de distinguir entre ligantes e não ligantes (GREEN e CHAMBON, 1991; NOGUEROL *et al.*, 2006). Além disso, este ensaio permite a avaliação de um grande número de amostras ambientais e substâncias

químicas a um baixo custo (CÉSPEDES *et al.*, 2004; FERNANDEZ *et al.*, 2008). O RYA mostrou-se específico, sensível e reprodutível (PASSOS *et al.*, 2009), tem um tempo experimental relativamente curto e não exige técnica asséptica rigorosa quando comparado a outros ensaios de células cultivadas (KAMATA *et al.*, 2011).

A combinação destes ensaios, RYA e *E-screen*, permite estimar a afinidade de diferentes compostos ao RE humano, bem como explorar as possíveis consequências fisiológicas dessa interação (GARCIA-REYERO *et al.*, 2004).

1.6. Atividade antibacteriana

A resistência bacteriana emerge como um problema mundial de saúde pública atraindo a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Organização Mundial de Saúde (OMS), Centros de Prevenção e Controle de Doenças (CDC), associações de controladores de infecções hospitalares, além da indústria farmacêutica internacional (PASKOVATY *et al.*, 2005; HAMBRAEUS, 2006; BECKER *et al.*, 2006).

Dos 2 milhões de pessoas que adquirem infecções bacterianas nos hospitais dos Estados Unidos a cada ano, 70% dos casos envolvem cepas que são resistentes a pelo menos um fármaco. Um motivo de grande preocupação no Reino Unido é a resistência do *Staphylococcus aureus* à meticilina (penicilina β -lactâmica), que representa cerca de 50% de todos os isolados de *S. aureus* (CUSHNIE e LAMB, 2005).

No Brasil, segundo informações publicadas na edição de 8 de outubro de 2010 do jornal “*O Estado de São Paulo*”, uma bactéria resistente à maior parte dos antibióticos disponíveis no mercado causou um surto de infecção hospitalar no Distrito Federal. Segundo dados da Secretaria de Saúde do Distrito Federal, pelo menos 18 mortes teriam ocorrido em decorrência da contaminação por uma mutação da bactéria *Klebsiella pneumoniae*, que tem demonstrado ser resistente aos tratamentos comumente utilizados (http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20101008/not_imp622176,0.php).

Frente a este contexto, diversas iniciativas têm sido propostas com a finalidade de prevenir ou minimizar a referida situação (FISHMAN, 2006), além de um investimento substancial e pesquisas com antimicrobianos para que uma crise de saúde pública seja evitada (CUSHNIE e LAMB, 2005).

Modificações estruturais de antimicrobianos conhecidos provou ser um meio eficaz de prolongar sua vida útil, entretanto as pesquisas que alteram a estrutura padrão

estão se esgotando. Dessa maneira, torna-se necessário o desenvolvimento de novas classes de drogas que atuam nos mesmos ou em alvos diferentes daqueles em uso atual (CUSHNIE e LAMB, 2005; 2011).

A investigação da potencialidade antimicrobiana de produtos vegetais é um item relevante na caracterização biológica de extratos vegetais, visto que as plantas produzem um vasto número de substâncias com potencial antimicrobiano na tentativa de adaptarem-se às agressões do meio ambiente (WILLIAMS, 2001; GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Muitos compostos como, por exemplo, os flavonoides são reconhecidos como substâncias com atividade antimicrobiana (LOGUERCIO *et al.*, 2005; LÓPEZ-LÁZARO, 2009).

Vários métodos podem ser utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*, sendo aplicados em estudos de triagem de novas substâncias bioativas, tais como a técnica de difusão em ágar, métodos de diluição em caldo em tubos e/ou microplacas, bioautografia, entre outros. Tais técnicas permitem a análise de vários compostos e diferentes espécies bacterianas concomitantemente (LANGFIELD *et al.*, 2004).

Um dos ensaios mais utilizado é o método de microdiluição. Esse ensaio microbiológico permite a diluição seriada de pequenas quantidades e/ou volumes de extratos ou substâncias isoladas em microplacas. Outro aspecto vantajoso desta metodologia é a possibilidade de se utilizar mais de uma substância-teste, bem como diferentes micro-organismos em um mesmo ensaio. Além disso, essa técnica é quantitativa, pois possibilita demonstrar qual a mínima concentração da substância a ser testada necessária para inibir o crescimento bacteriano (PALOMINO *et al.*, 2002; LANGFIELD *et al.*, 2004).

2. *Objetivos*

*“Que comece agora
E que seja permanente essa vontade de ir
além daquilo que me espera”.*

Caio Fernando Abreu

2.1. Objetivo geral

Em face do proeminente potencial farmacológico dos flavonoides, este trabalho teve como objetivo avaliar a mutagenicidade, antimutagenicidade, estrogenicidade, antiestrogenicidade, além do potencial antibacteriano dos compostos quercetina, kaempferol, luteolina, fisetina, galangina, crisina, flavona, 3-hidroxiavona, 5-hidroxiavona e 7-hidroxiavona.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade mutagênica dos flavonoides, por meio de ensaios de mutação gênica reversa com *S. typhimurium* (teste de Ames), utilizando as linhagens TA98, TA100 e TA102, em ausência e presença de metabolização;
- Avaliar a atividade antimutagênica dos flavonoides, por meio de ensaios de mutação gênica reversa com *S. typhimurium* (teste de Ames) contra a mutagenicidade induzida por agentes mutagênicos de ação direta e indireta, utilizando as linhagens TA98, TA100 e TA102, em ensaios com e sem ativação metabólica;
- Avaliar a atividade estrogênica dos flavonoides, utilizando o modelo experimental com leveduras recombinantes (teste RYA);
- Avaliar as atividades estrogênica e antiestrogênica dos flavonoides, através de ensaios de proliferação celular (*E-screen*) com células MCF-7/BUS;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos flavonoides pela técnica de diluição em microplacas, utilizando como parâmetro de avaliação a porcentagem de viabilidade bacteriana por meio da leitura espectrofotométrica;
- Investigar a relação entre a estrutura dos flavonoides com as atividades biológicas testadas.

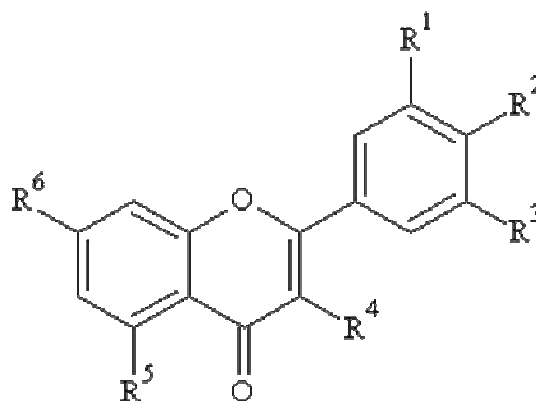
3. Material e Métodos

"Só uma coisa torna um sonho impossível: o medo de fracassar."

Paulo Coelho

3.1. Substâncias-teste

Quercetina, fisetina, kaempferol, luteolina, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona, 7-hidroxiflavona, crisina, galangina e flavona (Fig. 9) foram obtidas comercialmente pela Sigma-Aldrich (Brasil).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Quercetina	OH	OH	-	OH	OH	OH
Kaempferol	OH	-	-	OH	OH	OH
Fisetina	OH	OH	-	OH	-	OH
Luteolina	OH	OH	-	-	OH	OH
Crisina	-	-	-	-	OH	OH
Galangina	-	-	-	OH	OH	OH
Flavona	-	-	-	-	-	-
3- hidroxiflavona	-	-	-	OH	-	-
5- hidroxiflavona	-	-	-	-	OH	-
7- hidroxiflavona	-	-	-	-	-	OH

Figura 9 – Padrão de hidroxilação dos flavonoides avaliados

3.2. Teste de Ames

3.2.1. Linhagens de *S. typhimurium*

Foram utilizadas as linhagens TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*, gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, EUA, com e sem ativação metabólica. A cepa TA98 apresenta mutação no gene *hisD* (*hisD3052*) que codifica para a histidinol desidrogenase, apresentando como ponto preferencial para a reversão oito resíduos repetitivos de GC e detecta compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA (*frameshift*). A

mutação *hisG46* presente na cepa TA100 ocorre no gene que codifica a primeira enzima do processo de biossíntese da histidina, através da substituição do códon selvagem GGG (CCC) – prolina – por GAG (CAT) – leucina. Assim, essa cepa detecta agentes mutagênicos que ocasionam substituições, principalmente neste par G-C. A cepa TA102 contém a mutação *ochre* TAA no gene *hisG* e detecta eficientemente mutágenos que causam danos oxidativos e agentes *cross-link* (MARON e AMES, 1983).

3.2.2. Verificação das características genéticas das cepas de *S. typhimurium*

As características genéticas das cepas de *S. typhimurium* foram checadas rotineiramente, antes do preparo dos estoques para congelamento. A dependência da histidina, presença de mutação *rfa*, presença de deleção *uvrB*, presença de plasmídios de resistência e taxa de reversão espontânea foram verificadas de acordo com Maron e Ames (1983).

3.2.3. Manutenção e estoque das cepas de *S. typhimurium*

As cepas de *S. typhimurium* ficaram estocadas em viais criogênicos (2,0 mL), e mantidas à -70 C para que se mantivessem inalteradas todas as suas características genéticas. Para cada 0,9 mL de cultura foi adicionado 0,1 mL de dimetilsufóxido (DMSO - Sigma - Aldrich) que é um crioprotetor.

3.2.4. Preparo dos inóculos de *S. typhimurium*

Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubada a 37°C, por 12-16 horas, em *shaker* incubador (37°C – 160 rpm), de modo a obter uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/ mL.

3.2.5. Meios de cultura e soluções

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron e Ames (1983).

A composição e o preparo dos meios de cultura e soluções estão descritos no anexo I desse trabalho. Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave a 121° C por 15 minutos quando não especificado.

3.2.6. Preparo da mistura de S9

Foi utilizada a fração microssomal S9 homogeneizada de fígado de rato Sprague Dawley (fração pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas, aroclor 1254- 500 mg/kg). A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. O sistema de ativação metabólica consiste de 4% de fração S9, 1% de 0,4 M de cloreto de magnésio, 1% de 1,65 M de cloreto de potássio, 0,5% de 1 M de glicose-6-fosfato e 4% de 0,1 M de b-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1 M, além de 50% de 0,2 M de tampão fosfato pH 7,4 e 39,5% de água destilada estéril (MARON e AMES, 1983). Essa mistura foi mantida em banho de gelo durante todo o ensaio. Todas as soluções foram preparadas sempre a fresco e utilizadas num período máximo de 3 horas.

3.2.7. Ensaio de mutagenicidade

De acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983), cinco diferentes concentrações dos compostos, quercetina, kaempferol, crisina, fisetina, flavona, luteolina, galangina, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona e 7-hidroxi-flavona, dissolvidos em DMSO, foram avaliadas. As concentrações foram selecionadas com base em testes preliminares de toxicidade. A toxicidade foi evidenciada pela redução no número de revertentes His⁺ ou como um crescimento de fundo (*background*) nas placas teste de ágar mínimo.

As concentrações variaram de 2,6 a 185,0 nM/ placa para a galangina e 12,1 a 225,0 nM/ placa para os outros flavonoides. Foram adicionados às concentrações dos compostos, 0,5 mL de 0,2 M de tampão fosfato ou 0,5 mL de 4% de mistura S9 e 0,1 mL de cultura de bactérias, e então incubados a 37 °C por 20 - 30 minutos. Em seguida, foram adicionados à mistura 2 mL de *top agar* suplementado com traços de histidina e biotina. Homogeinizou-se levemente e plaqueou-se em meio mínimo glicosado. Após solidificação do *top agar*, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse

período, as colônias revertentes foram contadas manualmente (Fig. 10). O ensaio foi realizado em triplicata.

Os agentes mutagênicos padrões utilizados para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa em experimentos sem a mistura S9 foram NPD (10 µg / placa) para TA98, AZS (1,25 µg / placa) para TA100 e mitomicina C (MMC - 0,5 µg / placa) para TA102. 2-aminoantraceno (2-AA - 1,25 µg / placa) foi utilizado para TA98 e TA100 e 2-aminofluoreno (2-AF - 10 µg/ placa), para TA102 nos experimentos de ativação metabólica. DMSO foi utilizado como controle (solvente) negativo (75 uL / placa).

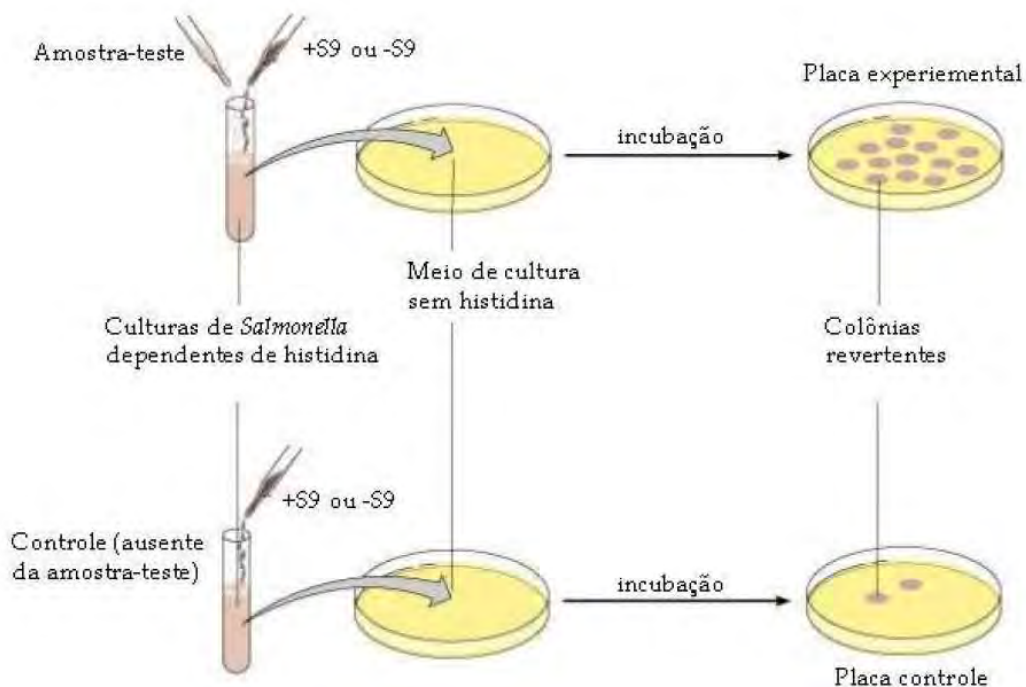


Figura 10 – Esquema do Teste de Ames. +S9 e -S9 significam presença e ausência do sistema de ativação metabólica, respectivamente (Fonte: modificado de Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings).

3.2.8. Análise dos resultados

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA), adotando o

modelo de Bernstein *et al.* (1982). Os dados (revertentes/ placa) foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido de uma regressão linear. O índice de mutagenicidade (IM) também foi calculado para cada concentração testada, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{número de revertentes/ placa com o composto-teste (revertentes induzidas)}}{\text{número de revertentes/ placa com o controle (solvente) negativo}}$$

A amostra foi considerada mutagênica quando houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos e/ ou quando o IM foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

3.2.9. Ensaios de antimutagenicidade

Os ensaios de antimutagenicidade foram realizados seguindo o mesmo procedimento do ensaio de mutagenicidade, exceto que os flavonoides, quercetina, kaempferol, galangina, crisina, fisetina, flavona, luteolina, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona e 7-hidroxi-flavona, foram associados a agentes mutagênicos conhecidos em ensaios com e sem ativação metabólica (Tabela 1). Neste estudo, como mutágenos diretos foram utilizados 10,0 µg/ placa de NPD para *S. typhimurium* TA98, 1,25 µg/ placa de AZS para *S. typhimurium* TA100 e 0,5 µg/ placa de MMC para *S. typhimurium* TA102, como mutágenos indiretos foram utilizados 1,0 µg/ placa de B[a]P para *S. typhimurium* TA98, 0,5 µg/ placa de AFB₁ para *S. typhimurium* TA100 e 1,25 µg/ placa de 2-AA para *S. typhimurium* TA102.

Todas as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, e o número de colônias revertentes por placa foi contado manualmente. O ensaio foi todo realizado em triplicata.

Os resultados dos ensaios de antimutagenicidade foram expressos em porcentagem de inibição, ou seja, a capacidade dos compostos para inibir a ação do agente mutagênico conhecido. O cálculo da porcentagem da inibição da mutagenicidade foi realizado de acordo com Loh *et al.* (2009):

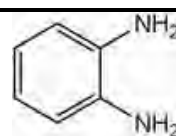
$$\text{Percentual (\%)} \text{ de inibição} = 100 - [(T / M) \times 100]$$

onde T é o número de revertentes na placa contendo mutágeno e compostos, e M é o número de revertentes na placa contendo apenas o mutágeno.

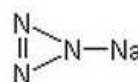
A ausência de efeito antimutagênico foi considerada quando um valor inferior a 25% foi obtido, um efeito moderado, quando um valor entre 25% e 40% foi obtido, e forte antimutagenicidade em valores superiores a 40% (NEIGI *et al.*, 2003; LIRA *et al.*, 2008).

Tabela 1 – Estruturas químicas dos agentes mutagênicos utilizados

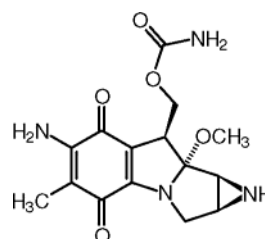
4 -nitro-*o*-fenilenodiamina (NPD)



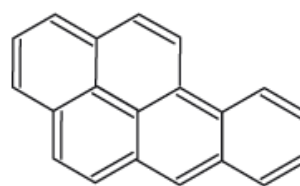
Azida sódica (AZS)



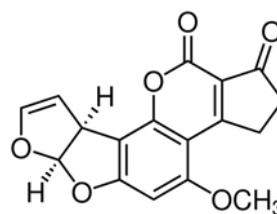
Mitomomicina C (MMC)



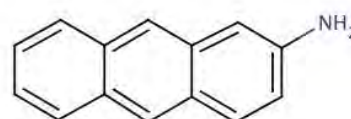
Benzo[*a*]pireno (B[*a*]P)



Aflatoxina B₁ (AFB₁)



2-aminoantraceno (2-AA)



3.2.10. Teste de viabilidade

A viabilidade celular foi também determinada para cada experimento de antimutagênese para avaliar o potencial efeito bactericida dos mutágenos. Para o desenvolvimento do teste de viabilidade procedeu-se da mesma maneira para o método de pré-incubação em placas, ou seja, misturou-se num tubo de ensaio o mutágeno, a bactéria, o tampão (ou S9) e a amostra a ser testada. Além disso, foram feitos o controle espontâneo de cada linhagem (tampão + bactéria) e o controle negativo (tampão ou S9 + DMSO + bactéria). Após homogeneizar em vortex, o conteúdo de cada tubo foi adicionado em tubos com 9 mL de solução fisiológica estéril a fim de se obter uma diluição de 1:10. Em seguida, foi homogeneizado e 1 mL transferido para outro tubo com mesma quantidade de solução fisiológica, procedendo dessa maneira diluições seriadas até obter-se uma diluição de 1×10^{-5} . Do tubo contendo a diluição de 1×10^{-5} e 1×10^{-4} retirou-se 0,1 mL e semeou-se com alça de Drigalsky em placas com ágar nutriente, em seguida incubou-se por 24 horas a 37°C. Decorrido este período, as colônias foram contadas e calculadas as unidades formadoras de colônias (UFC)/ mL (UFC = diluição x número de colônias x 10). O percentual de viabilidade para cada tratamento foi comparado com o número de colônias do controle negativo. As respostas foram consideradas citotóxicas quando o porcentual de sobrevivência da amostra foi inferior a 60% do total observado para o controle negativo (VARGAS *et al.*, 1993; LIRA *et al.*, 2008).

3.3. Ensaio com leveduras recombinantes (RYA)

3.3.1. Linhagem e plasmídeos

Para a realização do experimento foi utilizada a linhagem BY4741 de *S. cerevisiae* (MATa *ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0*), obtida da EUROSCARF, Frankfurt, Alemanha, transformada com os plasmídeos pH5HE0 e pVitBX2 (GARCIA-REYERO *et al.*, 2001). O plasmídeo de expressão pH5HE0 contém o RE humano (GREEN e CHAMBON, 1991) clonado no vetor de expressão constitutivo de levedura, pAAH5 (SCHNEIDER e GUARENTE, 1991). O plasmídeo repórter pVITB2x é derivado do pSFLA-178K, que contém o promotor CYC1 que regula o gene da β-galactosidase em *Escherichia coli*. O plasmídeo repórter pVITB2x contém duas cópias

do elemento responsivo a estrógeno pseudo - palindrômico do gene da vitelogenina B₁ de *X. laevis* (5'-AGTCACTGTGACC-3') (GREEN e CHAMBON, 1991) inserido no sítio único KpnI de pSFLΔ-178K (GARCIA-REYERO *et al.*, 2004).

3.3.2. Meios de cultura e soluções

A composição e o preparo dos meios de cultura e soluções estão descritos no anexo II desse trabalho.

3.3.3. Preparo dos inóculos de *S. cerevisiae*

A levedura BY4741 foi descongelada do estoque à -70°C, semeada em meio mínimo sólido, suplementado com 0,1 g/ L de marcadores prototróficos necessários - histidina e metionina), utilizando a técnica de esgotamento por estrias e incubada a 30°C, por 2-3 dias para obtenção de colônias isoladas. A seguir, uma colônia isolada da placa de meio mínimo foi subcultivada em 3 mL de meio rico (YPD – *Yeast Nitrogen Base*) líquido por 16 horas. Então, 10 µL dessa cultura foram inoculados em 30 mL de meio mínimo líquido, o qual foi incubado a 30°C por aproximadamente 14 horas. A cultura final foi ajustada a uma densidade óptica (DO_{600nm}) de 0,1 (NOGUEROL *et al.*, 2006).

3.3.4. Controles

Como controle negativo foi utilizado o solvente da amostra (DMSO à 10%) e como controle positivo foi utilizado 17-β-estradiol (Sigma Aldrich - Brasil) a uma concentração final de 10 nM. Além disso, foram incluídos um controle de toxicidade pela adição de 10 nM de 17-β-estradiol em uma amostra com um fator de diluição de 1:30.

3.3.5. Ensaios de estrogenicidade (RYA)

O teste de RYA foi realizado essencialmente como descrito em Garcia-Reyero *et al.* (2005). A cultura final ajustada a uma densidade óptica (DO) de 0,1 foi dividida em 90 µL na primeira linha e 50 µL em outros poços de uma placa de microtitulação de

polipropileno de 96 poços (NUNC, Roskilde, Dinamarca), previamente siliconada. 10 μL dos compostos, quercetina, kaempferol, crisina, fisetina, flavona, luteolina, galangina, 3-hidroxiavona, 5-hidroxiavona e 7-hidroxiavona, a uma concentração inicial de 0,125 g/L, foram adicionados na primeira linha, e posteriormente submetidas à diluição seriada, transferindo-se sequencialmente 25 μL do poço anterior para o próximo, para que no final todos os poços contenham 50 μL e diferentes diluições das amostras, com fatores de diluição de 1:10, 1:30, 1:90, 1:270 e 1:810. Cinco concentrações foram testadas, em triplicata. As placas foram incubadas por 6 horas a 30°C, sob agitação suave.

Após a incubação, 50 μL de tampão de lise (Y-PER, Pierce, Rockford, IL, EUA) foram adicionados a cada poço e novamente incubados a 30°C por 30 minutos.

Posteriormente, 50 μL de solução tampão foram adicionados às células lisadas. A solução tampão foi preparada misturando 100 mL de tampão Z, 1 mL de Triton X-100 (Sigma), 1 mL de SDS (dodecilo sulfato de sódio) 10%, 70 μL de 2-mercaptoetanol (Fluka) e 21 mg de MuGal (Sigma).

Após uma breve centrifugação, as placas foram lidas em um espectrofluorímetro em comprimentos de onda de 355 nm de excitação e 460 nm de emissão. A fluorescência foi gravada por 20 minutos (uma medição por minuto) e os valores da atividade da β -galactosidase foram calculados pelo aumento das unidades de fluorescência em relação ao tempo, através da metodologia de regressão linear, de acordo com a seguinte equação (CÉSPEDES *et al.*, 2005):

$$\text{Unidades de } \beta\text{-galactosidase: } \frac{1000 \times A_{420}}{A_{600} (t_f - t_o)}$$

onde t_o e t_f representam os tempos iniciais e finais de incubação de cada substância com MuGal e A_{420} e A_{600} representam os valores de absorbância a 420 e 600 nm, respectivamente para cada poço. Uma concentração de 0,034 nM de 17- β -estradiol foi relatada como o nível de detecção de 17- β -estradiol (NOGUEROL *et al.*, 2006).

3.3.6. Cálculo de equivalentes de estradiol (EEQ):

A estrogenicidade total de uma determinada amostra pode ser prevista a partir de uma combinação linear das concentrações avaliadas. Para as diluições seriadas dos compostos, foram traçados fatores de diluição versus resposta relativa, na qual o valor da concentração efetiva mediana (EC_{50}) aparente corresponde à diluição (valores reais ou valores previstos), dando 50% da resposta para 10 nM de 17- β -estradiol. Os valores EC_{50} aparentes (um mínimo de duas réplicas com pelo menos quatro pontos cada) foram calculados usando métodos padrões de regressão não-linear (CÉSPEDES *et al.*, 2005). Esses valores foram convertidos para EEQ, assumindo que correspondem à EC_{50} de estradiol (CÉSPEDES *et al.*, 2004).

EEQ é definido como a concentração de estradiol necessária para obter a mesma resposta que a amostra no ensaio RYA. Para traduzir os resultados a partir das diluições seriadas para EEQ, assumimos que as curvas dose-resposta hormonais seguem uma função sigmoideal:

$$\frac{R - R_0}{R_{\max} - R_0} = \frac{1}{1 + \frac{K_d}{[L]}}$$

onde R_0 representa as unidades de β -galactosidase obtidas sem ligante (ou substância-teste), R as unidades de β -galactosidase obtidas na concentração do ligante (L) e R_{\max} as unidades de β -galactosidase obtidas na concentração do ligante saturante. K_d representa a constante de dissociação do complexo hormônio-ligante, e seu valor coincide com o EC_{50} , a concentração de ligante que tenha 50% da resposta máxima (CÉSPEDES *et al.*, 2005).

3.4. Ensaio de proliferação celular (*E-screen*)

3.4.1. Linhagem celular

A linhagem empregada para a realização dos experimentos foi o clone BUS das células MCF-7, gentilmente cedidas pelo laboratório de Investigações Biomédicas do Departamento de Medicina Ambiental da Universidade de Granada (Espanha), uma vez

que essas células possuem maior expressão de receptores e, portanto, maior potencial de resposta às substâncias estrogênicas (SCHILIRÒ *et al.*, 2011). As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modification of Eagle's médium* - Sigma - Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell) e repicadas semanalmente por tripsinização até um máximo de 10 passagens.

3.4.2. Meios de cultura e soluções

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de proliferação celular foram preparados de acordo com as especificações de Rasmussen e Nielsen (2002).

A composição e o preparo dos meios de cultura e soluções estão descritos no anexo III desse trabalho. O meio utilizado para a cultura de células foi o DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, constituindo o denominado “meio de cultura completo”.

Nos repiques, utilizou-se tampão PBS “*Phosphate Buffered Saline*” e solução ATV (solução de tripsina 0,2% + versene 0,2%, Instituto Adolfo Lutz), diluída 1:1 com PBS.

Durante os ensaios de proliferação, foi usado o meio DMEM sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro fetal bovino, tratado com carvão ativado e dextrana T-70, para remoção de estrógenos endógenos.

No ensaio colorimétrico da sulforadamina B, foram usadas solução de ácido tricloroacético 10%, solução de sulforodamina B 0,4% em ácido acético 1%, solução de ácido acético 1% e tampão Tris base (10 mM).

3.4.3. Tripsinização das culturas celulares

Após remoção do meio de cultura, as células foram lavadas usando-se PBS e desprendidas da superfície interna do frasco de cultura utilizando-se 0,5 mL de ATV. Após o desprendimento das células, 1,5 mL de meio de cultura completo foi adicionado ao frasco para a inativação do ATV e homogeneizado. Uma pequena quantidade de células foi, então, colocada em cultivo em novos frascos de cultura de 25 cm² (Corning Incorporated, Acton MA, USA) contendo 5 mL de meio de cultura completo, e

submetidas às condições padronizadas de incubação (37°C, em atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de saturação de umidade) até a preparação da próxima subcultura.

3.4.4. Preparo dos estoques celulares

O estoque foi feito a partir de uma subcultura normal, entre o terceiro e quarto repique. As células foram tripsinizadas e mantidas estocadas em vias criogênicas (2 mL) em uma solução de congelamento composta de 50% de meio de cultura (DMEM), 40% de soro bovino fetal e 10% de DMSO. O congelamento procedeu-se gradativamente, ou seja, -20°C por 3 h, -70°C por 3 h e nitrogênio líquido (-195°C) para estocagem definitiva.

3.4.5. Descongelamento dos estoques celulares

O vial criogênico retirado do nitrogênio líquido permaneceu em temperatura ambiente até que seu conteúdo estivesse completamente descongelado. Este conteúdo foi colocado em um tubo de centrifuga estéril (Corning Incorporated, Acton MA, USA - 15 mL) contendo 5 mL de meio de cultura completo e submetido à centrifugação por 3 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e, ao *pellet*, foi acrescentado 2 mL de meio de cultura completo. A suspensão celular foi transferida em um novo frasco contendo 5 mL de meio de cultura completo, o qual foi incubado nas condições previamente descritas.

3.4.6. Remoção de estrógenos endógenos

A remoção de estrógenos endógenos foi por meio do tratamento do soro fetal bovino com carvão-dextrana. A técnica consistiu em incubar 500 mL de soro a 56°C (banho-maria) por 1 hora para a inativação das proteínas plasmáticas. Aproximadamente 25 g (5% do volume total de soro) de carvão ativado (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) foi adicionado a 240 mL de água destilada e aliqotado em tubos de centrifuga em um volume de 40 mL cada um. A suspensão foi submetida à centrifugação (3000 rpm por 10 minutos). Esse procedimento foi repetido 3 vezes com água. Os sobrenadantes de lavagem foram descartados e substituídos pelo mesmo volume de uma solução de dextrana T70 (0,5% do volume total de soro),

utilizando os mesmos tubos de centrífuga. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o soro a ser tratado foi adicionado ao carvão-dextrana em cada tubo de centrífuga. A mistura carvão soro foi submetida à incubação a 37°C, sob agitação, por 1 hora. Após a centrifugação, o sobrenadante foi esterilizado através de membrana filtrante de 0,22 µm (Millipore) e estocado a -70°C até o momento do uso (SOTO *et al.*, 1995).

3.4.7. Preparo das substâncias-teste

Cada substância foi inicialmente dissolvida em DMSO a uma concentração de 1×10^{-1} M (solução estoque). A partir da solução estoque foram feitas diluições seriadas para obtenção das concentrações 1×10^{-9} a 1×10^{-3} M, utilizando meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro livre de estrógenos para avaliação da citotoxicidade e da estrogenicidade. A concentração máxima de solvente na cultura celular não excedeu a 0,1%, uma concentração conhecida que não provoca efeito sobre a viabilidade celular (SCHILIRÒ *et al.*, 2011).

3.4.8. Ensaio de citotoxicidade

As células foram tripsinizadas, submetidas à contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) e semeadas em placas de 96 poços (Corning), a uma concentração inicial de 2×10^3 células/ poço, em 100 µL de meio de cultura completo. A aderência das células à placa ocorreu durante 24 horas e após esse período, o meio de cultura foi removido. As células foram lavadas com 100 µL de PBS.

O controle negativo consistiu em meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro livre de estrógenos e o controle positivo foi doxorubicina (DXR – 20 µg/ mL). Foi realizado também o controle solvente (0,01 % de DMSO, máxima concentração de solvente utilizada no teste) e o controle do meio (meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal).

As amostras foram submetidas à diluição seriada na própria placa, em concentrações que variaram de 1×10^{-9} a 1×10^{-3} M, utilizando meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro livre de estrógenos. Foram realizados 3 experimentos independentes, com 3 replicatas para cada concentração.

A viabilidade celular foi avaliada após 6 dias usando o ensaio colorimétrico da sulforodamina B (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA) (SKEHAN *et al.*, 1990, RASMUSSEN e NIELSEN, 2002).

A absorbância encontrada para o controle negativo, ou seja, para as células crescidas na ausência dos compostos-teste ou do controle positivo, corresponde ao valor de 100% de sobrevivência. Foram consideradas citotóxicas as concentrações das amostras que promoveram viabilidade celular inferior a 80%.

3.4.9. Ensaio de estrogenicidade e antiestrogenicidade (*E-screen*)

O *E-screen* foi inicialmente descrito por Soto *et al.* (1992) e modificado por Villalobos *et al.* (1995).

As células foram tripsinizadas, submetidas à contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) e semeadas em placas de 24 poços (Corning), a uma concentração inicial de 2×10^4 células/ poço, em 1 mL de meio de cultura completo. A aderência das células à placa ocorreu durante 24 horas e após esse período, o meio de cultura foi removido. As células foram lavadas com 1 mL de PBS.

O controle negativo consistiu em meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro livre de estrógenos e o controle positivo foi o 17- β -estradiol (1×10^{-8} M). Foi realizado também o controle solvente (0,01 % de DMSO, máxima concentração de solvente utilizada no teste) e o controle do meio (meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal). A concentração de 17- β -estradiol foi selecionada com base em uma curva dose-resposta elaborada com concentrações que variaram de 1×10^{-13} a 1×10^{-7} M, em três replicatas.

As amostras foram submetidas à diluição seriada na própria placa, em concentrações que variaram de 1×10^{-9} a 1×10^{-5} M, utilizando meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro livre de estrógenos. O meio DMEM sem vermelho de fenol foi utilizado, pois foi demonstrado que esse indicador de pH possui atividade estrogênica (BERTHOIS *et al.*, 1986). As concentrações foram selecionadas a partir de testes preliminares de toxicidade. Foram realizados 3 experimentos independentes, com 3 replicatas para cada concentração.

Após 6 dias de incubação, a placa foi submetida à técnica colorimétrica de sulforodamina B para a determinação da proliferação celular.

A preparação do ensaio de anti-estrogenicidade consistiu na mesma sequência de procedimentos para o ensaio de estrogenicidade, sendo acrescentada, antes da incubação, a concentração de 1×10^{-8} M/ poço de uma solução de 17- β -estradiol. Após incubação por 6 dias, os mesmos procedimentos de leitura foram realizados e os parâmetros de proliferação calculados para verificar a capacidade das substâncias de inibir a ação do 17- β -estradiol *in vitro*.

3.4.10. Ensaio colorimétrico da sulforodamina B

O teste de citotoxicidade e estrogenicidade adotado baseia-se na coloração das proteínas pelo corante sulforodamina B. Este corante possui dois grupos sulfônicos e liga-se às proteínas das células fixadas na placa. A técnica colorimétrica de sulforodamina B consiste na substituição do meio de cultura ao final dos tempos de incubação por 200 μ L (para placa de 96 poços) ou 2 mL (para a placa de 24 poços) de ácido tricloroacético 10%, para fixação das células. As placas foram incubadas por 1 hora, a 4°C, na ausência de luz, e, posteriormente lavadas cinco vezes com água gelada e deixadas em repouso para secagem. Em seguida, adicionou-se às placas 200 μ L (para placa de 96 poços) ou 2 mL (para a placa de 24 poços) de sulforodamina B e novamente foram incubadas por meia hora em temperatura ambiente. O excesso de sulforodamina B foi removido por meio da lavagem das placas com ácido acético 1%, sendo estas deixadas em repouso para secagem. O corante foi dissolvido com Tris base e a absorbância foi determinada a 530 nm.

3.4.11. Análise dos dados

Os resultados da atividade estrogênica foram expressos em média \pm desvio padrão do efeito proliferativo (EP), que estabelece a taxa máxima de proliferação induzida pela substância em células MCF7/BUS. Esse parâmetro é obtido pela razão entre a taxa de proliferação apresentada pela substância avaliada ou pelo 17- β -estradiol e aquela apresentada pelo controle solvente (0,01% de DMSO):

$$EP = \text{absorbância do composto} / \text{absorbância do controle negativo}$$

O efeito proliferativo relativo (EPR), usado para comparar a proliferação induzida pelo 17- β -estradiol com aquela induzida pelo composto-teste, também foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{EPR} = (\text{EP-1 (composto-teste)} / \text{EP-1 (17-}\beta\text{-estradiol)}) \times 100$$

Os compostos foram considerados agonistas totais quando os valores de EPR foram maiores que 80% em pelo menos uma das concentrações testadas, agonistas parciais entre 25 e 80% e não estrogênicos quando os valores de EPR foram inferiores a 25% (KUCH *et al.*, 2010). Para os cálculos desses parâmetros foram utilizadas fórmulas e funções do Excel (Microsoft, NY, U.S.A.).

Com relação à atividade antiestrogênica, os resultados obtidos foram submetidos ao programa estatístico Graph Pad Prism 5 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) à análise de variância ANOVA (assumindo $p < 0,05$) seguida pelo pós-teste de Dunnett para comparação com o grupo controle (1×10^{-8} M de 17- β -estradiol).

3.5. Atividade antibacteriana

3.5.1. Preparo das substâncias

Os flavonoides, quercetina, kaempferol, crisina, fisetina, flavona, luteolina, galangina, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona e 7-hidroxi-flavona foram solubilizados em DMSO e preparados para o uso em uma concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em caldo Müller-Hinton (CMH - Difco). A concentração final de solvente (DMSO) não ultrapassou a 5% do volume final/ poço.

3.5.2. Meios de cultura e soluções

A composição e o preparo dos meios de cultura e soluções estão descritos no anexo IV desse trabalho.

3.5.3. Amostras bacterianas

Para os ensaios microbiológicos foram utilizadas as amostras bacterianas de *Staphylococcus aureus* (Fig. 11) ATCC 25923 (Gram positiva) e de *Escherichia coli* (Fig. 11) ATCC 25922 (Gram negativa).

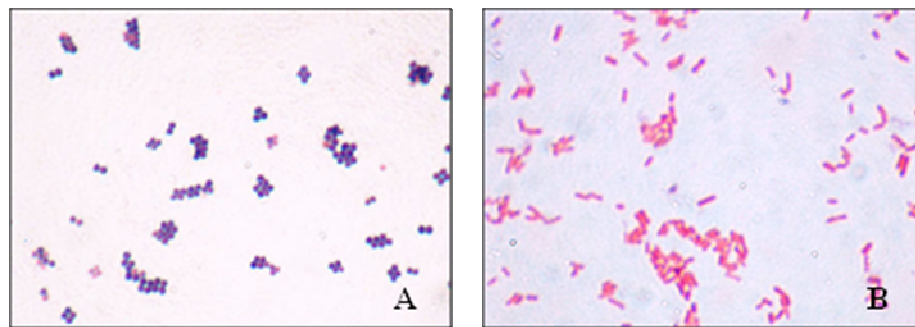


Figura 11 - Fotomicrografia óptica de *Staphylococcus aureus* (A) e *Escherichia coli* (B) (Coloração de Gram; aumento de 1000x)

3.5.4. Estocagem e manutenção das amostras bacterianas

As amostras bacterianas foram mantidas em CMH acrescido de 20% de glicerol a -20°C . Para o uso, foram repicadas em 2 mL de CMH e incubadas por 24 horas a 37°C , para padronização do inóculo.

3.5.5. Padronização da suspensão bacteriana

As culturas bacterianas de 24 horas foram transferidas ao PBS e ajustada a turbidez com a escala 0,5 de McFarland, seguida de leitura espectrofotométrica a 620 nm até obtenção de absorbância entre 0,08 a 0,10 ($1,0 \times 10^8$ UFC/ mL). Posteriormente a suspensão foi diluída na proporção 1:10 para obter-se a concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/ mL, que foi, então, utilizado nos ensaios (NCCLS, 2003).

3.5.6. Controle positivo

Como controle positivo, utilizou-se uma solução de cloridrato de ciprofloxacino à concentração final de 35 µg/ mL, por ser um agente antibacteriano fluoroquinolona de amplo espectro, que inibem principalmente a enzima DNA girase bacteriana (WISEMAN e BALFOUR, 1994). Para garantir a especificidade do teste foi elaborada uma curva dose-resposta de cloridrato de ciprofloxacino para as duas espécies bacterianas testadas com concentrações que variaram de $4,17 \times 10^{-6}$ a $1,75 \times 10^1$ µg/ mL.

3.5.7. Ensaio de atividade antibacteriana

Método de diluição em microplaca com determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (NCCLS, 2003)

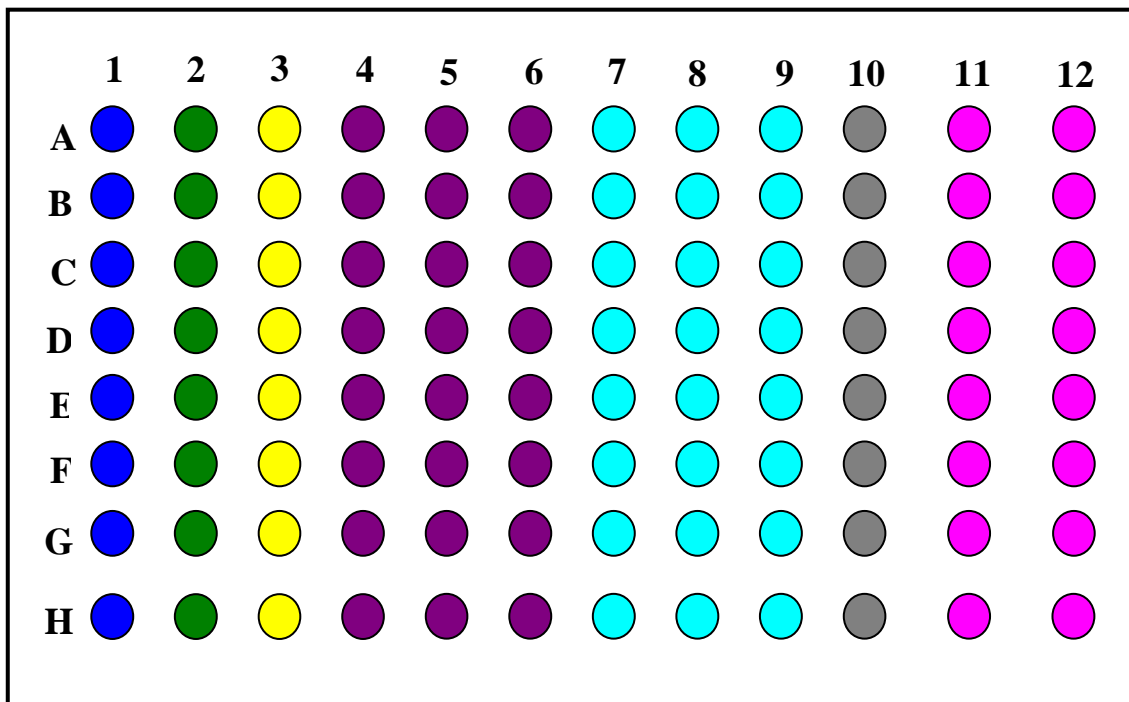
A avaliação da atividade antibacteriana e determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram realizadas de acordo com a metodologia de microdiluição descrita segundo a norma M7-A6 da *Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003).

Os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de CMH e em seguida acrescidos de 100µL das soluções das substâncias-teste no primeiro poço para realização da diluição seriada de 500 a 3,9 µg/ mL. Subsequentemente, foram distribuídos 20 µL das suspensões dos micro-organismos em cada poço, exceto nos poços que correspondem ao branco - apenas CMH e nos poços de controle das substâncias.

Além das substâncias-teste, foram realizados controle positivo (cloridrato de ciprofloxacino), controle de esterilidade do meio, controle de crescimento bacteriano, controle de cor e esterilidade da amostra e controle negativo/ solvente (5% de DMSO).

As microplacas foram incubadas à 37°C por 24 horas e após esse período foi realizada a leitura visual do crescimento bacteriano e leitura espectrofotométrica em 620 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo que em cada microplaca foram testados duas substâncias-teste em triplicata.

A Figura 12 esquematiza a realização do teste em microplacas.



- **Coluna 1:** Meio de cultura CMH
- **Coluna 2:** Meio de cultura + bactérias
- **Coluna 3:** Controle positivo, meio de cultura + antibiótico + bactérias
- **Colunas 4 a 6:** Testes, meio de cultura + substâncias-teste + bactérias
- **Colunas 7 a 9:** Testes, meio de cultura + substâncias-teste + bactérias
- **Coluna 10:** Controle negativo, meio de cultura + 5% de DMSO
- **Colunas 11 e 12:** Controle das substâncias

Figura 12 - Esquema de organização das unidades experimentais empregadas no teste de microplacas para avaliação da atividade antibacteriana dos flavonoides, frente aos micro-organismos

3.5.8. Leitura espectrofotométrica

Após incubação as microplacas foram submetidas à leitura espectrofotométrica. A CIM foi determinada para cada cepa bacteriana, como a menor concentração da amostra que inibe completamente o crescimento mensurável ($A_{620} = 0$) (GUDIÑA *et al.*, 2010).

A determinação da viabilidade bacteriana para cada micro-organismo foi calculada através da média da absorbância de três determinações por concentração de

substância testada e subtraída do valor da absorbância obtida para cada concentração de substância sem a adição do inóculo, para que assim possa ser obtido o valor real de absorbância de bactérias, sem interferência das substâncias-teste. O resultado assim obtido foi, então, convertido em porcentagem de viabilidade bacteriana, utilizando como 100% de viabilidade o valor médio da absorbância obtida nos poços de controle de crescimento, conforme apresenta a equação:

$$\text{Crescimento bacteriano (\%)} = \frac{\text{Abs T} - \text{Abs ST}}{\text{Abs Cb}} \times 100$$

onde Abs T = absorbância do teste; Abs ST = absorbância da substância teste (sem inóculo); Abs Cb = absorbância do controle de crescimento bacteriano.

4. Resultados

“Lembre-se de que colheremos, infalivelmente, aquilo que houvermos semeado. Se estamos sofrendo é por que estamos colhendo os frutos amargos das sementeiras errôneas do passado. Fique alerta quanto ao momento presente! Plante apenas sementes de otimismo e de amor, para colher amanhã os frutos doces da alegria e da felicidade. Cada um colhe, exatamente, aquilo que plantou.”

“Minutos de Sabedoria”, de Carlos Torres Pastorino

4.1. Atividade mutagênica

A Tabela 2 mostra a média do número de revertentes/ placa (M), o desvio padrão (DP) e o índice de mutagenicidade (IM) após os tratamentos com diferentes flavonoides, observados em linhagens TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*, na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica.

Na ausência de metabolização, apenas a quercetina foi mutagênica, com um índice de mutagenicidade superior a 2,0 a partir da concentração de 24,5 nM/ placa na linhagem TA98 (Tabela 2), e sua mutagenicidade aumenta na presença de ativação metabólica, de uma maneira dose-dependente. Na linhagem TA100, a quercetina também induziu um aumento no número de colônias revertentes em relação ao controle negativo em experimentos sem ativação metabólica, com índice de mutagenicidade de 2,0 na concentração de 98,4 nM/ placa, indicando mutagenicidade direta também nesta linhagem. Na TA102, a mutagenicidade da quercetina não foi detectada na ausência de ativação metabólica, mas em sua presença um efeito mutagênico foi observado. Nas linhagens TA100 e TA102, em experimentos com S9, os maiores índices de mutagenicidade encontrados foram 3,16 e 2,11, respectivamente (Tabela 2). De acordo com as linhagens envolvidas, a quercetina induz substituição de pares de bases (TA100, TA102) e, a uma taxa muito mais elevada, mutações do tipo *frameshift* (TA98).

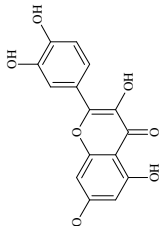
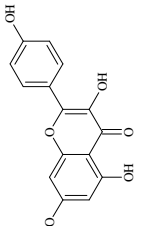
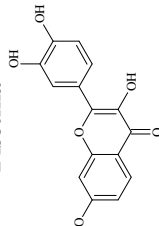
Kaempferol também mostrou um aumento dose-dependente de revertentes na linhagem TA98, induzindo mutações do tipo *frameshift*, na presença da mistura S9. Sem ativação metabólica, o kaempferol, não induziu um aumento de revertentes nas linhagens testadas (Tabela 2).

As linhagens de *S. typhimurium* foram bastante sensíveis aos efeitos tóxicos da galangina, e foi necessário diminuir as doses. Na verdade, a menor dose utilizada nos experimentos com os outros flavonoides, estava perto da maior dose utilizada com galangina (Tabela 2). As concentrações de galangina variaram de 2,6 - 30,7 nM/ placa.

Galangina demonstrou ser mutagênica apenas na linhagem TA98, na presença da mistura S9 (Tabela 2).

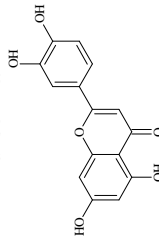
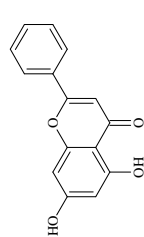
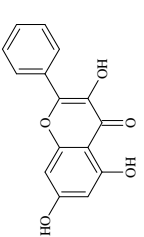
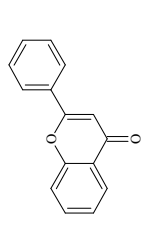
Nenhum dos outros flavonoides (luteolina, fisetina, flavona, crisina, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona e 7-hidroxi-flavona) foi mutagênico, nas condições utilizadas neste estudo (Tabela 2).

Tabela 2- Atividade mutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/placa e o índice de mutagenicidade (IM - valor entre parênteses) nas linhagens TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium* tratadas com os flavonóides (quercetina, kaempferol, luteolina, fisetina, galangina, crisina, flavona, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona), em várias doses, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica

Tratamentos	Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM						
	TA 98		TA 100		TA 102		
Quercetina 	nM/placa	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
0,0 ^a	53 ± 8	39 ± 1	115 ± 3	206 ± 5	273 ± 15	248 ± 3	
12,1	81 ± 0,6*	136 ± 5**	134 ± 8	320 ± 2*	279 ± 8	305 ± 1	(1,2)
24,5	115 ± 6**	196 ± 4**	178 ± 6	389 ± 4**	302 ± 4	351 ± 13	(1,5)
49,1	172 ± 1**	393 ± 7**	202 ± 3**	492 ± 5**	331 ± 6	446 ± 11**	(1,1)
98,4	135 ± 11**	658 ± 10**	227 ± 2**	651 ± 4**	324 ± 3	471 ± 1**	(1,2)
147,8	197 ± 4**	794 ± 5**	212 ± 5**	642 ± 5**	310 ± 6	524 ± 6**	(1,2)
C +	1347 ± 51 ^b	1567 ± 47 ^c	1582 ± 102 ^c	1456 ± 67 ^e	1656 ± 89 ^d	1932 ± 93 ^f	(1,1)
Kaempferol 	nM/placa	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
0,0 ^a	58 ± 2	39 ± 1	106 ± 4	206 ± 53	235 ± 4	248 ± 3	
14,3	54 ± 5	141 ± 7**	131 ± 1	286 ± 15	287 ± 4	336 ± 8	(1,0)
29,0	56 ± 4	172 ± 3**	146 ± 2	313 ± 5	258 ± 6	367 ± 7	(1,4)
58,0	53 ± 1	199 ± 8**	143 ± 4	369 ± 4**	301 ± 9	430 ± 5**	(1,1)
116,4	58 ± 2	205 ± 3**	130 ± 6	384 ± 12**	305 ± 9	418 ± 8	(1,3)
174,7	62 ± 3	177 ± 4**	138 ± 3	400 ± 18**	242 ± 9	473 ± 13**	(1,3)
C +	1324 ± 61 ^b	1567 ± 47 ^c	1457 ± 53 ^c	1456 ± 67 ^e	1473 ± 119 ^d	1932 ± 93 ^f	(1,0)
Fisetina 	nM/placa	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
0,0 ^a	50 ± 4	32 ± 1	116 ± 1	190 ± 1	264 ± 3	291 ± 8	
14,3	50 ± 1	41 ± 1	157 ± 7	209 ± 7	341 ± 11	333 ± 8	(1,0)
29,0	52 ± 3	44 ± 2	142 ± 1	233 ± 6	334 ± 2	346 ± 10	(1,1)
58,0	57 ± 1	40 ± 1	175 ± 6	232 ± 2	372 ± 4	348 ± 11	(1,0)
116,4	58 ± 2	40 ± 2	133 ± 3	224 ± 8	472 ± 16**	364 ± 15	(1,2)
174,7	60 ± 1	36 ± 1	131 ± 3	232 ± 4	339 ± 15	387 ± 7	(1,1)
C +	1425 ± 81 ^b	1634 ± 88 ^c	1325 ± 91 ^c	1721 ± 72 ^e	1689 ± 72 ^d	1789 ± 90 ^f	(1,2)

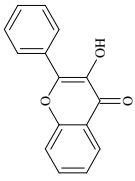
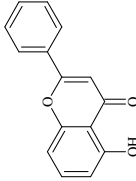
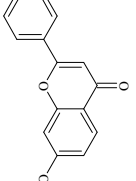
continuação

continuação

Luteolina		0,0^a	49 ± 3	39 ± 1	141 ± 2	206 ± 5	265 ± 2	248 ± 3
		14,3	37 ± 2 (0,8)	33 ± 2 (0,8)	117 ± 3 (0,8)	226 ± 8 (1,1)	288 ± 6 (1,1)	264 ± 2 (1,1)
		29,0	45 ± 5 (0,9)	38 ± 3 (1,0)	129 ± 3 (0,9)	249 ± 10 (1,2)	282 ± 1 (1,1)	310 ± 7 (1,2)
		58,0	40 ± 3 (0,8)	35 ± 2 (0,9)	107 ± 3 (0,8)	253 ± 11 (1,2)	299 ± 16 (1,1)	380 ± 4 (1,5)
		116,4	45 ± 4 (0,9)	31 ± 3 (0,8)	150 ± 8 (1,1)	188 ± 5 (0,9)	340 ± 6 (1,3)	387 ± 6* (1,6)
		174,7	48 ± 1 (1,0)	27 ± 1 (0,7)	148 ± 5 (1,0)	198 ± 13 (1,0)	288 ± 5 (1,1)	404 ± 3* (1,6)
	C +		1376 ± 67 ^b	1567 ± 47 ^c	1276 ± 72 ^c	1456 ± 67 ^e	1767 ± 41 ^d	1932 ± 93 ^f
Crisina		0,0^a	49 ± 3	39 ± 1	156 ± 3	206 ± 5	235 ± 2	248 ± 3
		16,1	34 ± 5 (0,7)	34 ± 3 (0,9)	154 ± 2 (1,0)	222 ± 10 (1,1)	253 ± 4 (1,1)	305 ± 3 (1,2)
		32,6	40 ± 2 (0,8)	38 ± 2 (1,0)	141 ± 3 (0,9)	268 ± 7 (1,3)	298 ± 8 (1,3)	259 ± 2 (1,0)
		65,3	37 ± 2 (0,7)	33 ± 1 (0,8)	144 ± 2 (0,9)	274 ± 10 (1,3)	265 ± 5 (1,1)	233 ± 10 (0,9)
		131,0	44 ± 1 (0,9)	35 ± 3 (0,9)	151 ± 4 (1,0)	278 ± 15 (1,3)	282 ± 2 (1,2)	232 ± 6 (0,9)
		196,7	49 ± 1 (1,0)	32 ± 2 (0,8)	124 ± 5 (0,8)	254 ± 3 (1,2)	230 ± 7 (1,0)	231 ± 14 (0,9)
	C +		1376 ± 67 ^b	1567 ± 47 ^c	1579 ± 95 ^c	1456 ± 67 ^e	1377 ± 67 ^d	1932 ± 93 ^f
Galangina		0,0^a	22 ± 3	26 ± 1	208 ± 13	165 ± 1	144 ± 1	172 ± 5
		2,6	22 ± 2 (1,0)	34 ± 5 (1,3)	238 ± 2 (1,1)	209 ± 4 (1,3)	155 ± 4 (1,1)	144 ± 9 (0,8)
		5,1	23 ± 2 (1,0)	43 ± 2* (1,6)	235 ± 3 (1,1)	207 ± 4 (1,3)	150 ± 4 (1,0)	162 ± 3 (0,9)
		10,2	23 ± 2 (1,0)	55 ± 3** (2,1)	233 ± 9 (1,1)	196 ± 5 (1,2)	148 ± 7 (1,0)	158 ± 6 (0,9)
		20,5	25 ± 4 (1,1)	57 ± 3** (2,1)	209 ± 9 (1,0)	177 ± 7 (1,1)	143 ± 1 (1,0)	151 ± 3 (0,9)
		30,7	26 ± 2 (1,2)	58 ± 3** (2,2)	199 ± 7 (1,0)	161 ± 9 (1,0)	127 ± 2 (0,9)	112 ± 7 (0,6)
	C +		1329 ± 66 ^b	1422 ± 81 ^c	1498 ± 45 ^c	1667 ± 39 ^e	1733 ± 77 ^d	1980 ± 91 ^f
Flavona		0,0^a	35 ± 2	32 ± 1	173 ± 5	190 ± 1	313 ± 6	291 ± 8
		18,4	36 ± 2 (1,0)	38 ± 2 (1,2)	182 ± 2 (1,0)	221 ± 1 (1,2)	282 ± 3 (0,9)	350 ± 4 (1,2)
		37,3	34 ± 3 (1,0)	37 ± 2 (1,2)	174 ± 2 (1,0)	196 ± 4 (1,0)	251 ± 4 (0,8)	369 ± 7 (1,3)
		74,7	38 ± 1 (1,1)	36 ± 1 (1,1)	179 ± 1 (1,0)	208 ± 2 (1,1)	212 ± 7 (0,7)	414 ± 3 (1,4)
		149,8	35 ± 3 (1,0)	31 ± 2 (1,0)	144 ± 5 (0,8)	205 ± 4 (1,1)	136 ± 2 (0,4)	470 ± 8* (1,6)
		225,0	46 ± 2 (1,3)	23 ± 2 (0,7)	106 ± 4 (0,6)	207 ± 5 (1,1)	109 ± 3 (0,3)	525 ± 6** (1,8)
	C +		1217 ± 72 ^b	1634 ± 88 ^c	1219 ± 65 ^c	1721 ± 72 ^e	1617 ± 60 ^d	1789 ± 90 ^f

continuação

continuação

3- hidroxiflavona		0,0 ^a	50 ± 2	32 ± 1	194 ± 8	190 ± 1	235 ± 13	291 ± 8
17,2	17,2	17,2	50 ± 4 (1,0)	39 ± 3 (1,2)	196 ± 6 (1,0)	235 ± 3 (1,2)	216 ± 11 (0,9)	308 ± 5 (1,1)
34,8	34,8	34,8	43 ± 6 (0,8)	36 ± 3 (1,1)	207 ± 5 (1,1)	196 ± 2 (1,0)	207 ± 19 (0,8)	308 ± 7 (1,1)
69,7	69,7	69,7	38 ± 7 (0,8)	34 ± 2 (1,1)	192 ± 5 (1,0)	192 ± 8 (1,0)	214 ± 8 (0,9)	334 ± 4 (1,1)
139,8	139,8	139,8	48 ± 10 (0,9)	34 ± 2 (1,1)	217 ± 2 (1,1)	204 ± 6 (1,1)	212 ± 10 (0,9)	348 ± 3 (1,2)
209,9	209,9	209,9	53 ± 1 (1,0)	27 ± 3 (0,8)	196 ± 5 (1,0)	212 ± 12 (1,1)	222 ± 16 (0,9)	348 ± 7 (1,2)
C +	C +	C +	1337 ± 92 ^b	1634 ± 88 ^c	1523 ± 85 ^c	1721 ± 72 ^e	1384 ± 82 ^d	1789 ± 90 ^f
5- hidroxiflavona		0,0 ^a	32 ± 1	32 ± 1	177 ± 2	190 ± 1	306 ± 8	291 ± 8
17,2	17,2	17,2	32 ± 2 (1,0)	26 ± 1 (0,8)	166 ± 3 (0,9)	202 ± 10 (1,1)	290 ± 7 (0,9)	353 ± 4 (1,2)
34,8	34,8	34,8	36 ± 2 (1,1)	28 ± 2 (0,9)	156 ± 3 (0,9)	208 ± 17 (1,1)	303 ± 5 (1,0)	361 ± 8 (1,2)
69,7	69,7	69,7	30 ± 2 (0,9)	29 ± 3 (0,9)	185 ± 3 (1,0)	203 ± 6 (1,1)	296 ± 4 (1,0)	391 ± 8 (1,3)
139,8	139,8	139,8	44 ± 2 (1,4)	31 ± 1 (1,0)	166 ± 3 (0,9)	206 ± 1 (1,1)	285 ± 4 (0,9)	405 ± 10 (1,4)
209,9	209,9	209,9	34 ± 2 (1,1)	31 ± 4 (1,0)	142 ± 4 (0,8)	193 ± 8 (1,0)	265 ± 6 (0,9)	438 ± 6 (1,5)
C +	C +	C +	1237 ± 61 ^b	1634 ± 88 ^c	1211 ± 72 ^c	1721 ± 72 ^e	1877 ± 52 ^d	1789 ± 90 ^f
7- hidroxiflavona		0,0 ^a	50 ± 2	32 ± 1	136 ± 8	190 ± 1	229 ± 7	291 ± 8
17,2	17,2	17,2	57 ± 4 (1,1)	30 ± 4 (0,9)	124 ± 3 (0,9)	211 ± 5 (1,1)	246 ± 25 (1,1)	344 ± 6 (1,2)
34,8	34,8	34,8	56 ± 3 (1,1)	35 ± 3 (1,1)	121 ± 5 (0,9)	190 ± 9 (1,0)	270 ± 22 (1,2)	344 ± 5 (1,2)
69,7	69,7	69,7	55 ± 8 (1,1)	36 ± 1 (1,1)	145 ± 6 (1,1)	205 ± 4 (1,1)	249 ± 13 (1,1)	345 ± 4 (1,2)
139,8	139,8	139,8	65 ± 2 (1,3)	36 ± 1 (1,1)	143 ± 4 (1,0)	197 ± 8 (1,0)	246 ± 16 (1,1)	351 ± 13 (1,2)
209,9	209,9	209,9	54 ± 4 (1,1)	39 ± 3 (1,2)	132 ± 18 (1,0)	177 ± 2 (0,9)	244 ± 16 (1,1)	369 ± 2 (1,3)
C +	C +	C +	1337 ± 92 ^b	1634 ± 88 ^c	1398 ± 51 ^c	1721 ± 72 ^e	1277 ± 57 ^d	1789 ± 90 ^f

*P < 0,05 (ANOVA); **P < 0,01 (ANOVA), M ± DP = média e desvio padrão; ^aControle negativo: DMSO, dimetilsulfóxido: 75 µL/placa;Controle positivo (Ctrl +): ^b4-nitro-*o*-fenilenodiamino (NPD – 10,0 µg/ placa – TA98); ^cAzida Sódica (AZS – 1,25 µg/placa – TA100);^dMitomicina C (MMC – 0,5 µg/ placa – TA102), em ausência de S9 e ^e2-aminoantraceno (2-AA – 1,25 µg/ placa – TA98, TA100); ^f2-aminofluoreno (2-AF – 10 µg/ placa – TA102), na presença de S9.

4.2. Atividade antimutagênica

Os resultados obtidos a partir de estudos sobre o potencial antimutagênico dos flavonoides quercetina, kaempferol, galangina, luteolina, fisetina, crisina, flavona, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. Os resultados foram expressos como média do número de revertentes/ placa (M), desvio padrão (SD) e porcentagem de inibição da atividade mutagênica dos mutágenos NPD e B[a]P, na linhagem TA 98, AZS e AFB₁, na linhagem TA100 e MMC e 2-AA, na linhagem TA102 de *S. typhimurium*.

Quando os flavonoides foram associados com o NPD, os resultados mostraram que a fisetina foi o único composto que não exibiu qualquer efeito protetor. Em experimentos com ativação metabólica para a linhagem TA98, a atividade antimutagênica dos flavonoides testados contra mutações induzidas pelo B[a]P apresentou pequenas diferenças. A mutagenicidade do B[a]P foi significativamente reduzida por todos os compostos, exceto pela quercetina, que ao contrário dos outros compostos potencializou o efeito mutagênico do B[a]P (Tabela 3).

Os flavonoides luteolina e crisina reduziram a resposta mutagênica da AZS e da AFB₁ na linhagem TA100 em experimentos sem e com ativação metabólica, respectivamente. Já os compostos 3-hidroxi-flavona e 7-hidroxi-flavona exibiram um efeito protetor moderado contra AZS, enquanto os compostos kaempferol e galangina reduziram o número de colônias revertentes induzidas pela AFB₁ (Tabela 3).

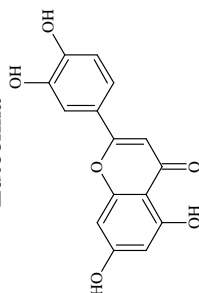
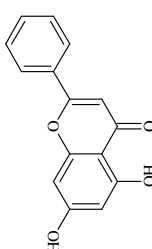
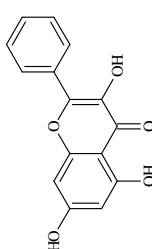
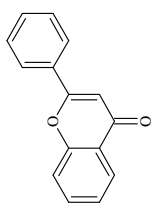
No que diz respeito à interação com MMC na linhagem TA102 sem S9, um efeito antimutagênico foi observado pelos flavonoides kaempferol, luteolina, 3-hidroxi-flavona e 7-hidroxi-flavona. Com relação ao mutágeno indireto 2-AA, todos os compostos demonstraram propriedades antimutagênicas na linhagem 102 em ensaios com S9, exceto o kaempferol e a flavona (Tabela 4).

Tabela 3 - Atividade antimutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e a porcentagem de inibição na linhagem TA98 e TA100 de *S. typhimurium* tratadas com os flavonoides (quercetina, kaempferol, galangina, luteolina, fisetina, crisina, flavona, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona), em várias doses, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica

Tratamentos		Número de revertentes (M ± DP)/ placa e % de inibição							
		TA98			TA100				
nM/placa		- S9	% de inibição	+ S9	% de inibição	- S9	% de inibição	+ S9	% de inibição
Quercetina		NPD		B[α]P		AZS		AFB₁	
C +		1770,7 ± 49,7		684,0 ± 28,8		1410,7 ± 35,3		1122,7 ± 36,8	
12,1		482,7 ± 63,3	72,7***	623,0 ± 68,2	8,9*	1133,3 ± 56,9	19,7*	1050,7 ± 52,3	6,4*
24,5		590,7 ± 47,6	66,6***	950,5 ± 65,2	-	1117,3 ± 26,0	20,8*	1109,3 ± 69,1	1,2*
49,1		456,0 ± 54,2	74,2***	879,9 ± 50,7	-	1160,0 ± 18,5	17,8*	1064,0 ± 48,0	5,2*
98,4		493,3 ± 59,0	72,1***	2055,2 ± 23,2	-	1186,7 ± 38,6	15,9*	..917,3 ± 48,7	18,3*
147,8		472,0 ± 63,2	73,3***	2119,4 ± 61,7	-	1168,0 ± 42,6	17,2*	870,0 ± 29,5	22,5*
Kaempferol									
C +		1770,7 ± 49,7		684,0 ± 28,8		1410,7 ± 35,3		1122,7 ± 36,8	
14,3		769,3 ± 75,7	56,6***	186,3 ± 77,3	72,8***	1080,0 ± 40,6	23,4*	1082,7 ± 29,2	3,6*
29,0		580,0 ± 31,7	67,2***	234,4 ± 69,3	65,7***	1142,0 ± 34,1	19,0*	821,3 ± 40,3	26,8***
58,0		633,3 ± 66,7	64,2***	250,5 ± 41,0	63,4***	1154,7 ± 49,7	18,1*	864,0 ± 43,7	23,0***
116,4		584,0 ± 78,8	67,0***	172,6 ± 71,7	74,8***	1169,3 ± 40,3	17,1*	606,7 ± 68,0	46,0***
174,7		552,0 ± 62,4	68,8***	148,5 ± 61,7	78,3***	1162,7 ± 44,8	17,6*	454,7 ± 48,3	59,5***
Fisetina									
C +		947,0 ± 38,2		689,3 ± 21,9		1048,0 ± 32,7		1049,3 ± 38,3	
14,3		940,0 ± 19,1	0,7*	492,5 ± 47,9	28,6**	980,0 ± 25,1	6,5*	873,3 ± 28,9	16,8*
29,0		866,0 ± 15,1	8,5*	430,5 ± 17,0	37,6**	934,3 ± 25,0	10,8*	977,0 ± 48,8	6,9*
58,0		826,0 ± 23,6	12,8*	432,1 ± 29,8	37,3**	929,3 ± 61,2	11,3*	953,3 ± 20,1	9,1*
116,4		802,7 ± 25,2	15,2*	370,1 ± 12,7	46,3***	873,3 ± 63,5	16,7*	982,7 ± 16,2	6,4*
174,7		758,7 ± 28,7	19,9*	351,0 ± 45,6	49,1***	884,0 ± 30,2	15,6*	958,7 ± 28,3	8,6*

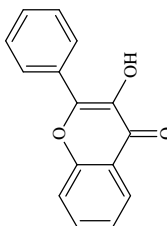
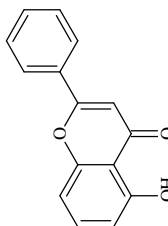
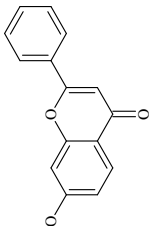
continuação

continuação

Luteolina 	C +	1160,3 ± 42,7	689,3 ± 21,9	1048,0 ± 32,7	1060,0 ± 76,6	10,9*
	14,3	908,0 ± 48,9	146,9 ± 22,9	78,7***	868,0 ± 49,2	17,2*
	29,0	837,3 ± 64,4	196,1 ± 36,4	71,5***	841,3 ± 18,5	19,7*
	58,0	798,0 ± 38,0	171,5 ± 15,4	75,1***	773,3 ± 42,8	26,2***
	116,4	726,7 ± 36,3	181,9 ± 28,6	73,6***	724,0 ± 12,0	30,9***
174,7	674,7 ± 26,6	160,4 ± 35,1	76,7***	717,3 ± 22,0	31,6***	42,5***
Crisina 	C +	1280,0 ± 46,1	689,3 ± 21,9	1048,0 ± 32,7	1060,0 ± 76,6	11,3*
	16,1	774,7 ± 24,4	160,4 ± 26,1	76,7***	951,3 ± 36,5	9,2*
	32,6	880,0 ± 38,6	158,8 ± 12,7	77,0***	929,3 ± 60,2	11,3*
	65,3	724,7 ± 53,2	154,9 ± 35,3	77,5***	877,3 ± 34,2	16,3*
	131,0	748,7 ± 39,0	102,4 ± 22,6	85,1***	834,7 ± 25,1	20,4*
196,7	667,0 ± 49,5	126,3 ± 13,6	81,7***	666,7 ± 44,2	36,4***	32,1**
Galangina 	C +	1770,7 ± 49,7	684,0 ± 28,8	1410,7 ± 35,3	1122,7 ± 36,8	-
	2,6	718,7 ± 79,5	327,5 ± 37,4	52,1***	1384,0 ± 45,1	1,9*
	5,1	852,0 ± 21,0	333,2 ± 50,6	51,3***	1353,3 ± 32,9	4,1*
	10,2	568,0 ± 73,3	295,4 ± 28,4	56,8***	1338,7 ± 52,4	5,1*
	20,5	604,0 ± 26,0	244,1 ± 39,0	64,3***	1362,7 ± 44,1	3,4*
30,7	629,3 ± 71,7	285,8 ± 47,9	58,2***	1380,0 ± 22,6	2,2*	15,9*
Flavona 	C +	1280,0 ± 46,1	689,3 ± 21,9	1048,0 ± 32,7	1049,3 ± 38,3	31,1**
	18,4	1012,7 ± 17,0	268,4 ± 12,7	61,1***	829,3 ± 43,9	20,9*
	37,3	1066,0 ± 43,4	212,0 ± 23,6	69,2***	805,3 ± 37,5	23,2*
	74,7	958,7 ± 30,6	225,5 ± 20,0	67,3***	866,7 ± 69,9	17,3*
	149,8	849,3 ± 44,2	206,5 ± 18,4	70,0***	890,7 ± 54,3	15,0*
225,0	844,0 ± 40,6	173,1 ± 25,0	74,9***	924,7 ± 47,3	11,8*	5,2*

continuação

continuação

	C +	1280,0 ± 46,1	25,6**	689,3 ± 21,9	1048,0 ± 32,7	5,0*	1049,3 ± 38,3	6,0*
3-hidroxiflavona	17,2	952,7 ± 42,2	38,1**	166,8 ± 6,6	996,0 ± 65,8	75,8***	986,7 ± 59,9	6,1*
	34,8	792,3 ± 54,1	44,7***	163,6 ± 20,3	964,0 ± 28,0	76,3***	985,3 ± 30,1	13,6*
	69,7	707,7 ± 26,7	46,8***	156,4 ± 11,9	864,0 ± 28,8	77,3***	906,7 ± 22,3	7,1*
	139,8	680,7 ± 23,7	57,5***	158,0 ± 15,5	814,7 ± 15,1	77,1***	974,7 ± 36,1	9,7*
	209,9	544,0 ± 34,1		135,8 ± 19,5	725,3 ± 11,5	80,3***	948,0 ± 34,2	
5-hidroxiflavona	C +	1280,0 ± 46,1	42,9***	689,3 ± 21,9	1048,0 ± 32,7		1049,3 ± 38,3	
	17,2	730,7 ± 14,7	44,8***	294,6 ± 17,1	957,3 ± 28,9	57,3***	1028,0 ± 25,0	2,0*
	34,8	706,0 ± 19,6	46,7***	221,6 ± 27,1	928,0 ± 58,9	67,9***	1041,3 ± 16,2	0,8*
	69,7	682,0 ± 36,1	48,9***	179,5 ± 10,6	882,7 ± 65,2	74,0***	909,3 ± 38,3	13,3*
	139,8	654,0 ± 38,3	54,3***	146,1 ± 25,9	916,0 ± 32,0	78,8***	848,0 ± 34,0	19,2*
	209,9	585,3 ± 49,0		132,6 ± 16,7	912,7 ± 27,0	80,8***	869,3 ± 24,4	17,2*
7-hidroxiflavona	C +	1280,0 ± 46,1	41,0***	689,3 ± 21,9	1048,0 ± 32,7		1049,3 ± 38,3	
	17,2	755,3 ± 23,9	44,8***	171,5 ± 18,0	909,3 ± 22,7	75,1***	929,3 ± 34,0	11,4*
	34,8	706,3 ± 71,5	45,5***	123,1 ± 28,7	888,0 ± 46,1	82,1***	941,3 ± 28,4	10,3*
	69,7	697,0 ± 48,2	50,9***	127,1 ± 16,8	865,3 ± 37,2	81,6***	877,3 ± 29,5	16,4*
	139,8	628,0 ± 39,4		133,4 ± 13,6	854,7 ± 23,4	80,6***	904,0 ± 28,8	13,9*
	209,9	616,0 ± 24,2		135,0 ± 29,3	760,0 ± 45,4	80,4***	972,0 ± 17,4	7,4*

M ± DP = média e desvio padrão; Controle positivo (C +): 4-nitro-*o*-fenilenediamino (NPD – 10,0 µg/ placa – TA98) e azida sódica (AZS – 1,25 µg/ placa – TA100) em ausência de S9 e benzo[*a*]pireno (B[*a*]P – 1,0 µg/ placa – TA 98) e aflatoxina B₁ (AFB₁ – 0,5 µg/ placa – TA 98) na presença de S9.

* Efeito não-antimutagênico (< 25% de inibição)

** Efeito moderado (25% > 40% de inibição)

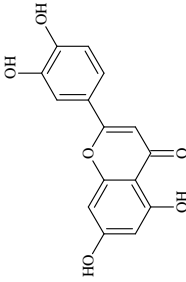
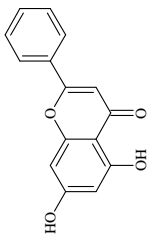
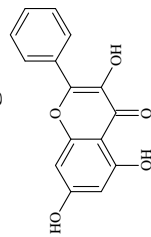
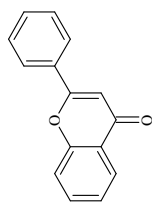
*** Efeito forte (> 40% de inibição)

Tabela 4 - Atividade antimutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e a porcentagem de inibição na linhagem TA102 de *S. typhimurium* tratadas com os flavonoides (quercetina, kaempferol, galangina, luteolina, fisetina, crisina, flavona, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona), em várias doses, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica

Tratamentos		Número de revertentes (M ± DP)/ placa e % de inibição TA102			
nM/placa	-S9	% de inibição	+S9	% de inibição	
Quercetina					
C+	MMC		2-AA		
	2292,0 ± 81,9		1292,0 ± 49,6		
12,1	2365,3 ± 44,1	-	1149,3 ± 30,3	11,0*	
24,5	2304,0 ± 69,7	-	1112,0 ± 46,5	13,9*	
49,1	1973,3 ± 32,0	13,9*	933,3 ± 32,3	27,8**	
98,4	1922,7 ± 79,4	16,1*	893,3 ± 44,1	30,9**	
147,8	1970,7 ± 65,0	14,0*	762,7 ± 41,1	41,0***	
Kaempferol					
C+	2292,0 ± 81,9		1292,0 ± 49,6		
14,3	2282,7 ± 30,9	0,4*	1130,7 ± 89,5	12,5*	
29,0	2170,7 ± 44,9	5,3*	1069,3 ± 44,1	17,2*	
58,0	1578,7 ± 68,0	31,1**	1128,0 ± 36,7	12,7*	
116,4	1496,0 ± 32,2	34,7**	1058,7 ± 60,0	18,1*	
174,7	1269,3 ± 72,7	44,6***	1002,7 ± 71,7	22,4*	
Fisetina					
C+	2292,0 ± 81,9		1082,7 ± 56,8		
14,3	1970,7 ± 56,6	14,0*	445,3 ± 69,9	58,9***	
29,0	1946,7 ± 45,3	15,1*	350,7 ± 70,5	67,6***	
58,0	1800,0 ± 37,8	21,5*	365,3 ± 54,2	66,3***	
116,4	1864,0 ± 48,2	18,7*	322,7 ± 48,1	70,2***	
174,7	1786,7 ± 64,1	22,0*	368,0 ± 55,4	66,0***	

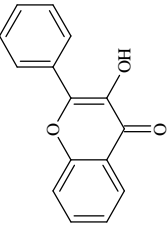
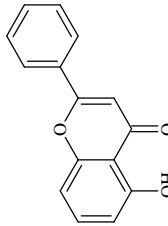
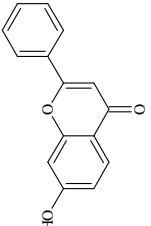
Continuação

continuação

Luteolina									
	C +	2292,0 ± 81,9		1292,0 ± 49,6					
	14,3	2034,7 ± 65,9	11,2*	549,3 ± 53,7	57,5***				
	29,0	1877,3 ± 59,8	18,1*	446,7 ± 60,6	65,4***				
	58,0	1688,0 ± 55,4	26,4**	308,0 ± 49,2	76,2***				
	116,4	1565,3 ± 52,7	31,7**	262,7 ± 48,2	79,7***				
	174,7	1514,7 ± 60,2	33,9**	302,7 ± 31,1	76,6***				
Crisina									
	C +	2292,0 ± 81,9		1292,0 ± 49,6					
	16,1	2144,0 ± 38,9	6,5*	349,3 ± 30,2	73,0***				
	32,6	1986,7 ± 65,4	13,3*	330,7 ± 23,4	74,4***				
	65,3	1957,3 ± 60,6	14,6*	228,0 ± 28,0	82,4***				
	131,0	2016,0 ± 51,2	12,0*	220,0 ± 26,9	83,0***				
	196,7	1964,0 ± 68,8	14,3*	149,3 ± 26,1	88,4***				
Galangina									
	C +	2292,0 ± 81,9		1292,0 ± 49,6					
	2,6	2216,0 ± 31,9	3,3*	404,0 ± 30,2	68,7***				
	5,1	1893,3 ± 37,7	17,4*	408,0 ± 22,6	68,4***				
	10,2	1877,3 ± 42,5	18,1*	353,3 ± 37,2	72,7***				
	20,5	1869,3 ± 52,6	18,4*	286,7 ± 21,2	77,8***				
	30,7	2010,7 ± 68,3	12,3*	226,7 ± 36,1	82,5***				
Flavona									
	C +	2292,0 ± 81,9		1082,7 ± 56,8					
	18,4	2256,0 ± 31,1	1,6*	864,0 ± 36,7	20,2*				
	37,3	1968,0 ± 42,3	14,1*	837,3 ± 68,0	22,7*				
	74,7	1917,3 ± 49,2	16,3*	826,7 ± 20,1	23,6*				
	149,8	2048,0 ± 63,5	10,6*	856,0 ± 24,2	20,9*				
	225,0	1906,7 ± 56,2	16,8*	832,0 ± 40,2	23,2*				

continuação

continuação

3-hidroxiflavona		C +	2292,0 ± 81,9	1082,7 ± 56,8	
		17,2	1909,3 ± 72,4	528,0 ± 42,3	51,2***
		34,8	1624,0 ± 59,8	498,7 ± 80,9	53,9***
		69,7	1557,3 ± 45,4	381,3 ± 74,3	64,8***
		139,8	1426,7 ± 55,4	408,0 ± 21,2	62,3***
		209,9	1360,0 ± 54,1	328,0 ± 34,9	69,7***
5-hidroxiflavona		C +	2292,0 ± 81,9	1082,7 ± 56,8	
		17,2	1984,0 ± 69,2	818,7 ± 25,3	24,4*
		34,8	1848,0 ± 51,7	738,7 ± 69,8	31,8**
		69,7	1976,0 ± 60,2	784,0 ± 73,3	27,6**
		139,8	1984,0 ± 63,5	690,7 ± 32,1	36,2**
		209,9	1960,0 ± 60,8	661,3 ± 41,4	38,9**
7-hidroxiflavona		C +	2292,0 ± 81,9	1082,7 ± 56,8	
		17,2	2040,0 ± 47,7	464,0 ± 73,3	57,1***
		34,8	2050,7 ± 41,1	424,0 ± 13,9	60,8***
		69,7	1917,3 ± 46,9	504,0 ± 20,8	53,4***
		139,8	1858,7 ± 74,8	376,0 ± 21,2	65,3***
		209,9	1706,7 ± 62,2	480,0 ± 28,8	55,7***

M ± DP = média e desvio padrão; Controle positivo (C +): Mitomicina C (MMC – 0,5 µg/ placa – TAI02) em ausência de S9 e 2-aminoantraceno (2-AA - 1,25 µg/ placa - TA 102) na presença de S9.

* Efeito não-antimutagênico (< 25% de inibição)

** Efeito moderado (25% > 40% de inibição)

*** Efeito forte (> 40% de inibição)

4.3. Atividade estrogênica (RYA)

Na Figura 13 estão representados os valores obtidos por meio do ensaio RYA expressos em EEQ (nM). O kaempferol foi o único composto que mostrou uma maior estimulação dos REs com 5,36 nM de EEQ. Os outros compostos não apresentaram níveis detectáveis de estrogenicidade.

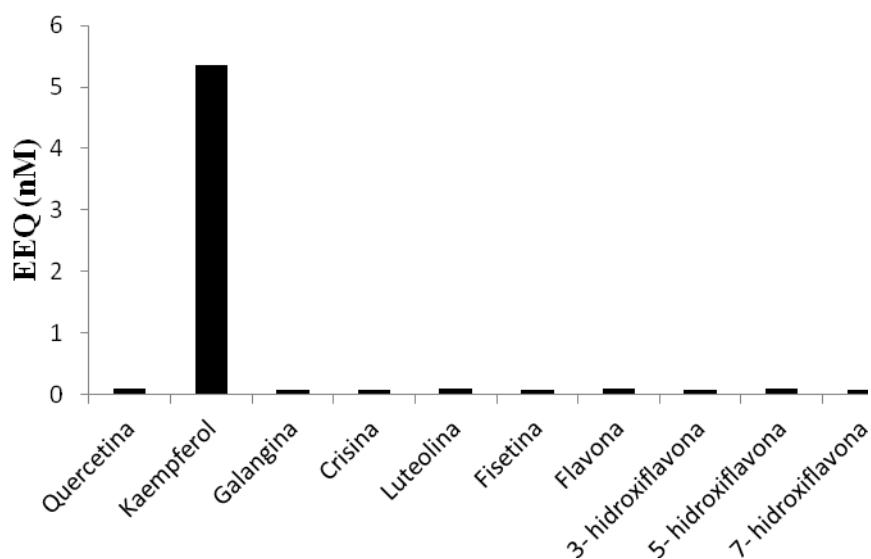


Figura 13 – Valores totais de estrogenicidade expressos em equivalentes de estradiol (EEQ)

A Figura 14 mostra a cinética de formação do produto fluorogênico para diferentes concentrações de kaempferol. Ao saturar as concentrações do substrato, a aparência do produto fluorescente seguiu uma correlação linear com o tempo, com uma inclinação equivalente aos valores da atividade β -galactosidase em unidades de fluorescência por minuto.

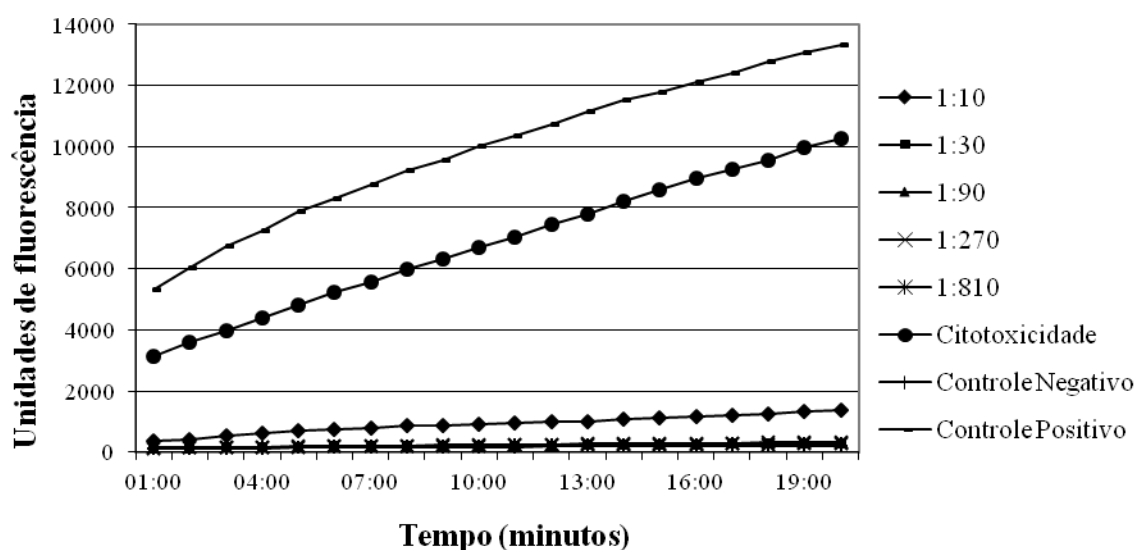


Figura 14 - Pontos lineares do aumento da fluorescência (em unidades de fluorescência) em relação ao tempo de diferentes concentrações de kaempferol no teste RYA. Os valores de atividade β -galactosidase foram calculados a partir da inclinação da reta por métodos de regressão linear. A fluorescência foi obtida por 20 minutos (uma medição por minuto).

4.4. Atividade estrogênica e antiestrogênica (*E-screen*)

Os efeitos do 17- β -estradiol e dos flavonoides quercetina, kaempferol, galangina, luteolina, fisetina, crisina, 3-hidroxiavona, 5-hidroxiavona, 7-hidroxiavona e flavona sobre a proliferação de células MCF-7/BUS estão apresentados na Tabela 5. Os resultados foram expressos em EP e EPR%. Os valores de EPR% indicam que os flavonoides foram capazes de induzir a proliferação celular quando comparado com o 17- β -estradiol (EPR = 100%).

O kaempferol foi o composto que apresentou maior capacidade de induzir o crescimento de células MCF-7/BUS com valor de EPR máximo de 85,3%, correspondendo dessa maneira a um agonista total. Já os compostos galangina, luteolina e fisetina correspondem à agonistas parciais com EPR máximo de 44%, 35,3% e 53,5%, respectivamente. Com relação aos compostos quercetina, crisina, 3-hidroxiavona, 5-hidroxiavona, 7-hidroxiavona e flavona nenhum efeito sobre a proliferação celular foi observado (Tabela 5).

Tabela 5 – Atividade estrogênica expressa pela média e desvio padrão do efeito proliferativo (EP) e o valor do efeito proliferativo relativo (EPR) dos flavonoides (quercetina, kaempferol, galangina, luteolina, fisetina, crisina, flavona, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona), em diferentes concentrações avaliada pelo ensaio *E-screen*

Concentrações (M)	Quercetina		Kaempferol	
	EP ^a	EPR	EP ^a	EPR
C +	1,41 ± 0,36	100	1,41 ± 0,36	100
1 x 10 ⁻⁹	0,92 ± 0,17	-	1,17 ± 0,48	42,2
1 x 10 ⁻⁸	0,76 ± 0,27	-	1,07 ± 0,39	16,1
1 x 10 ⁻⁷	0,83 ± 0,13	-	1,11 ± 0,48	27,1
1 x 10 ⁻⁶	0,89 ± 0,13	-	1,27 ± 0,52	66,8
1 x 10 ⁻⁵	0,77 ± 0,15	-	1,35 ± 0,26	85,3
	Galangina		Luteolina	
	EP ^a	EPR	EP ^a	EPR
C +	1,41 ± 0,36	100	1,41 ± 0,36	100
1 x 10 ⁻⁹	1,04 ± 0,13	9,2	1,14 ± 0,25	35,3
1 x 10 ⁻⁸	1,03 ± 0,13	8,3	1,13 ± 0,29	31,6
1 x 10 ⁻⁷	1,00 ± 0,11	0,8	1,08 ± 0,27	20,1
1 x 10 ⁻⁶	1,06 ± 0,17	15,0	1,09 ± 0,25	23,1
1 x 10 ⁻⁵	1,18 ± 0,39	44,0	1,11 ± 0,18	27,5
	Fisetina		Crisina	
	EP ^a	EPR	EP ^a	EPR
C+	1,41 ± 0,36	100	1,41 ± 0,36	100
1 x 10 ⁻⁹	1,15 ± 0,49	37,2	0,94 ± 0,13	-
1 x 10 ⁻⁸	1,12 ± 0,55	29,2	0,90 ± 0,14	-
1 x 10 ⁻⁷	1,11 ± 0,45	27,0	0,85 ± 0,16	-
1 x 10 ⁻⁶	1,22 ± 0,57	53,5	0,97 ± 0,12	-
1 x 10 ⁻⁵	1,14 ± 0,61	33,3	1,00 ± 0,04	1,0
	3-hidroxi-flavona		5-hidroxi-flavona	
	EP ^a	EPR	EP ^a	EPR
C+	1,41 ± 0,36	100	1,41 ± 0,36	100
1 x 10 ⁻⁹	0,91 ± 0,11	-	0,85 ± 0,26	-
1 x 10 ⁻⁸	0,87 ± 0,03	-	1,00 ± 0,09	-
1 x 10 ⁻⁷	0,79 ± 0,04	-	0,88 ± 0,23	-
1 x 10 ⁻⁶	0,83 ± 0,21	-	0,82 ± 0,21	-
1 x 10 ⁻⁵	0,56 ± 0,22	-	0,56 ± 0,18	-
	7-hidroxi-flavona		Flavona	
	EP ^a	EPR	EP ^a	EPR
C +	1,41 ± 0,36	100	1,41 ± 0,36	100
1 x 10 ⁻⁹	0,88 ± 0,08	-	0,99 ± 0,03	-
1 x 10 ⁻⁸	0,93 ± 0,06	-	0,95 ± 0,19	-
1 x 10 ⁻⁷	0,82 ± 0,17	-	0,97 ± 0,06	-
1 x 10 ⁻⁶	1,00 ± 0,02	0,6	0,93 ± 0,13	-
1 x 10 ⁻⁵	1,02 ± 0,06	4,9	0,67 ± 0,19	-

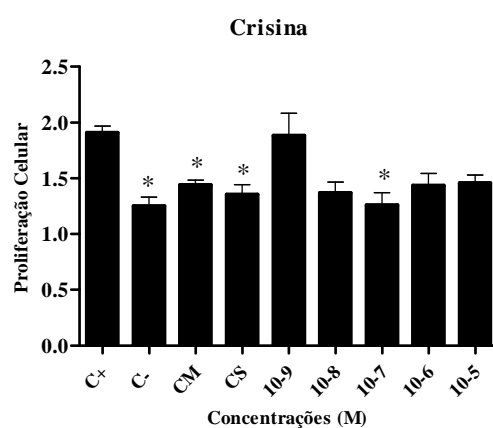
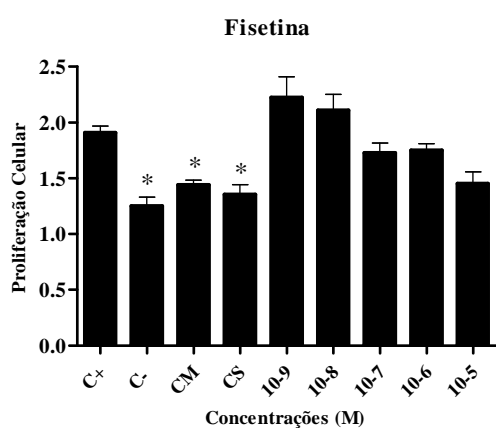
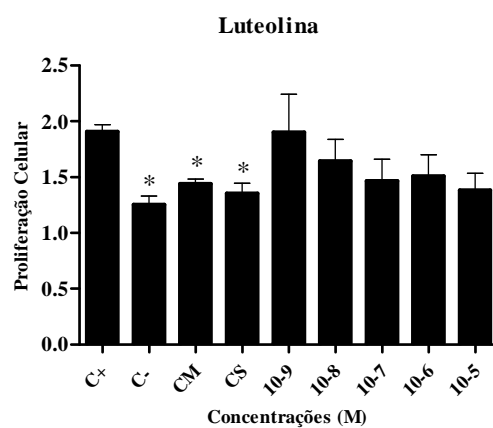
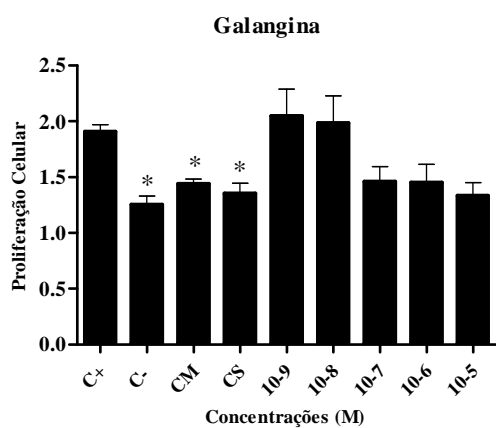
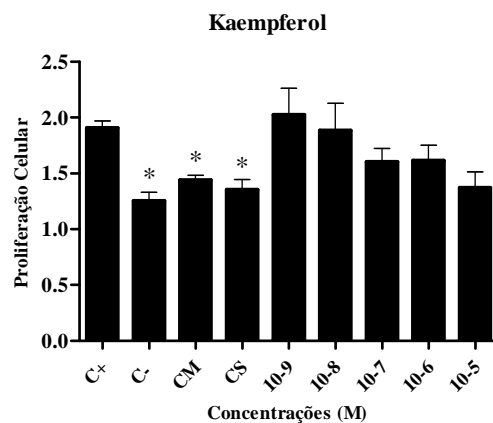
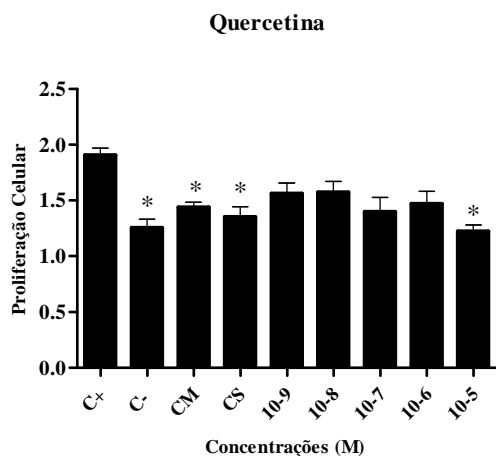
^a O efeito proliferativo (EP) é calculado como o efeito sobre o controle solvente

Na Figura 15 estão representados os efeitos da proliferação celular induzido por diferentes concentrações dos flavonoides tratados simultaneamente com 17- β -estradiol (1×10^{-8} M), a fim de verificar a atividade antiestrogênica dos compostos testados. Além do controle positivo, podemos observar os resultados do controle negativo, controle solvente e o controle do meio. Os dados representam três experimentos independentes executados em triplicata.

Os resultados mostraram que as culturas tratadas com 17- β -estradiol induziram um aumento estatisticamente significativo na proliferação celular quando comparados com os controles negativo e solvente (Fig. 15).

Com relação ao controle solvente, os resultados obtidos foram semelhantes com aqueles do controle negativo, demonstrando que não houve interferência na atividade antiestrogênica pelo solvente utilizado (Fig. 15)

Dentre os compostos estudados, a quercetina, crisina e 3-hidroxiavona foram capazes de inibir significativamente a proliferação celular induzida pelo 17- β -estradiol ($p < 0,05$), atuando dessa maneira como compostos estrogênicos antagonistas ou antiestrogênicos. Os outros compostos não apresentaram diferenças estatísticas na inibição da proliferação celular quando comparado com o 17- β -estradiol, nas condições utilizadas neste estudo (Fig. 15).



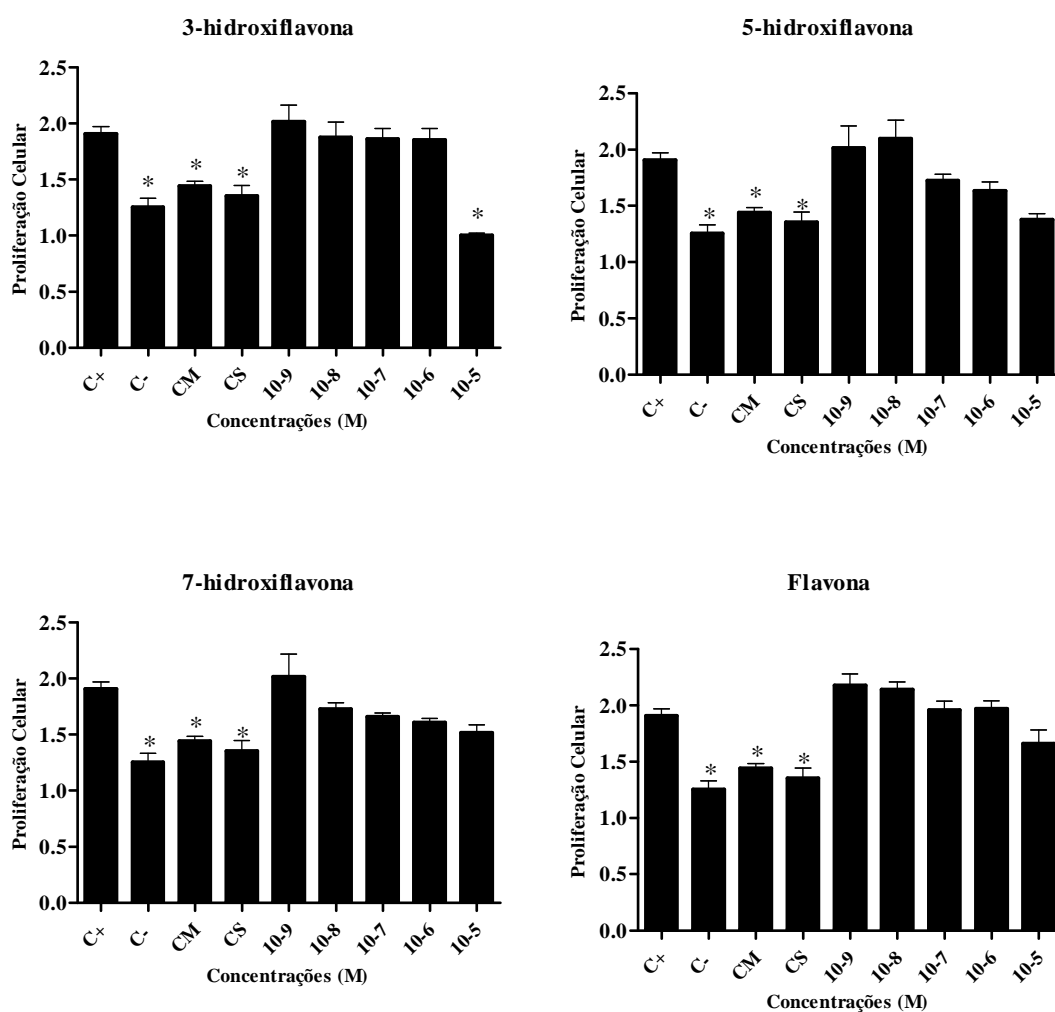


Figura 15 - Efeito antiestrogênico de diferentes concentrações dos flavonoides sobre a proliferação celular induzida pelo 17- β -estradiol. C⁺ = controle positivo (17- β -estradiol), C⁻ = controle negativo (meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol, suplementado com 10% de soro livre de estrógenos), CS = controle solvente (0,01 % de DMSO, máxima concentração de solvente utilizada no teste), CM = controle do meio (meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal). *Significativamente diferente do controle positivo (one-way ANOVA, teste de Dunnett; $p \leq 0,05$)

4.5. Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos flavonoides (fisetina, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona, quercetina, flavona, kaempferol, luteolina, crisina e galangina) foi determinada pela porcentagem de viabilidade bacteriana obtida frente ao *S. aureus* e *E. coli* (Fig. 16 e 17, respectivamente). A partir desses resultados, a CIM para cada micro-organismo foi determinada (Tabela 6).

Os flavonoides avaliados foram eficazes contra *S. aureus* e *E. coli*, em graus diferentes (Fig. 16 e 17, Tabela 6).

Os resultados obtidos mostram que a cepa de *S. aureus* foi mais sensível aos diferentes flavonoides, sendo o kaempferol o composto mais ativo, apresentando valor de CIM de 62,5 µg/mL (Fig. 16, Tabela 6).

Com relação à *E. coli*, os compostos avaliados não inibiram completamente o crescimento bacteriano, apenas reduziram a porcentagem das células bacterianas nas condições utilizadas neste trabalho (Fig. 17, Tabela 6).

A Figura 18 representa os valores do crescimento de *S. aureus* e *E. coli* frente à diferentes concentrações de cloridrato de ciprofloxacino.

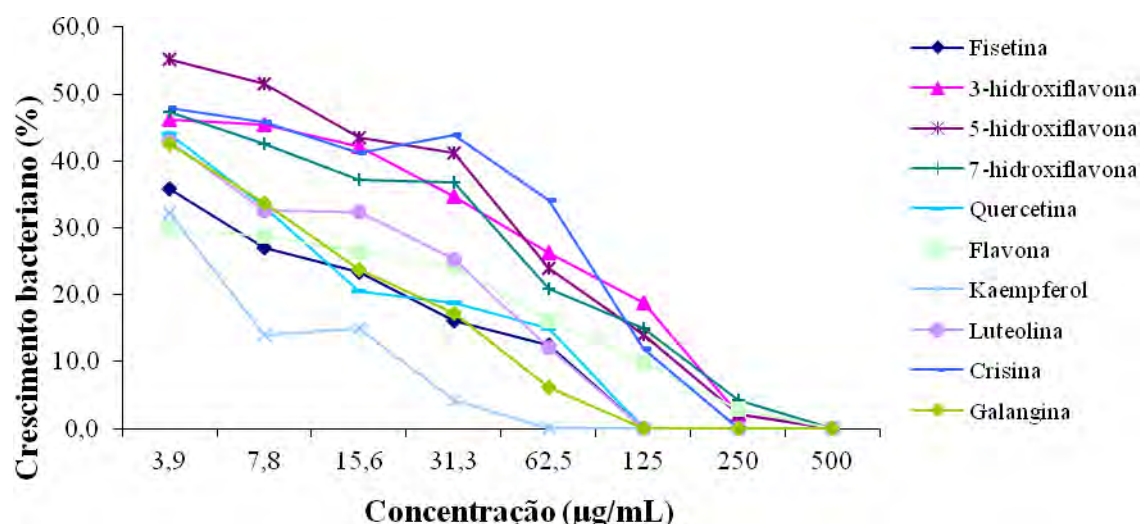


Figura 16 - Viabilidade de *S. aureus* tratado com os flavonoides em diferentes concentrações

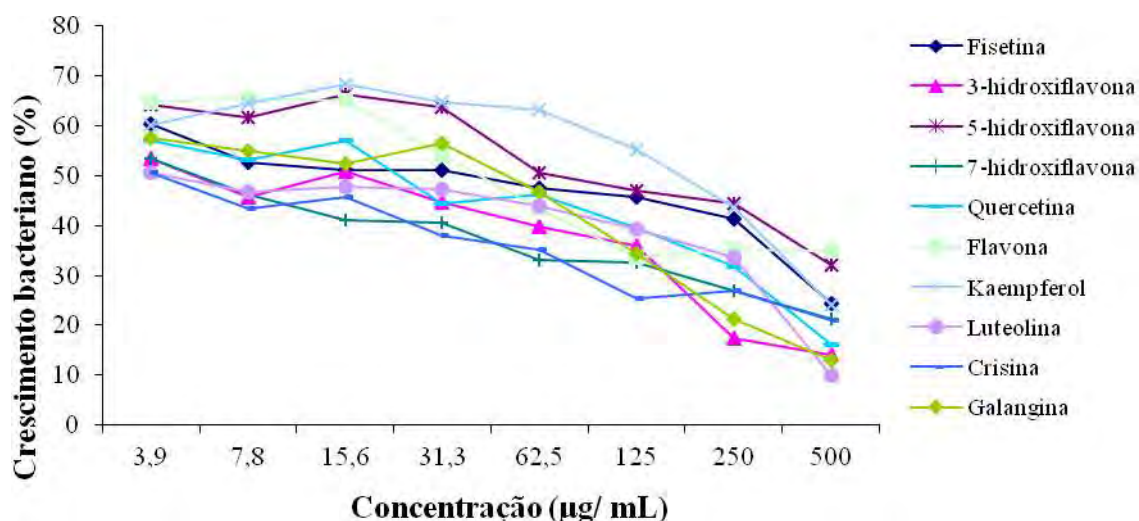


Figura 17 - Viabilidade de *E. coli* tratada com os flavonoides em diferentes concentrações

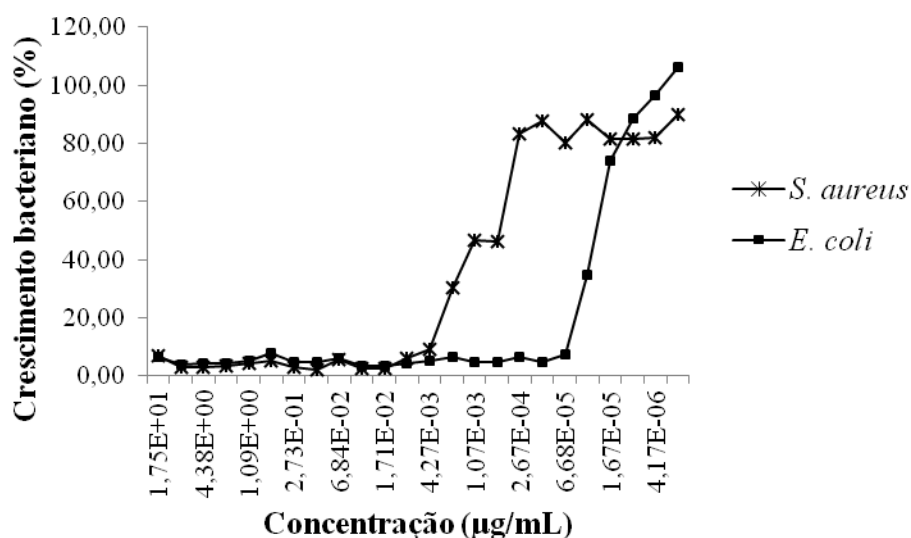
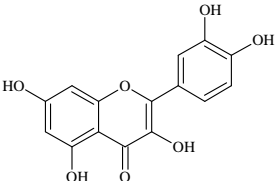
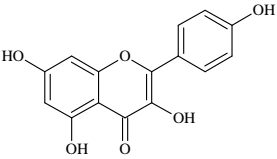
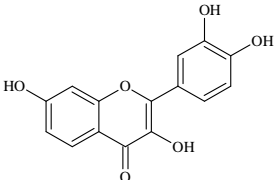
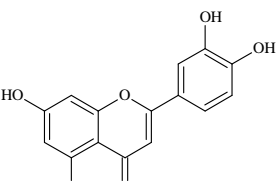
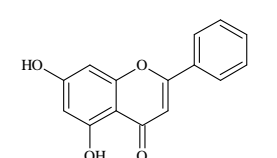
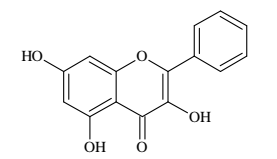


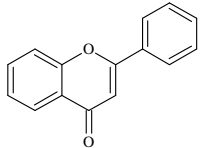
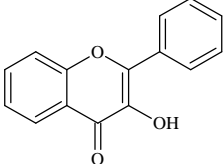
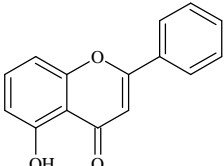
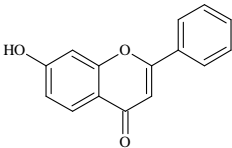
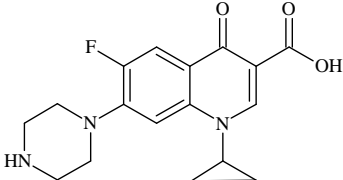
Figura 18 - Viabilidade de *S. aureus* e *E. coli* tratados com cloridrato de ciprofloxacino em diferentes concentrações

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos flavonoides (fisetina, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona, 7-hidroxiflavona, quercetina, flavona, kaempferol, luteolina, crisina e galangina) pela técnica de diluição em microplaca.

Tratamentos	CIM ($\mu\text{g/ mL}$)	
	<i>S. aureus</i> (Gram-positiva)	<i>E. coli</i> (Gram-negativa)
<p>Quercetina</p> 	125	> 500
<p>Kaempferol</p> 	62,5	> 500
<p>Fisetina</p> 	125	> 500
<p>Luteolina</p> 	125	> 500
<p>Crisina</p> 	250	> 500
<p>Galangina</p> 	125	> 500

continuação

continuação

Flavona		
	500	> 500
3-hidroxi flavona		
	500	> 500
5-hidroxi flavona		
	500	> 500
7-hidroxi flavona		
	500	> 500
C+: cloridrato de ciprofloxacino		
	$2,14 \times 10^{-3}$	$3,34 \times 10^{-5}$

4.6. Resumo dos resultados

Para facilitar a visualização dos resultados supracitados, foi elaborada a Tabela 7 que mostra apenas qualitativamente se foi constatada ou não atividade.

Tabela 7 – Resultados da avaliação da mutagenicidade (teste de Ames), antimutagenicidade (teste de Ames), antiestrogenicidade (teste de Ames), estroginicidade (RYA e *E-Screen*), antiestrogenicidade (*E-screen*) e potencial antibacteriano (microdiluição) dos flavonoides

Tratamentos	Mutagenicidade	Antimutagenicidade	Estrogenicidade	Estrogenicidade	Antiestrogenicidade	Antiestrogenicidade	Potencial antibacteriano
	Teste de Ames	Teste de Ames	RYA	<i>E-screen</i>	<i>E-screen</i>	<i>E-screen</i>	Microdiluição
Quercetina	+	+	-	-	+	+	+
Kaempferol	+	+	+	+	-	-	+
Fisetina	-	+	-	+	-	-	+
Luteolina	-	+	-	+	-	-	+
Crisina	-	+	-	-	+	+	+
Galangina	+	+	-	+	-	-	+
Flavona	-	+	-	-	-	-	+
3-hidroxiflavona	-	+	-	-	+	+	+
5-hidroxiflavona	-	+	-	-	-	-	+
7-hidroxiflavona	-	+	-	-	-	-	+

+ : presença de atividade; - : ausência de atividade

5. Discussão

*”A felicidade não se resume na ausência de problemas, mas sim na
sua capacidade de lidar com eles.”*

Albert Einstein

5.1. Atividade mutagênica

Este trabalho baseia-se na necessidade de esclarecer as causas da mutagenicidade dos flavonoides, alguns dos quais têm propriedades benéficas como atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, além da prevenção do câncer.

O teste de Ames tem sido amplamente utilizado como uma ferramenta de triagem que estabelece uma estimativa inicial de mutagenicidade e carcinogenicidade, e estudos que relacionam a estrutura com a atividade biológica são capazes de fornecer informações rápidas e confiáveis sobre o potencial de mutagenicidade (MAZZATORTA *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos neste estudo indicam que existe uma relação estrutura-atividade no que diz respeito à atividade mutagênica dos flavonoides, considerando o padrão de hidroxilação das moléculas e a linhagem utilizada.

De acordo com Rietjens *et al.* (2005) as características estruturais essenciais à atividade mutagênica são uma hidroxila livre na posição 3, uma dupla ligação entre as posições 2 e 3, e um grupo ceto na posição 4, permitindo que a hidroxila na posição 3 tautomerise a molécula a uma molécula 3-ceto. Estas características estruturais são exibidas pela molécula da quercetina, kaempferol, galangina, fisetina e 3-hidroxi-flavona.

No entanto, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, a padrão das hidroxilas das moléculas também foi importante para mutagenicidade observada.

A quercetina, que tem duas hidroxilas na posição *orto* no anel B e hidroxilas livres nas posições 3, 5 e 7, demonstrou ser diretamente mutagênica na linhagem TA98 e TA100 e sua mutagenicidade aumentou em presença de ativação metabólica. A eliminação ou modificação de qualquer uma dessas hidroxilas mostrou reduzir significativamente a mutagenicidade, como observado nos resultados com kaempferol e galangina.

A diferença estrutural entre kaempferol e quercetina é apenas a ausência da hidroxila na posição 3' (HOU e KUMAMOTO, 2010) e a galangina é um flavonol que não tem qualquer hidroxila no anel B. Neste estudo, kaempferol e galangina mostrou atividade mutagênica na linhagem TA98 somente após ativação metabólica, indicando que o número e a posição das hidroxilas no anel B parece ter uma influência específica sobre a genotoxicidade dos compostos.

A galangina é um possível substrato do citocromo P450, que, por hidroxilação no anel B, pode ser metabolizado em kaempferol ou mesmo a quercetina. Esta hipótese foi levantada por Brown e Dietrich, em 1979. Portanto, mesmo a galangina não possuindo o grupo catecol no anel B, ela ainda é mutagênica após metabolização. Duarte Silva *et al.* (1997) investigaram se o sistema de monooxigenases do citocromo P450 está envolvido no metabolismo da galangina e, conseqüentemente, na sua mutagenicidade, e constataram que realmente a galangina requer ativação metabólica pelo citocromo P450, a fim de ser mutagênica.

O kaempferol, que tem apenas uma hidroxila no anel B, apresentou uma resposta semelhante à galangina. A mutagenicidade do kaempferol nessas células também depende da sua ativação através do sistema de monooxigenases do citocromo P450 (DUARTE SILVA *et al.*, 1997). A metabolização do kaempferol pela mistura S9 no dá origem a quercetina, aumentando a sua genotoxicidade (DUARTE SILVA *et al.*, 2000).

A fórmula estrutural da quercetina contém todos os elementos estruturais necessários para a atividade antioxidante e pró-oxidante (RIETJENS *et al.*, 2005), o que podem fornecer um conhecimento sobre a sua aparente mutagenicidade *in vitro* (van der WOUDE *et al.* 2005; HARWOOD *et al.*, 2007) ou antimutagenicidade.

A atividade pró-oxidante da quercetina pode esgotar as defesas antioxidantes nuclear e levar o dano oxidativo ao DNA, o que pode ser responsável pela sua mutagenicidade (SILVA *et al.*, 2002). Uma variedade de ensaios de genotoxicidade foram realizados, devido à prevalência de quercetina na dieta e em potenciais aplicações clínicas e alimentares. Além disso, há uma tentativa de conciliar as diferenças entre os resultados *in vitro* demonstrando a atividade mutagênica da quercetina com a aparente ausência de carcinogenicidade *in vivo* (HARWOOD *et al.*, 2007).

O mecanismo de mutagenicidade sugerido envolve a ativação metabólica, levando à formação de metabólitos catecol e subsequente oxidação para *o*-quinona e, em alguns casos para metabólitos *p*-quinona metide. A quercetina já possui um grupo catecol no anel B, que, devido às suas propriedades oxidantes, fornece uma base para os efeitos pró-oxidantes tóxicos deste flavonoide (van der WOUDE *et al.*, 2005). Os quinona metide seriam intermediários alquilantes reativos ao DNA, que presumivelmente favorece a intercalação no DNA, promovendo, portanto, mutações *frameshift* (PICADA *et al.*, 2003). Uma parte essencial desta hipótese é que para a atividade mutagênica, o anel B tem que ser oxidado a um intermediário quinóide e a hidroxila no C3 necessita reorganizar para se tornar um isômero 3 - ceto, o que requer

uma ligação dupla entre as posições 2 e 3 (DUARTE SILVA *et al*, 2000; RIETJENS *et al*, 2005).

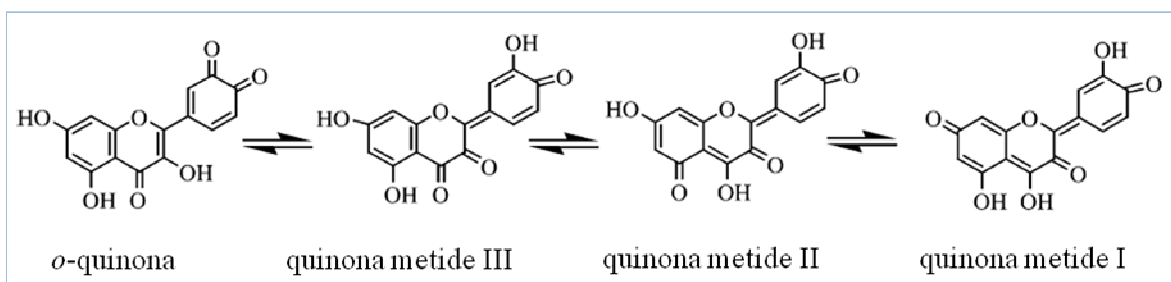


Figura 19 – Isomerização quinona e quinona metide da quercetina

Isso explica por que a ausência da hidroxila no C3 elimina a mutagenicidade, como observado nos resultados com luteolina.

No entanto, apesar da constatação de que a hidroxila no C3 no anel C é claramente importante, como indicado pela atividade da galangina, o mesmo efeito não foi observado para a fisetina.

Comparando a mutagenicidade da quercetina com a da fisetina também podemos ilustrar o efeito potenciador de uma hidroxila no C5. Este efeito ocorre porque esta hidroxila forma uma forte ligação de hidrogênio com o grupo 4-ceto, impedindo e/ou enfraquecendo a ligação de hidrogênio da hidroxila no C3 com o grupo 4-ceto. Esse enfraquecimento da ligação de hidrogênio 3-hidroxi 4-ceto aumenta a probabilidade de tautomerização da hidroxila no C3 em formar quinona metide. Assim, a ausência de hidroxila no C5 (fisetina) reduz de mutagenicidade (RIETJENS *et al.*, 2005), apesar do grupo catecol no anel B ser de interesse e ambos a fisetina e quercetina possuem grupos *orto* hidroxil no anel B.

Entretanto, a presença de hidroxila no C5 no anel A também não é garantia de mutagenicidade, como observado nos resultados com 5-hidroxi flavona, que carece de mutagenicidade, provavelmente devido a ausência de outros elementos estruturais, como por exemplo a hidroxila no C3 no anel C.

A ausência de hidroxilas, como na flavona, parece eliminar a mutagenicidade. A presença de hidroxilas no anel A, carbonilas e dupla ligação entre C2-C3 no anel C não parece ser um fator determinante quando se considera as diferentes estruturas das flavonas. Entre os flavonoides monohidroxilados (3-hidroxi flavona, 5-hidroxi flavona e 7-hidroxi flavona), a presença de hidroxilas resulta em apenas pequenas alterações

(EDENHARDER *et al.*, 1997). No presente estudo, hidroxilas nos carbonos 3, 5 e 7 não geraram compostos mutagênicos e não foram detectados efeitos na presença da mistura S9.

Finalmente, com a crisina, as duas hidroxilas nas posições 5 e 7 não foram reativas com o grupo 4-ceto. Além disso, a falta de hidroxilas nos carbonos 3 e 3',4' dihidroxi (ou prenil) no anel B desse flavonoide pode ser a razão para a ausência de atividade mutagênica.

No presente estudo, a ausência de uma resposta mutagênica dos compostos luteolina, fisetina, flavona, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona, 7-hidroxiflavona e crisina contra as cepas de *S. typhimurium* no teste de Ames é um passo positivo na determinação do uso seguro desses flavonoides. Considerando as inúmeras atividades que os flavonoides apresentam e principalmente a promissora atividade quimiopreventiva, o efeito mutagênico negativo em sistemas bacterianos é relevante.

Diante dos resultados e hipóteses acima, é necessário esclarecer melhor os mecanismos e as condições que medeiam os efeitos biológicos dos flavonoides, antes de considerá-los como agentes terapêuticos. É verdade que os flavonoides podem inibir a bioativação de precarcinógenos reprimindo várias enzimas de biotransformação ou bloqueando receptores de membrana envolvidos na captação celular de precarcinógenos (DUARTE SILVA *et al.*, 2000). Geralmente, têm sido caracterizados como antioxidantes capazes de proporcionar efeitos benéficos à saúde. No entanto, estes compostos podem ser biotransformados em produtos mais genotóxicos (DUARTE SILVA *et al.*, 2000), como é o caso da galangina, kaempferol e quercetina, que atuam como pró-oxidantes e interferem nos sistemas antioxidantes, induzindo indiretamente o estresse oxidativo na célula (CRESPO *et al.*, 2008). Além disso, radicais hidroxil gerados pela oxidação e pelo ciclo-redox dos flavonoides podem iniciar a peroxidação de lipídeos de membrana celular (MICHELS *et al.*, 2004).

5.2. Atividade antimutagênica

Os danos ao DNA são frequentemente indicados como causadores de mutações que estão associadas com a iniciação e a progressão do câncer, dessa maneira a oncologia moderna está sendo desafiada a ampliar seu foco para quimioprevenção por meio de agentes com várias propriedades biológicas (AJITH e SOJA, 2006).

Inúmeros compostos da classe dos flavonoides são reconhecidos por inibir o desenvolvimento de processos mutagênicos e carcinogênicos. O efeito protetor foi identificado contra mutágenos de ação direta ou indireta e ocorre através de diferentes mecanismos, entre eles, interação direta com metabólitos nucleofílicos e/ ou, por exemplo, inibição da ativação metabólica de pró-mutágenos (DELANEY *et al.*, 2002).

No presente estudo, a atividade antimutagênica dos flavonoides quercetina, kaempferol, galangina, fisetina, crisina, luteolina, flavona, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona e 7-hidroxi-flavona foi avaliada pelo teste de Ames. Estes compostos diferem um dos outros somente pela número e pela posição das hidroxilas presentes na molécula. Todos compostos exibiram um efeito protetor contra a mutagenicidade induzida por mutágenos diretos e indiretos. Eles apresentaram potencial antimutagênico em mais de uma linhagem e foram eficientes por diferentes mecanismos de ação, indicando que o número de hidroxilas e a posição desses grupos funcionais podem, aumentar ou diminuir o efeito de proteção, dependendo do tipo e concentração dos flavonoides e mutágeno usado (SNIJMAN *et al.*, 2007).

A presença de uma carbonila no carbono 4 dos flavonoides já foi descrita como sendo essencial para antimutagenicidade (EDENHARDER e GRÜNHAGE, 2003). Sabe-se que a elevada reatividade química de compostos carbonílicos está intimamente ligada às suas propriedades ácido-básicas. Os compostos carbonílicos geralmente exercem sua ação através da interação direta com alguma enzima normalmente através de ligações de hidrogênio (ALCARAD *et al.*, 2000). Outra característica essencial provavelmente é uma estrutura planar ao lado da função ceto (EDENHARDER e GRÜNHAGE, 2003). Todos os flavonoides avaliados neste estudo apresentam essas duas características estruturais.

A quercetina mostrou-se antimutagênica contra as mutações induzidas pelo NPD e 2-AA na linhagem TA98 e TA102, respectivamente, e potencializou o efeito mutagênico do mutágeno indireto B[a]P na linhagem TA98. Em geral, a proteção observada da quercetina é atribuída à sua atividade antioxidante (BOOTS *et al.*, 2007).

Com relação a sua estrutura química, as principais características para captura de radicais livres são a presença de um grupo catecol no anel B que tem melhor propriedade de doar elétrons para estabilizar espécies radicais, uma dupla ligação entre as posições 2 e 3 conjugada com o grupo 4-oxo que é responsável pela deslocalização de elétrons e a presença de hidroxilas nos carbonos 3 e 5 juntamente com o grupo 4-oxo que confere potencial máximo na captura de radicais livres (Fig. 20) (EDENHARDER e GRÜNHAGE, 2003). Estas 3 características estruturais são exibidas pela molécula da quercetina.



Figura 20 – Características estruturais responsáveis pela atividade antioxidante dos flavonoides

Entretanto, a molécula da quercetina se oxida enquanto exerce sua capacidade antioxidante formando produtos de oxidação potencialmente tóxicos responsáveis pela sua mutagenicidade. Estudos *in vitro* definem esse efeito como o paradoxo da quercetina, ou seja, a conversão da quercetina em um produto potencialmente tóxico oferecendo proteção pela captura de radicais livres (HARWOOD *et al.*, 2007; BOOTS *et al.*, 2007, 2008). No entanto, podemos observar que a quercetina induziu um aumento estatisticamente significativo no número de revertentes quando comparado com o controle negativo (dados não mostrados), não a ausentando de efeito mutagênico nos ensaios de antimutagenicidade, indicando que a capacidade antimutagênica da quercetina possa ser devido à interação da molécula com a dos mutágenos NPD e 2-AA, impedindo que os mesmos danifiquem DNA bacteriano.

O kaempferol e a galangina são compostos estruturalmente relacionados com a quercetina. Como já foi dito, a diferença estrutural entre o kaempferol e a quercetina é falta do grupo catecol no anel B devido a ausência da hidroxila na posição 3' (PIETTA,

2000; HOU e KUMAMOTO, 2010) e a galangina é um flavonol que não tem qualquer hidroxila no anel B (DUARTE SILVA *et al.*, 2000). Além dessa informação, a galangina é sequencialmente transformada em kaempferol e em seguida em quercetina por mecanismos dependentes de reações do citocromo P450 (HODEK *et al.*, 2002).

Neste estudo, o kaempferol e a galangina exibiram um efeito protetor contra NPD, B[a]P e AFB₁. Além desses efeitos, o kaempferol ainda foi antimutagênico contra MMC e a galangina foi capaz de reduzir as mutações induzidas pelo 2-AA na linhagem TA102. Dentre os compostos mutagênicos estudados, o kaempferol apresentou maior % de inibição que a galangina, exceto contra 2-AA, sugerindo que a hidroxila na posição 3' é importante para atividade antimutagênica. Entretanto, embora o kaempferol tenha demonstrado atividade antimutagênica contra um número maior de mutágenos, quando comparado com a quercetina a presença de apenas uma hidroxila no anel B diminuiu a atividade (PIETTA, 2000) contra NPD.

Outra substância estruturalmente comparável com a quercetina é a luteolina. A estrutura *orto*-dihidroxi no anel B e a dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 conjugada com a função 4-oxo no anel C oferece uma boa, mas não uma excelente capacidade antioxidante para a luteolina. A luteolina é geralmente inferior à quercetina. No entanto é mais lipofílica e pode ter melhor desempenho em sistemas-teste com moléculas biológicas ou membranas (SEELINGER *et al.*, 2008). Além disso, a ausência de uma hidroxila no carbono 3 (KANADASWAMI *et al.*, 2005), impede o efeito de oxidação dessa molécula, pois diferente da quercetina, a luteolina é revertida a sua forma original após metabolização (SEELINGER *et al.*, 2008). No presente estudo, a luteolina foi o único composto capaz de demonstrar um efeito protetor contra todos os mutágenos testados, exibindo dessa maneira atividade antimutagênica de moderada a forte.

A estrutura 5,7-dihidroxi no anel A também é importante para a atividade antimutagênica, como podemos observar nos resultados com a crisina (PIETTA, 2000). Galijatovic *et al.* (1999) não encontram evidências de oxidação dessa molécula por hepatócitos de ratos ou linhagens de células hepáticas induzidas com CYP1A1, provavelmente devido a ausência da hidroxila na posição 3 (OTAKE e WALLE, 2002), como no caso da luteolina. A crisina apresentou atividade antimutagênica contra NPD, B[a]P, AZS, AFB₁ e 2-AA.

A fisetina com hidroxilas nas posições 3, 3', 4' e 7 causou uma redução considerável na potência inibitória, não exibindo efeito antimutagênico quando associada com o NPD, AZS, AFB₁ e MMC. Entretanto foi capaz de reduzir a

mutagenicidade induzida pelo B[a]P e 2-AA. Estudos relatam que os anéis C e B da fisetina parecem desempenhar um papel mais importante do que o anel A no sequestro de radicais livres. A hidroxila na posição 3 da molécula da fisetina tem menor obrigação de dissociação, seguindo pelos radicais 3'-OH e 4'-OH, enquanto que a hidroxila na posição 7 possui maior capacidade de dissociação que geralmente é atribuído a uma maior capacidade de doar hidrogênio (SENGUPTA *et al.*, 2004; MAKENA e CHUNG, 2007).

A ausência total de hidroxilas também reduziu consideravelmente o efeito antimutagênico como podemos observar nos resultados com a flavona. A proteção induzida pela flavona foi observada apenas contra o NPD e B[a]P na linhagem TA98. Hidroxilas adicionais à molécula causaram alterações na atividade antimutagênica comparada com a flavona. Entretanto, entre os flavonoides monohidroxilados disponíveis (3- hidroxiflavona, 5- hidroxiflavona e 7- hidroxiflavona), essas alterações na posição das hidroxilas não foram tão evidentes. Comparando a atividade antimutagênica entre os monohidroxilados, a interferência da hidroxila na posição 3 foi mais significativa, exceto contra as mutações induzidas pelo B[a]P. Apenas uma hidroxila no carbono 7 também causou antimutagenicidade, como podemos observar nos resultados com 7- hidroxiflavona. A mutagenicidade induzida pelo NPD, B[a]P, AZS, MMC e 2-AA foi significativamente reduzida por este composto. Já a hidroxila na posição 5 causou uma redução considerável na potência antimutagênica (5- hidroxiflavona). O composto 5-hidroxiflavona exibiu propriedades antimutagênicas apenas contra NPD, B[a]P e 2-AA.

A proteção do genoma bacteriano contra mutágenos de ação direta, como por exemplo, NPD, AZS e MMC pode ser devido à rápida eliminação dos agentes mutagênicos antes da interação com o DNA (AJITH e SOJA, 2006). Os flavonoides podem facilitar ou estimular o sistema de exportação transmembrânico para eliminar os agentes mutagênicos e/ou interferir com a absorção dos agentes mutagênicos (AJITH e SOJA, 2006; SGHAIER *et al.*, 2010).

Além disso, a interação dos flavonoides avaliados com o intermediário ativo do B[a]P, um pró-carcinógeno ambiental conhecido, mostra que a diminuição da formação do aducto de DNA induzido por esse mutágeno pode ser pela interação com intermediários reativos ou pela interferência com enzimas microssomais (por exemplo, CYP1A1) (CAO *et al.*, 2010). No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

O B[a]P, um hidrocarboneto aromático policíclico típico, é formado durante a combustão incompleta de matéria orgânica, sendo dessa maneira um poluente ambiental prevalente. A exposição humana ao B[a]P é, principalmente, por ingestão de alimentos e água contaminados e pela inalação de partículas no ar e da fumaça do cigarro (XIA; *et al.*, 2011).

A ativação enzimática do B[a]P por certos tipos enzimas do citocromo P450 (CYPs), fundados na fração microsomal subcelular, especialmente CYP1A1, é necessária para produzir o composto carcinogênico final (\pm)-benzo[a]pireno-7,8-diol-9,10-epóxido (SCHWARZ *et al.*, 2001). Este exerce sua atividade carcinogênica pela alquilação na molécula de DNA. A reação ocorre primeiramente com as bases purinas, desoxiguanosina e desoxiadenosina, no DNA (ROSS *et al.*, 1990). Como resultado, vários aductos de DNA estáveis e depurinados são formados (CHEN *et al.*, 1994; CHAKRAVARTI *et al.*, 2008). A não remoção desses aductos antes da replicação forma “*hot spots*” no gene, podendo dessa maneira desativar genes supressores de tumor ou ativar oncogenes que levam à iniciação do tumor (BAIRD *et al.*, 2005; CAO *et al.*, 2010).

Outro possível mecanismo pode ser a inativação de ROS genotóxicas geradas durante o metabolismo do B[a]P. O metabolismo mediado por CYPs de amins aromáticas heterocíclicas (2-AA) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (B[a]P) é conhecido pela produção de ROS, portanto a redução do estresse oxidativo seria outro possível mecanismo dos flavonoides com atividade antimutagênica contra esses mutágenos (UHL *et al.*, 2003).

A respeito dos mecanismos envolvidos na linhagem TA100, cuja sensibilidade é detectar compostos que ocasionam substituições, principalmente no par G-C (MARON e AMES, 1983), foram escolhidos como mutágenos direto e indireto a AZS e a AFB₁, respectivamente.

Ao contrário da AFB₁, AZS não requer ativação por enzimas microsomais hepáticas para causar danos no DNA e induzir mutagenicidade, sugerindo que os compostos protegem diretamente as fitas de DNA a partir do metabólito eletrofilico do mutágeno.

As aflatoxinas, um grupo de micotoxinas com propriedades mutagênica, carcinogênica, teratogênica, hepatotóxica e imunossupressora, são de interesse devido seus efeitos adversos sobre a saúde animal e humana. As aflatoxinas são produzidas como metabólitos secundários por fungos de várias espécies de *Aspergillus* (*A. flavus*,

A. parasiticus e *A. nomius*) que crescem em uma variedade de alimentos. A AFB₁, uma das aflatoxinas mais tóxicas, é um contaminante de muitos produtos alimentares e um dos mais potentes agentes mutagênicos e carcinogênicos conhecidos (WANG *et al.*, 2011).

O mutágeno, AFB₁, sofre um processo de epoxidação por um microsomo hepático do citocromo P450 e sucessivas hidrólises epóxicas, além da conjugação de glutatona. O epóxido e outros intermediários substituem os nitrogênios de ácido nucléico nas fitas de DNA e clivam o DNA para causar mutagenicidade. Além disso, intermediários metabólicos e ROS formados durante o processo de ativação de enzimas microsossomais são também capazes de quebrar as fitas de DNA (PARK *et al.*, 2004).

A linhagem TA102 é sensível a mutágenos oxidativos (MARON e AMES, 1983; EDENHARDER e GRÜNHAGE, 2003). Dessa maneira, as propriedades antimutagênicas nesta linhagem são as que melhor podem ser correlacionadas com as propriedades antioxidantes dos flavonoides, que são capazes de reduzir os danos gerados pelas ROS (ARRIAGA-ALBA *et al.*, 2011). Além da captura, os flavonoides podem estabilizar os radicais livres envolvidos nos processos oxidativos por complexação com eles (PIETTA, 2000).

A MMC, mutágeno direto utilizado na linhagem TA102, é uma droga antineoplásica frequentemente utilizada, agindo como um composto mutagênico *cross-linking* altamente tóxico para as bactérias. Este agente, que não reage com o DNA antes da oxidação e redução do seu anel quinona, torna-se um agente alquilante específico para nucleosídeos guanina (TOMASZ, 1995). A mutagenicidade deste composto genotóxico só é observado na linhagem de *S. typhimurium* TA102, com um proficiente sistema de reparo por excisão de DNA *uvrB*, projetado para detectar compostos que causam danos oxidativos ao DNA (ARRIAGA-ALBA *et al.*, 2011).

Já 2-AA é uma substância altamente carcinogênica comumente usada como controle positivo no teste de Ames nas linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102, em experimentos com ativação metabólica. Acredita-se que a *N*-oxidação é o primeiro passo na ativação de aminas aromáticas. Os derivados *N*-hidroxil podem ser convertidos em ésteres instáveis, formando um cátion nitrenio altamente reativo que pode se ligar ao DNA, resultando em mutações (VERES *et al.*, 2005).

Frente aos resultados observados, podemos concluir que as propriedades antimutagênicas dos flavonoides envolvem vários mecanismos, seja pela proteção direta ao DNA ou pela inibição da ativação metabólica de mutágenos indiretos devido a

inativação de enzimas de metabolização ou interação com o pro-mutágenos tornando-os indisponíveis ao processo enzimático (ZAHIN *et al.*, 2010).

Este estudo fornece uma melhor compreensão da atividade antimutagênica de flavonoides e pode ser usado como orientação para proposição de novos agentes quimiopreventivos.

5.3. Atividade estrogênica

Um parâmetro toxicológico de grande importância no meio ambiente é desregulação endócrina. A desregulação endócrina é prejudicial especialmente devido os efeitos decorrentes da poluição química. Ela ocorre quando uma substância química acumula em organismos (incluindo humanos) e afeta seu sistema endócrino. Dadas as múltiplas funções dos hormônios no corpo, essa alteração pode levar a vários efeitos adversos, incluindo hermafroditismo em peixes e deficiências reprodutivas em seres humanos (BRIX *et al.*, 2010).

Por outro lado, compostos que podem induzir ou inibir as respostas celulares de estrogênio tem um valor potencial como ferramentas de bioquímica e candidatos para o desenvolvimento de drogas. Desde a descoberta dos estrógenos não esteroidais, muitos compostos com atividade estrogênica agonista e antagonista têm sido desenvolvidos como agentes de regulação da fertilidade, reposição hormonal pós-menopausa e prevenção e controle de cânceres hormônio-sensíveis (OGAWA *et al.*, 2009).

Vários dos mais potentes fitoestrógenos conhecidos pertencem ao grupo das isoflavonas, constituintes fitoquímicos encontrados predominante nos grãos de soja. No entanto, dados de Micsicek (1993, 1994) indicam que outras classes da família flavonoide, além das isoflavonas, exibem propriedades estrogênicas e antiestrogênicas, e são designados flavo-estrógenos. Esses compostos possuem algumas semelhanças estruturais com o hormônio natural estradiol, bem como com outros hormônios esteróides (ZAND *et al.*, 2000), podendo interagir com o RE e induzir a expressão gênica semelhante a do hormônio estrogênio, embora a uma menor afinidade (FERGUSON, 2001).

O RE já tem demonstrado uma capacidade de se ligar a uma série de compostos com um grau de diversidade estrutural (KUIPER *et al.*, 1998). No entanto, a potência de cada substância pode ser devido a sua afinidade com os REs (ZACHAREWSKI, 1998; WANDA *et al.*, 2006).

Dado o interesse significativo na atividade estrogênica de fitoestrógenos, este estudo foi realizado para determinar a atividade estrogênica de flavonoides, por meio do teste RYA que utiliza como modelo experimental leveduras recombinantes, onde a transcrição de um gene repórter depende da presença no meio de compostos capazes de se ligar ao RE α (GARCIA-REYERO *et al.*, 2001). Esta é uma versão simplificada do mecanismo pelo qual os estrógenos naturais operam em vertebrados, a semelhança fundamental de todos os eucariontes garante que este mecanismo também funcione em levedura de uma forma semelhante (CÉSPEDES *et al.*, 2005).

Alguns estudos sugerem que as funções biológicas do RE β podem ser dependentes da presença do RE α em certos tipos de células e tecidos (COUSE *et al.*, 1997). Dessa maneira, o uso de um teste *in vitro* com uma cepa de levedura modificada com o RE α é então confiável para avaliar a atividade biológica de compostos (PINTO *et al.*, 2008). Além disso, os domínios de ligação ao ligante dos dois subtipos possuem uma identidade global de 58%, sendo que as cavidades de ligação são quase idênticas, diferenciadas apenas por dois resíduos de aminoácidos com características marcadamente conservadoras (Leu384 e Met421 nos RE α são substituídos por Met336 e Ile373 nos RE β). Assim não é surpreendente que o 17- β -estradiol e outros compostos apresentam uma afinidade semelhante para ambos os receptores (SALUM *et al.*, 2008).

Além do teste RYA, foi também utilizado o ensaio *E-screen* que avalia a estrogenicidade e antiestrogenicidade dos compostos indiretamente por meio da quantificação da proliferação de células MCF-7 (WATANABE *et al.*, 2010). A proliferação depende da interação dos compostos com RE α , que ativam a indução da expressão gênica mediada pelo receptor (INNOCENTI *et al.*, 2007), mas diferente do teste RYA, por exemplo, pois determina um parâmetro biológico. Substâncias estrogenicamente ativas não só precisa se ligar ao RE, mas tem que acionar eventos consecutivos também estimulados pelos hormônios naturais (KUCH *et al.*, 2010). A avaliação da estrogenicidade por este ensaio envolve a interação da fisiologia da célula, o que pode resultar em um quadro mais completo do potencial estrogênico do que apenas a interação com o RE (VANPARYS *et al.*, 2010).

Em comparação com o estrógeno natural, 17- β -estradiol, compostos ou amostras podem ser classificados de acordo com sua potência. Uma vez que os efeitos *in vivo* do 17- β -estradiol são bem documentados, este composto funciona como uma referência para a priorização do composto ou identificação dos riscos dos estrógenos ambientais (VANPARYS *et al.*, 2010).

Quando relacionamos a estrutura dos flavonoides à sua atividade estrogênica no teste RYA e *E-screen* é evidente que existe alguma flexibilidade nas características estruturais necessárias para induzir uma resposta estrogênica. No entanto, os resultados obtidos no presente estudo indicam que os flavonoides podem agir por mecanismos que dependem ou independem do RE e que mudanças sutis na estrutura desses compostos podem alterar sua atividade biológica e especificidade ao RE.

As vias independentes do RE podem ocorrer por dois mecanismos. Primeiro, o RE pode interagir no citoplasma ou na membrana plasmática de células com diversas vias de sinalização quinase, como Src, Akt, MAP-quinase e esfingosina quinase. Segundo, REs podem induzir efeitos similares aos do estrógeno por *cross-talk* de outros fatores de crescimento e pela ligação específica a outros fatores de transcrição relacionados, como AP-1 or SP1 (OH *et al.*, 2009).

Como podemos observar frente os resultados obtidos, o número de hidroxilas principalmente no anel B do flavonoide parece ser importante, enquanto que mudanças no padrão de hidroxilação nos anéis A e C são de menor importância (BREINHOLT e LARSEN, 1998).

De acordo com Zand *et al.* (2000) a hidroxila na posição 4' confere maior atividade estrogênica e os compostos mais potentes apresentam de duas a quatro hidroxilas, sendo pelo menos uma localizada na posição 7 do anel A e a outra na posição 4' do anel B. O kaempferol, fisetina, luteolina e quercetina são os compostos que apresentam essas características estruturais.

Dentre os flavonoides estudados, o kaempferol mostrou-se ser o único flavonoide com atividade estrogênica mediada pela interação direta ao RE, apresentando 5,36 nM de EEQ no teste RYA. Além disso, atuou como um agonista total pela estimulação da proliferação de células MCF-7/BUS, na concentração de 1×10^{-5} M. Os outros compostos (quercetina, fisetina, crisina, luteolina, galangina, flavona, 3-hidroxi-flavona, 5-hidroxi-flavona e 7-hidroxi-flavona) não apresentaram níveis detectáveis de estrogenicidade nas condições utilizadas no teste RYA. No entanto, no ensaio *E-screen* compostos como a galangina, luteolina e fisetina também estimularam a proliferação de células MCF-7/BUS, atuando dessa maneira como agonistas parciais, nas concentrações de 1×10^{-5} M, 1×10^{-9} M e 1×10^{-6} M, respectivamente.

Com relação à atividade antiestrogênica, os compostos quercetina, crisina e 3-hidroxi-flavona inibiram estatisticamente a proliferação celular induzida pelo 17-β-

estradiol no ensaio *E-screen*, indicando que esses compostos podem atuar como antagonista do 17- β -estradiol.

De acordo com Oh *et al.* (2009), compostos antiestrogênicos podem atuar pela competição com 17- β -estradiol para a ligação ao RE, resultando em um funcionamento inativo e/ou pela depleção de estrógeno endógeno através da inibição da biossíntese do estradiol (atividade da aromatase) ou estimulação do catabolismo de estradiol.

Com base na análise de relação estrutura-atividade descrita por Fang *et al.* (2001), alguns critérios foram considerados essenciais para a atividade de xenoestrógenos, utilizando como modelo o 17- β -estradiol (Fig. 21): (1) capacidade de ligação do H do anel fenólico imitando o 3-OH, (2) doador de H imitando o 17- β -OH, (3) distância O-O entre 3 - e 17- β -OH, bem como sua orientação, (4) hidrofobicidade e (5) estrutura de um anel. A eliminação ou modificação de qualquer um desses pontos reduz significativamente a afinidade de ligação de um composto químico ao RE.

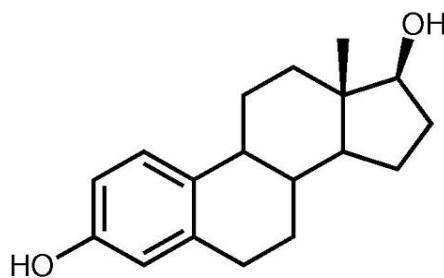


Figura 21 – Estrutura química do 17- β -estradiol

Além disso, de acordo com Anstead *et al.* (1997) mesmo a conformação geral do esqueleto sendo semelhante, os compostos não-esteroidais faltando um anel aromático apresentam baixa afinidade de ligação ao RE. Por outro lado, segundo Ward e Kuhnle (2010) apenas um anel aromático e uma hidroxila já são características importantes de um composto para se ligar ao RE.

A respeito dos compostos avaliados neste trabalho podemos observar que embora a quercetina tenha apenas uma hidroxilação na posição 3' do anel B do kaempferol (CHOI *et al.*, 2008; HOU e KUMAMOTO, 2010), esta molécula não apresentou atividade estrogênica no teste RYA e *E-screen*. Isso indica que o posicionamento *orto* entre as hidroxilas pode reduzir a estrogenicidade (CHOI *et al.*, 2008). Além disso, Zand *et al.* (2000) demonstraram que um total de mais que quatro hidroxilas na molécula reduz a atividade estrogênica do flavonoide. Dos compostos

avaliados a quercetina é a única substância que apresenta mais que quatro hidroxilas. No entanto, a quercetina foi capaz de inibir estatisticamente a proliferação celular induzida pelo 17- β -estradiol, demonstrando dessa maneira atividade antiestrogênica.

A estrogenicidade da fisetina e da luteolina também foi reduzida provavelmente devido às duas hidroxilas no anel B, que diminuiu a estimulação da proliferação celular e impediu a interação direta dos compostos ao RE. No *E-screen*, esses compostos exibiram atividade estrogênica, atuando como agonistas parciais, enquanto que no teste RYA não apresentaram níveis detectáveis de estrogenicidade.

Outro composto que apresenta propriedades estruturais semelhantes às do kaempferol é a galangina, diferenciando apenas no número de hidroxilas do anel B. A galangina é um flavonol que não tem qualquer hidroxila no anel B (DUARTE SILVA *et al.*, 1997, 2000). No *E-screen*, a galangina também atuou como agonista parcial, enquanto que no teste RYA a ausência de hidroxilas sobre o anel B interferiu na interação ao RE, demonstrando que a atividade deste composto não é diretamente dependente da afinidade ao RE.

De acordo com Choi *et al.* (2008), hidroxilas parecem ser cruciais para a ligação ao RE. Se hidroxilas não estão presentes na estrutura, nenhuma atividade estrogênica é observada (ZAND *et al.*, 2000), como foi demonstrado nos resultados com a flavona.

As modificações estruturais no anel A e C parecem também não influenciar na atividade estrogênica dos compostos, como podemos observar nos resultados dos flavonoides 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona, 7-hidroxiflavona, flavona e crisina no teste RYA, bem como no *E-screen*. A falta de estrogenicidade, acredita-se ser devido principalmente a ausência de uma hidroxila no anel B.

No entanto, a presença de apenas uma hidroxila na posição 3, como na molécula da substância 3-hidroxiflavona e hidroxilas nas posições 5 e 7, como na crisina mostraram ser importantes na atividade antiestrogênica. Esses compostos inibiram estatisticamente a proliferação celular induzida pelo 17- β -estradiol.

Estudos tem sugerido que a alteração conformacional do domínio de ligação do hormônio induzido pelo ligante apresenta uma diferença na carga iônica na superfície dos complexos ligante-receptor. Antagonista de estrógeno podem induzir alterações no RE que não impedem a ligação com os elementos responsivos a estrógeno, mas que falham em promover eventos necessários para a transcrição de genes (WATANABE *et al.*, 2010).

A dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 parece não interferir na atividade avaliada, pois dos compostos estudados com e sem atividade estrogênica ou antiestrogênica todos apresentam essa característica estrutural.

A hidrofobicidade do complexo de ligação do ligante ao RE pode estar relacionada à estrogenicidade. O espaçamento das duas hidroxilas em cada extremidade da molécula principalmente hidrofóbica e planar é considerado como a base estrutural para atividade de ligação ao RE. Além disso, outros estudos baseados em equações de relações estrutura-atividade em duas dimensões (QSAR-2D) também associaram a interação ligante-RE com as estruturas do anel hidrofóbico e a capacidade de ligação do H do anel fenólico que imita o 3-OH do 17- β -estradiol (FANG *et al.*, 2001; CHOI *et al.*, 2008).

Mesmo observando os resultados do presente estudo, está bem estabelecido que os fitoestrógenos pertencem a diferentes classes de compostos, portanto, estruturas químicas por si só não são suficientes para prever a atividade estrogênica (DE-EKNAMKUL *et al.*, 2011). Além disso, os resultados observados neste estudo não excluem a atividade estrogênica dos compostos testados, pois estes podem atuar por mecanismos diferentes dos apresentados pelos ensaios.

As diferenças estruturais entre os dois receptores permitem que ligantes se liguem com afinidades diferentes, resultando em conformações diferentes do receptor ativado e recrutamento diferencial de coreguladores e atividade moduladora estrógeno-seletiva (McDONNELL, 2003). Dessa maneira, considerando que o 17- β -estradiol tem afinidade semelhante para os RE α e β , existem diferenças acentuadas quando comparamos com os fitoestrógenos (WARD e KUHNLE, 2010). Kuiper *et al.* (1998) relataram a preferência de ligação dos fitoestrógenos ao RE β . Han *et al.* (2002) também relataram que a sensibilidade dos fitoestrógenos pode ser aumentada ainda mais usando RE β . Entretanto, ligantes que são seletivos tanto para RE α quanto para RE β é um assunto de intensa investigação farmacêutica (SHEN *et al.*, 2007).

A discrepância entre os resultados no teste RYA e *E-screen* também pode ser atribuída aos diferentes mecanismos que ocorrem em leveduras e em células de mamíferos (GARCIA-REYERO *et al.*, 2004). A levedura, por exemplo, não contém receptores esteróides endógenos ou da tireóide, nem proteínas relacionadas como a aromatase. Além disso, o RE humano funciona como um fator de transcrição dependente do ligante em levedura (COLLINS *et al.*, 1997). Sendo assim, a estrogenicidade no RYA só pode ser avaliada por este mecanismo.

Outras observações que devem ser consideradas é que embora as leveduras apresentem diversas vantagens, como por exemplo, a facilidade de crescimento e manipulação das cepas, muitos fatores podem afetar a atividade estrogênica de uma substância quando testada neste sistema-teste (ZACHAREWSKI, 1998), tais como a incapacidade de distinguir estrógenos que exerçam atividade agonista parcial ou antagonista na levedura (LEGLER *et al.*, 2002), pois este ensaio simula apenas reações baseadas no mecanismo de interação do ligante ao receptor e não permite avaliar alguns fatores importantes, como a biodisponibilidade, metabolismo, bioativação e integração ao longo do tempo. A permeabilidade da membrana celular pode diferir entre as cepas de levedura (GARCIA-REYERO *et al.*, 2004), o que poderia explicar em parte os diferentes resultados observados neste estudo e a toxicidade das amostras, pode inibir completamente o crescimento da levedura, impedindo dessa maneira a detecção de compostos estrogênicos (TASHIRO *et al.*, 2004). No entanto, o ensaio RYA é conhecido como um ensaio de *screen* inicial e o formato de placas de microtitulação o torna adequado para o *screening* rápido de um grande número de amostras (HAN *et al.*, 2002). Já com relação às células MCF-7, a proliferação celular pode ser mediada por diferentes vias, entre elas as que não envolvem a ativação transcricional de genes de resposta ao estrógeno, além de poder incluir antiestrógenos. Isso pode complicar a interpretação dos resultados (VANPARYS *et al.*, 2010). Todos esses fatores ressaltam a importância da complementação dos dados de ambos os testes (GARCIA-REYERO *et al.*, 2004).

O impacto que a atividade estrogênica pode ter na prevenção ou no desenvolvimento de cânceres estrógeno-dependentes, como câncer de mama, ovário e do endométrio, é difícil de estabelecer. Em geral, espera-se que os agentes estrogênicos aumentem o risco de câncer. No entanto, a partir das evidências epidemiológicas, isto parece não ser o caso. A maioria dos estudos em humanos mostram o efeito oposto. Isto pode ser devido o consumo de flavonoides que possuem fraca atividade de ligação ao RE, evitando assim que os estrógenos endógenos mais potentes ativem vias possivelmente deletérias (ZAND *et al.*, 2000).

Entretanto, mais estudos são necessários para melhor entendimento das interações de ligação entre ligantes e receptores, já que uma maior compreensão da estrutura é importante na busca de fitoestrógenos preventivos, bem como no desenvolvimento de novas drogas derivadas de produtos naturais (CHOI *et al.*, 2008). Nesse contexto, podemos destacar dentre os compostos avaliados, a atividade

estrogênica do kaempferol mediada pela interação direta ao RE e pela estimulação da proliferação de células MCF-7/BUS. Além disso, este trabalho enfatiza mais uma vez a necessidade de complementariedade dos métodos de análise da atividade estrogênica.

5.4. Atividade antibacteriana

Neste trabalho observamos a relação entre a estrutura dos flavonoides (fisetina, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona, 7-hidroxiflavona, quercetina, flavona, kaempferol, luteolina, crisina e galangina) e sua atividade frente aos micro-organismos *S. aureus* (Gram-positiva) e *E. coli* (Gram-negativa). Essa classificação da maioria das bactérias desenvolvida pelo médico dinamarquês Hans Christian Gram em 1884 é baseada no fato de que bactérias Gram-positivas retêm o complexo cristal de violeta-iodo na descoloração com álcool etílico/ acetona e as Gram-negativas não. Este comportamento se deve, entre outros aspectos, à camada de peptidoglicano que nas Gram positivas é mais espessa, enquanto que nas Gram-negativas além de ser mais fina, há uma membrana lipopolissacarídea externa. A coloração de Gram é importante para diferenciação das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas uma vez que têm diferentes suscetibilidades a uma variedade de antibióticos (BYLKA *et al.*, 2004).

A resistência a agentes antimicrobianos é atualmente reconhecido como um problema global de saúde pública (MICELI *et al.*, 2011). Além disso, o uso de antibióticos é muitas vezes acompanhada de efeitos colaterais e dessa maneira a busca de compostos ativos contra cepas resistentes a antibióticos é contínua entre os flavonoides não tóxicos ou que tem baixa toxicidade (BYLKA *et al.*, 2004). Entretanto, considerando as variadas relações estrutura-atividade de diferentes compostos, não pode-se inferir que o comportamento biológico de uma droga é determinada pelo influência de um único parâmetro. Além disso, na maioria dos casos, a presença ou introdução de vários grupos funcionais em um composto não permite explicar exatamente as características, como o tipo e a intensidade de sua atividade biológica (ALCARÁZ *et al.*, 2000). No entanto, o estudo de relação estrutura-atividade realizado neste trabalho nos permite fazer algumas observações gerais sobre a estrutura e atividade antibacteriana dos flavonoides analisados.

Os flavonoides avaliados foram eficazes contra *S. aureus* e *E. coli*, em graus diferentes, sendo que a cepa de *S. aureus* foi mais sensível. As espécies bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas podem ter diferentes sensibilidades aos compostos

fenólicos devido as diferenças na ultraestrutura da célula associadas à parede celular ou camadas de contorno celular (MICELI *et al.*, 2011).

O *S. aureus* é a causa de uma série de doenças que afetam seres humanos e animais. Apesar dos avanços na ciência médica, na epidemiologia e a descoberta de novos antibióticos, infecções por *S. aureus* apresentam considerável morbidade e mortalidade (ALCARÁZ *et al.*, 2000).

O grau de hidroxilação das moléculas dos flavonoides avaliados no presente estudo, parece ter um papel crucial nos efeitos antibacterianos observados. O kaempferol, o composto mais ativo, apresenta uma hidroxila no anel B, uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 conjugado com um grupo 4-carbonil e hidroxilas nas posições 3, 5 e 7, mostrando que o balanço hidrofílico/lipofílico parece ser importante para atividade antibacteriana. Segundo MICELI *et al.* (2011), para um composto fenólico agir efetivamente como um antimicrobiano, este deve ser capaz de interferir na interface lipídeo-água e, portanto deve ser parcialmente hidrofóbico. A hidrofobicidade parcial de alguns compostos fenólicos lhes permite agir de forma eficiente na membrana interface de baterias Gram-positivas, o que pode prejudicar a plasticidade da membrana e, portanto desestabilizar a célula, enfraquecendo a integridade da membrana.

Além disso, os flavonoides avaliados neste estudo possuem dois anéis aromáticos ligados por um grupo carbonila α , β insaturado. Compostos carbonílicos geralmente exercem sua ação por meio da interação direta com enzimas através de ligações de hidrogênio (ALCARÁZ *et al.*, 2000), formando complexos com a parede celular ou interrompendo a síntese de envelopes bacterianos (KUREK *et al.*, 2011).

Recentemente, em uma revisão descrita por Cushnie e Lamb (2011), pesquisadores sugeriram que a atividade antibacteriana dos flavonoides pode ser atribuída a danos na membrana citoplasmática (causada por perfuração e/ ou redução da fluidez da membrana), inibição da síntese de ácidos nucleicos (causada pela inibição da topoisomerase) e inibição do metabolismo energético (causada pela inibição da NADH-citocromo C redutase). Outros estudos apresentados nessa revisão, sugeriram dois novos mecanismos como a inibição da síntese da parede celular e inibição da síntese da membrana celular, devido à inibição de enzimas relacionadas.

Há a constatação de que os flavonoides têm um efeito agregante (Fig. 22) em células bacterianas (CUSHNIE e LAMB, 2011), ou seja, a atividade antibacteriana em bactérias Gram-positivas pode ser devido à formação de agregados pseudo-multicelular. Provavelmente, os flavonoides não matam as células bacterianas, apenas induzem a

formação de agregados, reduzindo o número de UFC nas contagens viáveis (CUSHNIE e LAMB, 2005; MICELI *et al.*, 2011). Entretanto, este efeito agregante diminui a área de superfície o que pode resultar em uma diminuição do consumo de oxigênio, interrompendo a cadeia de transporte de elétrons e em uma diminuição de nutrientes como uridina e timidina, o que pode inibir a síntese de ácidos nucleicos (CUSHNIE e LAMB, 2011). Dessa maneira, a aparente capacidade dos flavonoides gerarem agregados de células merece maior investigação, uma vez que neste estudo, observou-se a diminuição do crescimento de *S. aureus* de forma acentuada nas diferentes concentrações de flavonoides testados.

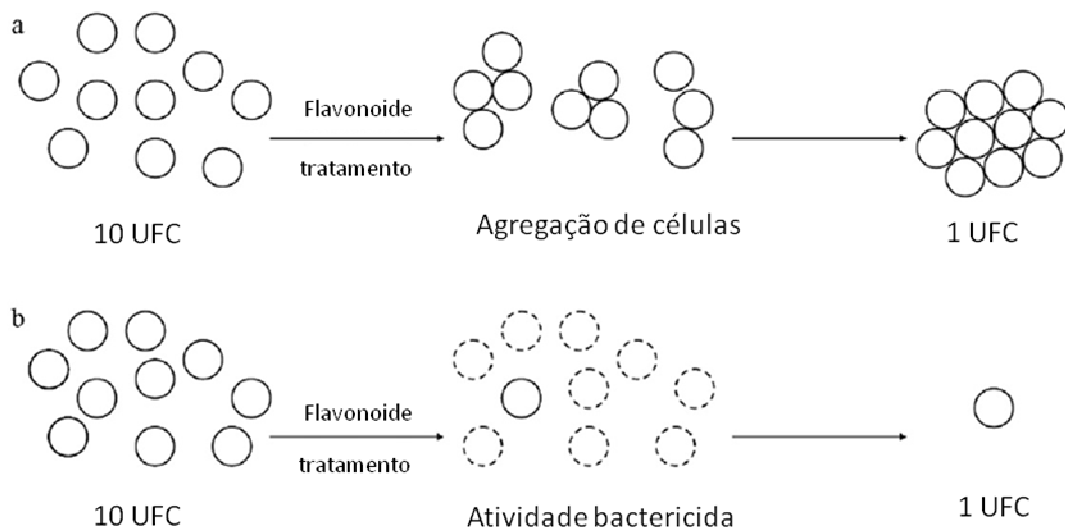


Figura 22 - Mecanismos pelos quais os flavonoides podem reduzir o número de unidades formadoras de colônia (UFC) (Fonte: CUSHNIE e LAMB, 2011)

Com relação à cepa de *E. coli* os compostos avaliados não inibiram completamente o crescimento bacteriano, apenas reduziram a porcentagem das células Gram-negativas nas condições utilizadas. As bactérias Gram-negativas, além da camada externa lipopolissacarídea, têm a membrana plasmática, o que poderia criar um ambiente desfavorável para o efeito de hiperacidificação dos compostos fenólicos simples (MICELI *et al.*, 2011). Além disso, de acordo com Hendra *et al.* (2011) as bactérias Gram-negativas são geralmente mais resistentes, devido a barreira de permeabilidade da membrana externa, o que limita o acesso dos agentes antimicrobianos aos seus alvos nas células bacterianas.

Considerando o esforço científico frente à elaboração de novos compostos antibacterianos, os flavonoides, devido à sua grande quantidade de propriedades biológicas, são colocados entre os derivados de plantas mais atraentes para enriquecer as opções de terapia atual (KUREK *et al.*, 2011). Este estudo nos permite concluir que além da importância de avaliar a alteração estrutural dos flavonoides antimicrobianos, a identificação definitiva dos mecanismos de ação é a chave para o desenvolvimento farmacológico destes compostos, permitindo a antecipação de problemas relacionados com a segurança clínica e resistência à droga (CUSHNIE e LAMB, 2011).

6. *Conclusões*

*“Deus não fez tudo num só dia;
o que me faz pensar que eu possa?”*

William Shakespeare

6.1. Atividade mutagênica

O estudo sobre a mutagenicidade de diferentes flavonoides, por meio do Teste de Ames, nas condições utilizadas, levou às seguintes conclusões:

- A quercetina, que tem duas hidroxilas na posição *orto* no anel B e hidroxilas livres nas posições 3, 5 e 7, demonstrou ser diretamente mutagênica na linhagem TA98 e TA100 e sua mutagenicidade aumentou em presença de ativação metabólica. A eliminação ou modificação de qualquer uma dessas hidroxilas foi capaz de reduzir significativamente a mutagenicidade, como observado nos resultados com kaempferol e galangina, indicando que o número e a posição das hidroxilas no anel B parece ter uma influência específica sobre a genotoxicidade dos compostos.

- Nas linhagens TA98, TA100 e TA102, a mutagenicidade detectada na presença de ativação metabólica, demonstra que a quercetina induz substituição de pares de bases (TA100 e TA102) e a uma taxa mais elevada mutações do tipo *frameshift* (TA98);

- Kaempferol mostrou uma indução dose-dependente de revertentes na linhagem TA98, na presença da mistura S9, demonstrando dessa maneira atividade mutagênica;

- As linhagens de *S. typhimurium* foram bastante sensíveis aos efeitos tóxicos da galangina, por isso foi necessário diminuir as doses. A galangina demonstrou ser mutagênica apenas na linhagem TA98, na presença da mistura S9;

- Nenhum dos outros flavonoides (luteolina, fisetina, flavona, crisina, 3-hidroxiavona, 5-hidroxiavona e 7-hidroxiavona) foram capazes de induzir um aumento significativo no número de revertentes, demonstrando que esses compostos não possuem atividade mutagênica, nas condições utilizadas neste estudo;

6.2. Atividade antimutagênica

O estudo sobre a antimutagenicidade dos flavonoides contra mutágenos de ação direta e indireta, por meio do Teste de Ames, nas condições utilizadas, levou às seguintes conclusões:

- Dentre os compostos estudados, a fisetina foi o único composto que não exibiu qualquer efeito protetor quando associada com o NPD, na linhagem TA98. Todos os outros flavonoides reduziram as mutações induzidas por esse mutágeno, demonstrando dessa maneira atividade antimutagênica;
- Em experimentos com ativação metabólica para a linhagem TA98, a mutagenicidade do B[a]P foi significativamente reduzida por todos os compostos, exceto pela quercetina que potencializou o efeito mutagênico desse composto;
- A luteolina e a crisina reduziram a resposta mutagênica da AZS e da AFB₁ na linhagem TA100 em experimentos sem e com ativação metabólica, respectivamente. Já os compostos 3-hidroxiavona e 7-hidroxiavona exibiram um efeito protetor moderado contra AZS, enquanto os compostos kaempferol e galangina reduziram o número de colônias revertentes induzidas pela AFB₁, indicando a antimutagenicidade desses compostos na linhagem TA100;
- Todos os compostos reduziram a mutagenicidade do mutágeno indireto 2-AA, na linhagem TA102, exceto o kaempferol e a avona. Enquanto que o kaempferol, luteolina, 3-hidroxiavona e 7-hidroxiavona inibiram as mutações induzidas pela MMC em experimentos sem ativação metabólica, mostrando assim os efeitos antimutagênicos desses compostos na linhagem TA102.

6.3 Atividade estrogênica

O estudo sobre estrogenicidade dos flavonoides, no teste RYA e *E-screen*, nas condições utilizadas, levou às seguintes conclusões:

- O kaempferol foi o único composto que mostrou uma maior estimulação dos REs no teste RYA, exibindo dessa maneira atividade estrogênica, além de apresentar maior capacidade de induzir o crescimento de células MCF-7/BUS, correspondendo a um agonista total;

- Os outros compostos não apresentaram níveis detectáveis de estrogenicidade no teste RYA. No entanto os compostos galangina, luteolina e fisetina exibiram um aumento significativo na proliferação de células MCF-7/BUS, atuando dessa maneira como agonistas parciais;
- Os compostos quercetina, crisina, 3-hidroxiavona, 5-hidroxiavona, 7-hidroxiavona e flavona não induziram efeito sobre a proliferação celular, revelando que esses compostos não foram estrogênicos no teste *E-screen*;
- Dentre os compostos estudados, a quercetina, crisina e 3-hidroxiavona foram capazes de inibir estatisticamente a proliferação celular induzida pelo 17- β -estradiol, atuando dessa maneira como compostos estrogênicos antagonistas ou antiestrogênicos;
- Os outros compostos não apresentaram diferenças estatísticas na inibição da proliferação celular quando comparado com o 17- β -estradiol, nas condições utilizadas neste estudo.

6.4. Atividade antibacteriana

O estudo sobre a atividade antibacteriana dos flavonoides, nas condições utilizadas, levou às seguintes conclusões:

- Os flavonoides avaliados foram eficazes contra *S. aureus* e *E. coli*, em graus diferentes;
- A cepa de *S. aureus* foi mais sensível aos diferentes flavonoides sendo que o kaempferol foi o composto mais ativo.
- Os compostos avaliados apenas induziram uma redução na porcentagem do crescimento de *E. coli*, variando de 65-90%, nas condições utilizadas neste trabalho.

6.5. Conclusão Geral

Esses estudos contribuíram para esclarecer os mecanismos pelos quais os flavonoides agem nas atividades mutagênica, antimutagênica, estrogênica e antibacteriana, na segurança e eficácia antes que eles possam ser amplamente utilizados em benefício.

A mutagenicidade dos compostos quercetina, kaempferol e galangina foi determinada por uma combinação de elementos estruturais. Geralmente, os flavonoides têm sido caracterizados como antioxidantes capazes de proporcionar efeitos benéficos à saúde. No entanto, alguns deles podem ser biotransformados em produtos potencialmente genotóxicos como foi observado neste trabalho.

As propriedades antimutagênicas dos flavonoides avaliados envolveram vários mecanismos, indicando que o número e a posição de hidroxilas na molécula pode aumentar ou diminuir o efeito de proteção, dependendo do tipo e concentração de flavonoide e mutágeno usado e da linhagem utilizada.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, podemos destacar dentre os compostos avaliados, a atividade estrogênica do kaempferol. Além disso, este trabalho enfatiza a necessidade de complementariedade dos métodos de análise da atividade estrogênica.

Considerando a atividade antibacteriana dos flavonoides, podemos mais uma vez destacar a atividade do kaempferol frente ao *S. aureus*. O grau de hidroxilação das moléculas dos flavonoides avaliados no presente estudo, parece ter um papel crucial nos efeitos antibacterianos observados.

7. Referências*

*"O mundo é como um espelho que devolve a cada pessoa
o reflexo de seus próprios pensamentos
e seus atos."*

Luis Fernando Verissimo

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (NBR 6023): informação e documentação:
referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ABRAHAMSE, S. L.; KLOOTS, W. J.; VAN AMELSVOORT, J. M. M. Absorption, distribution, and secretion of epicatechin and quercetin in the rat. **Nutr Res**, v. 25, p. 305 - 317, 2005.

AGGARWAL, B. B.; TAKADA, Y.; OOMMEN, O. V. From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. **Expert Opin on Investig Drugs**, v. 13, p. 1327 - 1338, 2004.

AIRES, M. M.; FAVARETO, A. L. V.; BIANCO, A. C.; CARVALHO, A. C. C.; CASSOLA, A. C.; TIMO - IARIA, C.; TOLEDO, C. A. B.; VASSALLO, D. V.; HAMASSAKI-BRITTO, D. E.; SANIOTO, D. L.; KIMURA, E. T.; VASQUEZ, E. C.; MALNIC, G.; SALGADO, H. C.; KETTELHUT, I. C.; SEFANON, I.; PROCOPIO-ARAÚJO, J.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CIPOLLA-NETO, J.; MILL, J. G.; FRANCHINI, K. G.; MICHELINI, L. C.; BARCELLOS, L. C.; BRITTO, L. R. G.; BALDO, M. V. C.; IRIGOYEN, M. C.; DOS SANTOS, M. J. C.; NUNES, M. T.; LAZARETTI-CASTRO, M.; MASUDA, M. O.; ROCHA E SILVA, M.; REBOUÇAS, N. A.; CANTERAS, N. S.; BRUM, P. C.; ROCCO, P. R. M.; SANTOS, P. E. B.; LINDEN, R.; MIGLIORINI, R. H.; DOS SANTOS, R. A.; RABELO, R.; FAZAN JUNIOR, R.; LACCHINI, S.; ANDRADE, S. P.; AFECHE, S. C.; SANIOTO, S. M. L.; LORENZI, T. F.; VERRASTRO, T.; SILVA, V. J. D.; ZIN, W. A.; VARANDA, W. A. **Fisiologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

AJITH, T. A.; SOJA, M. A comparative study on the antimutagenicity of atorvastatin and lovastatin against directly acting mutagens. **Cell Biol Toxicol**, v. 22, n. 4, p. 269 - 274, 2006.

AKIYAMA, T.; ISHIDA, J.; NAKAGAWA, S.; OGAWARA, H.; WATANABE, S.; ITOH, N.; SHIBUYA, M.; FUKAMI, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. **J Biol Chem**, v. 262, p. 5592 - 5595, 1987.

ALCARÁZ, L. E.; BLANCO, S. E.; PUIG, O. N.; TOMÁS, F.; FERRETTI, F. H. Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J Theor Biol**, v. 205, n. 2, p. 231 - 240, 2000.

AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, p. 7915 – 7922, 1993.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids – Chemistry, Biochemistry and Applications**. CRC Taylor & Francis: Boca Raton, 2006.

ANSTEAD, G. M.; CARLSON, K. E.; KATZENELLENBOGEN, J. A. The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. **Steroids**, v. 62, n. 3, p. 268 - 303, 1997.

ARRIAGA-ALBA, M.; BLASCO, J. L.; RUÍZ-PÉREZ, N. J.; SÁNCHEZ-NAVARRETE, J.; RIVERA-SÁNCHEZ, R.; GONZÁLEZ-AVILA, M. Antimutagenicity mechanisms of the *Rhoeo discolor* ethanolic extract. **Exp Toxicol Pathol**, v. 63, p. 243 - 248, 2011.

BAIRD, W. M.; HOOVEN, L.; MAHADEVAN, B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. **Environ Mol Mutagen**, v. 45, p. 106 - 114, 2005.

BARNES, S. The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. **Lymphat Res Biol**, v. 8, p. 89 – 98, 2010.

BECKER, K.; HU, Y.; BILLER-ANDORNO, N. Infectious diseases: a global challenge. **Int J Med Microbiol**, v. 296, n. 4-5, p. 179-185, 2006.

BENIGNI, R.; BOSSA, C. Structure alerts for carcinogenicity, and the *Salmonella* assay system: A novel insight through the chemical relational databases technology. **Mutat Res**, v. 659, p. 248 – 261, 2008.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutat Res**, v. 97, p. 267–281, 1982.

BERTHOIS, Y.; KATZENELLENBOGEN, J.; KATZENELLENBOGEN, B. Phenol red in tissue culture media is a weak oestrogen: implications concerning the study of oestrogen-responsive cells in 126 culture. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 83, p. 2496 - 2500, 1986.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **Eur J Pharmacol**, v. 585, n. 2-3, p. 325 - 337, 2008.

BOOTS, A. W.; LI, H.; SCHINS, R. P.; DUFFIN, R.; HEEMSKERK, J. W.; BAST, A.; HAENEN, G. R. The quercetin paradox. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 222, n. 1, p. 89 - 96, 2007.

BRAVO, L. B. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr Rev**, v. 56, p. 317 - 333, 1998.

BREINHOLT, V.; LARSEN, J. C. Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay. **Chem Res Toxicol**, v. 11, n. 6, p. 622 - 629, 1998.

BRIX, R.; NOGUEROL, T. N.; PIÑA, B.; BALAAM, J.; NILSEN, A. J.; TOLLEFSEN, K. E.; LEVY, W.; SCHRAMM, K. W.; BARCELÓ, D. Evaluation of the suitability of recombinant yeast-based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. **Environ Int**, v. 36, n. 4, p. 361 - 367, 2010.

BROWN, J. P.; DIETRICH, P. S. Mutagenicity of plant flavonoids in the *Salmonella*/mammalian microsome test. Activation of flavonol glycosides by mixed glycosides from rat fecal bacteria and other sources. **Mutat Res**, v. 66, p. 223 - 240, 1979.

BRZEZINSKI, A.; DEBI, A. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 85, n. 1, p. 47 - 51, 1999.

BUER, C. S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. Flavonoids: new roles for old molecules. **J Integr Plant Biol**, v. 52, n. 1, p. 98-111, 2010.

BYLKA, W.; MATLAWSKA, I.; PILEWSKI, N.A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **JANA**, v. 7, n. 2, p. 24 - 31, 2004.

CAO, P.; CAI, J.; GUPTA, R. C. Effect of green tea catechins and hydrolyzable tannins on benzo[*a*]pyrene-induced DNA adducts and structure-activity relationship. **Chem Res Toxicol**, v. 23, n. 4, p. 771, 777, 2010.

CÉSPEDES, R.; LACORTE, S.; RALDÚA, D.; GINEBREDA, A.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain). **Chemosphere**, v. 61, n. 11, p. 1710 – 1719, 2005.

CÉSPEDES, R.; PETROVIC, M.; RALDUA, D.; SAURA, U.; PINA, B.; LACORTE, S.; VIANA, P.; BARCELO, D. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC–ESI-MS. **Anal Bioanal Chem**, v. 378, p. 697 – 708, 2004.

CHAKRAVARTI, D.; VENUGOPAL, D.; MAILANDER, P. C.; MEZA, J. L., HIGGINBOTHAM, S.; CAVALIERI, E. L.; ROGAN, E. G. The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin. **Mutat Res**, v. 649, p. 161 - 178, 2008.

CHEBIL, L.; ANTHONI, J.; HUMEAU, C.; GERARDIN, C.; ENGASSER, J. M.; GHOUL, M. Enzymatic acylation of flavonoids: Effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity. **J Agric Food Chem**, v. 55, p. 9496 - 9502, 2007.

CHEN, L.; DEVANESAN, P. D.; HIGGINBOTHAM, S.; ARIESE, F.; JANKOWIAK, R.; SMALL, G. J.; ROGAN, E. G.; CAVALIERI, E. L. Expanded analysis of benzo[*a*]pyrene-DNA adducts formed in vitro and in mouse skin: Their significance in tumor initiation. **Chem Res Toxicol**, v. 9, p. 897 - 903, 1996.

CHOI, S. Y.; HA, T. Y.; AHN, J. Y.; KIM, S. R.; KANG, K. S.; HWANG, I. K.; KIM, S. Estrogenic activities of isoflavones and flavones and their structure-activity relationships. **Planta Med**, v. 74, n. 1, p. 25 - 32, 2008.

CHUN, O. K.; CHUNG, S. J.; SONG, W. O. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. **J Nutr.**, v. 137 (5), p. 1244-1252, 2007.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environ Health Perspect**, v. 101, n. 5, p. 378-384, 1993.

COLDHAM, N. G.; ZHANG, A. Q.; KEY, P.; SAUER, M. J. Absolute bioavailability of [¹⁴C] genistein in the rat; plasma pharmacokinetics of parent compound, genistein glucuronide and total radioactivity. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, v. 27, p. 249 - 258, 2002.

COLLINS, B. M.; MCLACHLAN, J. A.; ARNOLD, S. F. The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. **Steroids**, v. 62, n. 4, p. 365 - 372, 1997.

COUSE, J. F.; LINDZEY, J.; GRANDIEN, K.; GUSTAFSSON, J. A.; KORACH, K.S. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β . (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse. **Endocrinology**, v. 138, p. 4613 - 4621, 1997.

CRESPO, I.; GARCÍA-MEDIAVILLA, M. V.; ALMAR, M.; GONZÁLEZ, P.; TUÑÓN, M. J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidant enzyme expression induced by proinflammatory cytokines in Chang Liver cells. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 5, p. 1555 – 1569, 2008.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int J Antimicrob Agents**, v. 26, p. 343 – 356, 2005.

CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **Int J Antimicrob Agents**, v. 38, n. 2, p. 99 - 107, 2011.

DANG, Z. C.; AUDINOT, V.; PAPAPOULOS, S. E.; BOUTIN, J. A.; LOWIK, C. W. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. **J Biol Chem**, v. 278, p. 962–967, 2003.

DAY, A. J.; DUPONT, M. S.; RIDLEY, S.; RHODES, M.; RHODES, M. J.; MORGAN, M. R.; WILLIAMSON, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. **FEBS Lett**, v. 436, n. 1, p. 71-75, 1998.

DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M. C.; MCCARROLL, N. E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L. R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutat Res**, v. 521, p. 121 – 135, 2002.

DE-EKNAMKUL, W.; UMEHARA, K.; MONTHAKANTIRAT, O.; TOTH, R.; FRECER, V.; KNAPIC, L.; BRAIUCA, P.; NOGUCHI, H.; MIERTUS, S. QSAR study of natural estrogen-like isoflavonoids and diphenolics from Thai medicinal plants. **J Mol Graph Model**, v. 29, n. 6, p. 784 – 794, 2011.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L. T. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutat Res**, v.591, p.8-15, 2005.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A. L.; D'AGOSTINI, F.; BALANSKY, R. M.; NOONAN, D.; ALBINI, A. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other related diseases. **Mutat Res**, v. 480-481, p. 9 - 22, 2001.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutat Res**, v. 402, p. 151 - 158, 1998.

DE FLORA, S.; RAMEL, C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis, Classification and overview. **Mutat Res**, v. 202, p. 285-306, 1998.

DELANEY, B.; PHILLIPS, K.; VASQUEZ, C.; WILSON, A.; COX, D.; WANG, H. B.; MANTHEY, J. Genetic toxicity of a standardized mixture of citrus polymethoxylated flavones. **Food Chem Toxicol**, v. 40, p. 617 - 624, 2002.

DHOOGHE, W.; ARIJS, K.; D'HAESE, I.; STUYVAERT, S.; Versonnen, B.; JANSSEN, C.; VERSTRAETE, W.; COMHAIRE, F. Experimental parameters affecting sensitivity and specificity of a yeast assay for estrogenic compounds: results of an interlaboratory validation exercise. **Anal Bioanal Chem**, v. 386, n. 5, p. 1419 - 1428, 2006.

DORAI, T.; AGGARWAL, B. B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. **Cancer Lett**, v. 215, p. 129 - 140, 2004.

DUARTE SILVA, I., GASPAR, J., GOMES DA COSTA, G., RODRIGUES, A.S., LAIRES, A., AND RUEFF, J. Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutical agents. **Chem Biol Interact**, v. 124, p. 29 – 51, 2000.

DUARTE SILVA, I.; GASPAR, J.; RODRIGUES, A. S.; GOMES DA COSTA, B.; LAIRES, A.; RUEFF, J. Mechanisms of myricetin mutagenicity in V79 cells: Involvement of radicalar species. **Teratog Carcinog Mutagen**, v.16, p. 253 – 268, 1996.

DUARTE SILVA, I.; RODRIGUES, A. S.; GASPAR, J.; LAIRES, A.; RUEFF, J. Metabolism of galangin by rat cytochromes P450: relevance to the genotoxicity of galangin. **Mutat Res**, v. 393, p. 247 - 257, 1997.

EDENHARDER, R.; GRÜNHAGE, D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. **Mutat Res**, v. 540, n. 1, p. 1 – 18, 2003.

EDENHARDER, R.; RAUSCHER, R.; PLATT, K. L. The inhibition by flavonoids of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline metabolic activation to a mutagen: a structure–activity relationship study. **Mutat Res**, v. 379, p. 21 - 32, 1997.

FANG, H.; TONG, W.; PERKINS, R.; SOTO, A. M.; PRECHTL, N. V.; SHEEHAN, D. M. Quantitative comparisons of *in vitro* assays for estrogenic activities. **Environ Health Perspect**, v. 108, p. 723 - 729, 2000.

FANG, H.; TONG, W.; SHI, L. M.; BLAIR, R.; PERKINS, R.; BRANHAM, W.; HASS, B. S., XIE, Q.; DIAL, S. L.; MOLAND, C. L.; SHEEHAN, D. M. Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. **Chem Res Toxicol**, v. 14, n. 3, p. 280 - 294, 2001.

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

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutat Res**, v. 475, p. 89 – 111, 2001.

FERNANDEZ, M. P.; BUCHANAN, I. D.; IKONOMOU, M. G. Seasonal variability of the reduction in estrogenic activity at a municipal WWTP. **Water Res**, v. 42, n. 12, p. 3075 – 3081, 2008.

FERNANDEZ, M. P.; NOGUEROL, T. N.; LACORTE, S.; BUCHANAN, I.; PIÑA, B. Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay. **Anal Bioanal Chem**, v. 393, n. 3, p. 957 – 968, 2009.

FERRER, J. L.; AUSTIN, M. B.; STEWART, C. JR.; NOEL, J. P. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiol Biochem**, v. 46, n. 3, p. 356 - 370, 2008.

FISHMAN, N. Antimicrobial stewardship. **Am J Infect Control**, v. 34, n. 5, p. 55 - 63, 2006.

FONTENOT, K.; NARAGONI, S.; CLAVILLE, M.; GRAY, W. Characterization of Bizzy Nut extracts in estrogen-responsive MCF-7 breast cancer cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 220, n. 1, p. 25 – 32, 2007.

FRIEDRICH, K. **Alteração da expressão do receptor de estrogênio subtipo α relacionada à abertura de vagina em ratas Sprague-Dawley**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2003.

GALIJATOVIC, A.; OTAKE, Y.; WALLE, U. K.; WALLE, T. Extensive metabolism of the flavonoid chrysin by human Caco-2 and Hep G2 cells. **Xenobiotica**, v. 29, p. 1241 -1256, 1999.

GARCIA-REYERO, N.; GRAU, E.; CASTILLO, M.; LÓPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. **Environ Toxicol Chem**, v. 20, n. 6, p. 1152 – 1158, 2001.

GARCIA-REYERO, N.; REQUENA, V.; PETROVIC, M.; FISCHER, B.; HANSEN, P. D.; DÍAZ, A.; VENTURA, F.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Estrogenic potential of halogenated derivatives of nonylphenol ethoxylates and carboxylates. **Environ Toxicol Chem**, v. 23, n. 3, p. 705 – 711, 2004.

GARCIA-REYERO, N.; PIÑA, B.; GRIMALT, J. O.; FERNÁNDEZ, P.; FONTS, R.; POLVILLO, O.; MARTRAT, B. Estrogenic activity in sediments from European mountain lakes. **Environ Sci Technol**, v. 39, n. 6, p. 1427-1435, 2005.

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

GEE, J. M.; DUPONT, M. S.; RHODES, M. J. C.; JOHNSON, I. T. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. **Free Radic Biol Med**, v. 25, p. 19 - 25, 1998.

- GENTILE, J. M.; GENTILE, G.; LOHMAN, P. H.; FERGUSON, L. R. Antimutagenesis/ anticarcinogenesis 2001: mechanistic studies. **Mutat Res**, v. 480, p. 1 - 7, 2001.
- GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Quim Nova**, v. 30, p. 695-706, 2007.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- GREENBLATT, M. S.; BENNETT, W. P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C. C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res**, v. 54, p. 4855 – 4878, 1994.
- GREEN, S.; CHAMBON, P. **The oestrogen receptor: from perception to mechanism**. In: PARKER, M. G. (Ed.). Nuclear hormone receptors. London: Academic Press, 1991. p 15-38.
- GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; GARCÍA-MEDIAVILLA, M. V.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. **Br J Nutr**, v. 104, p. 15 – 27, 2010.
- GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M.; WESSLER, S. R. **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 764p.
- GUDIÑA, E. J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. paracasei A20. **Lett Appl Microbiol**, v. 50, n. 4, p. 419 – 424, 2010.
- GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor β : a new dimension in estrogen mechanism of action. **J Endocrinol**, v.163, p. 379 - 383, 1999.

HAHN, W.C.; WEINBERG, R. A. Rules for making human tumor cells. **N Engl J Med**, v. 347, p. 1593 – 603, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **J Lab Clin Med**, v. 119, p. 598 – 620, 1992.

HALLIWELL, B. How to characterise a biological antioxidant. **Free Rad Res**, v. 9, p. 1–32, 1990.

HALLIWELL, B.; RAFTER, J.; JENNER, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? **Am J Clin Nutr**, v. 81, p. 268-276, 2005.

HAMADA, M.; SATSU, H.; ASHIDA, H.; SUGITA-KONISHI, Y.; SHIMIZU, M. Metabolites of galangin by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible cytochrome P450 1A1 in human intestinal epithelial Caco-2 cells and their antagonistic activity toward aryl hydrocarbon receptor. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 13, p. 8111 - 8118, 2010.

HAMBRAEUS, A. Lowbury lecture 2005: infection control from a global perspective. **J Hosp Infect**, v. 64, n. 3, p. 217 - 223, 2006.

HAN, D. H.; DENISON, M. S.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 66, n. 7, p. 1479 – 1487, 2002.

HARGREAVES, D. F.; POTTEN, C. S.; HARDING, C. Two week dietary soy supplementation has an estrogenic effect on normal premenopausal breast. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, n. 11, p. 4017 - 4024, 1999.

HARRISON, P. T.; HOLMES, P.; HUMFREY, C. D. Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure? **Sci Total Environ**, v. 205, n. 2-3, p. 97-106, 1997.

HASENBRINK, G.; SIEVERNICH, A.; WILDT, L.; LUDWIG, J.; LICHTENBERG-FRATÉ, H. ESTROGENIC effects of natural and synthetic compounds including tibolone assessed in *Saccharomyces cerevisiae* expressing the human estrogen alpha and beta receptors. **FASEB J**, v. 20, n. 9, p. 1552-1554, 2006.

HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; BORZELLECA, J. F.; FLAMM, G. W.; WILLIAMS, G. M.; LINES, T. C. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food Chem Toxicol**, v. 45, p. 2179 - 2205, 2007.

HEIM K. E.; TAGLIAFERRO A. R.; BOBILYA D. J. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J Nutr Biochem**, v. 13, p. 572 - 584, 2002.

HENDRA, R.; AHMAD, S.; SUKARI, A.; SHUKOR, M. Y.; OSKOUEIAN, E. Flavonoid analyses and antimicrobial activity of various parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 6, p. 3422 – 3431, 2011.

HEO, M. Y.; SOHN, S. J.; AU, W. W. Anti-genotoxicity of galangin as cancer chemopreventive agent candidate. **Mutat Res**, v. 488, p. 135 - 150, 2001.

HODEK, P.; TREFIL, P.; STIBOROVÁ, M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. **Chemico-Biol Interact**, v. 139, n. 1, p. 1 - 21, 2002.

HOU, D. X.; KUMAMOTO, T. Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: direct binding and molecular modeling. **Antiox Redox Signal**, v. 13, p. 691 - 719, 2010.

INNOCENTI, G.; VEGETO, E.; DALL'ACQUA, S.; CIANA, P.; GIORGETTI, M.; AGRADI, E.; SOZZI, A.; FICO, G.; TOMÈ, F. *In vitro* estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. **Phytomed**, v. 14, n. 2-3, p. 147-152, 2007.

JONES, P. A.; BAKER, V. A.; IRWIN, A. J. E.; EARL, L. K. Interpretation of the *in vitro* proliferation response of MCF-7 cells to potential oestrogens and non-oestrogenic substances. **Toxicol in vitro**, v.12, p. 373-382, 1998.

KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, N. **Environmental desmutagens and antimutagens**. In: KLEKOWSKI, E. J. (Ed.), New York: Environmental Mutagenesis and Plant Biology, 1982. pp. 137-151.

KAMATA, R.; SHIRAIISHI, F.; NAKAJIMA, D.; KAGEYAMA, S. Estrogenic effects of leachates from industrial waste landfills measured by a recombinant yeast assay and transcriptional analysis in Japanese medaka. **Aquatic Toxicol**, v. 101, n. 2, p. 430 – 437, 2011.

KANDASWAMI, C.; LEE, L. T.; LEE, P. P.; HWANG, J. J.; KE, F. C.; HUANG, Y. T.; LEE, M. T. The antitumor activities of flavonoids. **In vivo**, v. 19, n. 5, p. 895 - 909, 2005.

KANG, S. C.; LEE, C. M.; CHOI, H.; LEE, J. H.; OH, J. S.; KWAK, J. H.; ZEE, O. P. Evaluation of oriental medicinal herbs for estrogenic and antiproliferative activities. **Phytother Res**, v. 20, n. 11, p. 1017-1019, 2006.

KAY, C. D. The future of flavonoid research. **Brit J Nutr**, v. 104, p. 91 – 95, 2010.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; EICHENLAUB-RITTER, U.; DECORDIER, I. Indirect mechanisms of genotoxicity. **Toxicol Lett**, v. 140-141, p. 63-74, 2003.

KITANI, K.; KANAI, S.; IVY, G. O.; CARRILLO, M. C. Pharmacological modifications of endogenous antioxidant enzymes with special reference to the effects of deprenyl: a possible antioxidant strategy. **Mech Ageing Dev**, v. 111, p. 211 - 221, 1999.

KNASMÜLLER S.; STEINKELLNER H. B. J.; MAJER E. C.; NOBIS G.; SCHARF G.; KASSIE, F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological

aspect and extrapolation aspect and extrapolation problems. **Food Chem Toxicol**, v. 40, p. 1051 - 1062, 2002.

KNIGHT, D. C.; EDEN, J. A. Phyto-oestrogens – a short review. **Maturitas**, v. 22, p. 167 - 175, 1995.

KORACH, K. S.; MCLACHLAN, J. A. Techniques for detection of estrogenicity. **Environ Health Perspect**, v. 103. p. 5-8, 1995.

KUCH, B.; KERN, F.; METZGER, J. W.; VON DER TRENCK, K. T. Effect-related monitoring: estrogen-like substances in groundwater. **Environ Sci Poll Res Int**, v. 17, n. 2, p. 250 – 260, 2010.

KUIPER, G. G.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; VAN DER SAAG, P. T.; VAN DER BURG, B.; GUSTAFSSON, J. A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinol**, v. 139, p. 4252–4263, 1998.

KUREK, A.; GRUDNIAK, A. M.; KRACZKIEWICZ-DOWJAT, A.; WOLSKA, K. I. New antibacterial therapeutics and strategies. **Polish J Microbiol**, v. 60, n. 1, p. 3 - 12, 2011.

KURODA, Y.; JAIN, K. A.; TEZUKA, H.; KADA, T. Animutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutat Res**, v. 267, p. 201-209, 1992.

KURZER, M. S. Phytoestrogen supplement use by women. **J Nutr**, v. 133, n. 6, p. 1983-1986, 2003.

LANGFIELD, R. D.; SCARANO, F. J.; HEITZMAN, M. E.; KONDO, M.; HMMOND, G. B.; NETO, C. C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **J Ethnopharmacol**, v. 94, p. 279 - 281, 2004.

LAUGHTON, M. J.; HALLIWELL, B.; EVANS, P. J.; HOULT, J. R. Antioxidant and pro-oxidant actions of plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin dependant DNA damage. **Biochem Pharmacol**, v.38, p. 2859 – 2865, 1989.

LEGLER, J.; DENNEKAMP, M.; VETHAAK, A. D.; BROUWER, A.; KOEMAN, J. H.; VAN DER BURG, B.; MURK, A. J. Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using in vitro reporter gene assays. **Sci Total Environ**, v. 293, n. 1-3, p. 69-83, 2002.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. E.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Porto Alegre: ArtMed, 1995.

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

LIN, Y.; SHI, R.; WANG, X.; SHEN, H. M. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. **Curr Cancer Drug Targ**, v. 8, n. 7, p. 634 – 646, 2008.

LIRA, W. M.; DOS SANTOS, F. V.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *salmonella typhimurium* assays. **J Med Food**, v. 11, n. 1, p. 111-119, 2008.

LIU, Y.; HU, M. Absorption and metabolism of flavonoids in the caco-2 cell culture model and a perused rat intestinal model. **Drug Metab Dispos**, v. 30, p. 370 - 377, 2002.

LIVIERO, L.; VON BORSTEL, R. C. The 4th International Conference on Mechanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesis: a summary. **Mutat Res**, v. 350, p. 287-293, 1996.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; DE VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rur**, v. 35, p. 371 - 376, 2005.

LOH, D. S.; ER, H. M.; CHEN, Y. S. Mutagenic and antimutagenic activities of aqueous and methanol extracts of *Euphorbia hirta*. **J Ethnopharmacol**, v. 126, n. 3, p. 406 - 414, 2009.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. **Mini Rev Med Chem**, v. 9, n. 1, p. 31-59, 2009.

MAKENA, P. S.; CHUNG, K. T. Effects of various plant polyphenols on bladder carcinogen benzidine-induced mutagenicity. **Food Chem Toxicol**, v. 45, 1899 - 1909, 2007.

MANGELSDORF, D. J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHÜTZ, G.; UMESONO, K.; BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P.; EVANS, R. M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835-839, 1995.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat Res**, v. 113, n. 3-4, p. 173 - 215, 1983.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P. V.; DECORDIER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1515 – 1531, 2006.

MAZZATORTA, P.; TRAN, L. A.; SCHILTER, B.; GRIGOROV, M. Integration of structure-activity relationship and artificial intelligence systems to improve in silico prediction of Ames test mutagenicity. **J Chem Inf Mod**, v. 47, p. 34-38, 2007.

MAURICH, T.; PISTELLI, L.; TURCHI, G. Anti-clastogenic activity of two structurally related pterocarpan purified from *Bituminaria bituminosa* in cultured human lymphocytes. **Mutat Res**, v. 561, p. 75–81, 2004.

MCDONNELL, D. P. Mining the complexities of the estrogen signaling pathways for novel therapeutics. **Endocrinol**, v. 144, p. 4237 - 4340, 2003.

MICELI, N.; TROVATO, A.; MARINO, A.; BELLINGHIERI, V.; MELCHINI, A.; DUGO, P.; CACCIOLA, F.; DONATO, P.; MONDELLO, L.; GÜVENÇ, A.; DE PASQUALE, R.; TAVIANO, M. F. Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill. berries from Turkey. **Food Chem Toxicol**, v. 49, n. 10, p. 2600 – 2608, 2011.

MICHELS, G.; HAENEN, G. R.; WÄTJEN, W.; RIETJENS, S.; BAST, A. The thiol reactivity of the oxidation product of 3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one containing flavonoids. **Toxicol Lett**, v. 151, n. 1, p. 105 – 111, 2004.

MICSICEK, R. J. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. **J Steroid Biochem Mol**, v. 49, p. 153 - 160, 1994.

MICSICEK, R. J. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. **Mol Pharmacol**, v. 44, p. 37 - 43, 1993.

MOL, M. C. N.; MONTALBÁN, E. B. Fitoestrógenos: posibilidades terapêuticas. **Rev Fitot**, v. 1, n. 3, p. 165 - 180, 2001.

MOON, Y. J.; WANG, X.; MORRIS, M. E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicol in vitro**, v. 20, n. 2, p.187 – 210, 2006.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutat Res**, v. 455, n. 1-2, p. 29 - 60, 2000.

NAEYER, A.; VANDEN BERGHE, W.; POCOCK, V.; MILLIGAN, S.; HAEGEMAN, G.; DE KEUKELEIRE, D. Estrogenic and anticarcinogenic properties of kurarinone, a lavandulyl flavanone from the roots of *Sophora flavescens*. **J Nat Prod**, v. 67, n. 11, p. 1829 – 1832, 2004.

NAMASIVAYAM, N. Chemoprevention in experimental animals. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1215, p. 60-71, 2011.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactérias de Crescimento Aeróbico; Norma Aprovada – 6 ed. NCCLS document M7-A6. v. 23, n 2 Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2003.

NEIGI, P. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S: Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. **Food Chem**, v. 80, p. 393 – 397, 2003.

NOGUEROL, T.N.;BORONAT, S.; CASADO, M.; RALDÚA, D.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. **Anal Bioanal Chem**, v. 385, n. 6, p. 1012-1019, 2006.

NOVICK, A.; SZILARD, L. Anti-mutagens. **Nature**, v. 170, p. 926-927, 1952.

OGAWA, T.; OHTA, K.; IJIMA, T.; SUZUKI, T.; OHTA, S.; ENDO, Y. Synthesis and biological evaluation of *p*-carborane bisphenols and their derivatives: structure-activity relationship for estrogenic activity. **Bioorg Med Chem**, v. 17, n. 3, p. 1109 – 1117, 2009.

OH, S. M.; CHUNG, K. H. Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. **Life Sci**, v. 74, n. 11, p. 1325 - 1335, 2004.

OH, S. M.; KIM, H. R.; CHUNG, K. H. *In vitro* estrogenic and antiestrogenic potential of chlorostyrenes. **Toxicol in vitro**, v. 23, n. 7, p. 1242 - 1248, 2009.

OTAKE, Y.; WALLE, T. Oxidation of the flavonoids galangin and kaempferide by human liver microsomes and CYP1A1, CYP1A2, and CYP2C9. **Drug Metab Dispos**, v. 30, n. 2, p. 103 - 105, 2002.

PATLAK, M. A testing deadline for endocrine disrupters. **Environ Sci Technol**, v. 30, p. 540A-544A, 1996.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, p. 2720 - 2722, 2002.

PASKOVATY, A.; PFLOMM, J. M.; MYKE, N.; SEO, S. K. A multidisciplinary approach to antimicrobial stewardship: evolution into the 21st century. **Int J Antimicrob Agents**, v. 25, n. 1, p. 1-10, 2005.

PASSOS, A. L.; PINTO, P. I.; POWER, D. M.; CANARIO, A. V. A yeast assay based on the gilthead sea bream (teleost fish) estrogen receptor beta for monitoring estrogen mimics. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 72, n. 5, p. 1529 – 1537, 2009.

PAYNE, J.; JONES, C.; LAKHANI, S.; KORTENKAMP, A. Improving the reproducibility of the MCF-7 cell proliferation assay for the detection of xenoestrogens. **Sci Total Environ**, v. 248, n. 1, p. 51-62, 2000.

PENGELLY, A. **The constituents of medicinal plants: an introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2004.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C.; MUÑOZ, J. D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **J Ethnopharmacol**, v. 77, p. 37 - 40, 2001.

PICADA, J. N.; MARIS, A. F.; CKLESS, K.; SALVADOR, M.; KHROMOV-BORISOV, N. N.; HENRIQUES, J. A. Differential mutagenic, antimutagenic and cytotoxic responses induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacteria and yeast. **Mutat Res**, v. 539, n. 1-2, p. 29 – 41, 2003.

PIERSEN, C. E. Phytoestrogens in botanical dietary supplements: implications for cancer. **Integ Cancer Ther**, v. 2, n. 2, p. 120 - 138, 2003.

- PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. **J Nat Prod**, v. 63, p. 1035 - 1042, 2000.
- PINTO, B.; BERTOLI, A.; NOCCIOLI, C.; GARRITANO, S.; REALI, D.; PISTELLI, L. Estradiol-antagonistic activity of phenolic compounds from leguminous plants. **Phytother Res**, v. 22, n. 3, p. 362-366, 2008.
- RAJAPAKSE, N.; SILVA, E.; SCHOLZE, M.; KORTENKAMP, A. Deviation from additivity with estrogenic mixtures containing 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol detected in the *E-screen* assay. **Environ Sci Technol**, v. 38, p. 6343 - 6352, 2004.
- RASMUSSEN, T. H.; NIELSEN, J. B. Critical parameters in the MCF-7 cell proliferation bioassay (*E-Screen*). **Biomarkers**, v. 7, p.322 - 336, 2002.
- 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. Canoas: Ed. ULBRA, Mutagênese Ambiental, 2003. p. 356.
- RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. Dietary components may prevent mutation-related diseases in humans. **Mutat Res**, v. 544, p. 195 - 201, 2003.
- RICE-EVANS, C. Flavonoid antioxidants. **Curr Med Chem**, v. 8, p. 797 – 807, 2001.
- RICE, S.; AMON, A.; WHITEHEAD, S. A. Ethanolic extracts of black cohosh (*Actaea racemosa*) inhibit growth and oestradiol synthesis from oestrone sulphate in breast cancer cells. **Maturitas**, v. 56, n. 4, p. 359 – 367, 2007.
- RIETJENS, I. M. C. M.; BOERSMA, M. G.; VAN DER WOUDE, H.; JEURISSEN, S. M. F.; SCHUTTE, M. E.; ALINK, G. M. Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. **Mutat Res**, v. 574, p. 124 - 138, 2005.
- ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Ann Rev Nutr**, v. 22, p. 19 – 34, 2002.

ROSS, J.; NELSON, G.; KLIGERMAN, A.; EREXSON, G.; BRYANT, M.; EARLEY, K.; GUPTA, R.; NESNOW, S. Formation and persistence of novel benzo(a)pyrene adducts in rat lung, liver, and peripheral blood lymphocyte DNA. **Cancer Res**, v. 50, p. 5088 - 5094, 1990.

ROY, D.; COLERANGLE, J. B.; SINGH, K. P. Is exposure to environmental or industrial endocrine disrupting estrogen-like chemicals able to cause genomic instability? **Front Biosci**, v. 6, n. 3, p. 913 – 921, 1998.

SALUM, L. B.; POLIKARPOV, I.; ANDRICOPULO, A. D. Structure-based approach for the study of estrogen receptor binding affinity and subtype selectivity. **J Chem Inf Mod**, v. 48, n. 11, p. 2243 - 2253, 2008.

SANTAMARTA, J. A ameaça dos disruptores endócrinos. **Agroecol Des Rur Sust**, v. 2, n. 3, 2001.

SANTOS, F. V.; COLUS, I. M. S.; SILVA, M. A.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Assessment of DNA damage induced by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. **Food Chem Toxicol**, v. 44, p. 1585-1589, 2006.

SCHILIRÒ, T.; GORRASI, I.; LONGO, A.; COLUCCIA, S.; GILLI, G. Endocrine disrupting activity in fruits and vegetables evaluated with the *E-screen* assay in relation to pesticide residues. **J Steroid Biochem Mol Biol**, 2011. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2011.03.002

SCHNEIDER, J. C.; GUARENTE, L. Vectors for expression of cloned genes in yeast: Regulation, overproduction, and underproduction. **Meth Enzymol**, v. 194, p. 373 – 388, 1991.

SCHWARZ, D.; KISSELEV, P.; CASCORBI, I.; SCHUNCK, W. H.; ROOTS, I. Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 453 - 459, 2001.

SEELINGER, G.; MERFORT, I.; SCHEMPP, C. M. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. **Planta Med**, v. 74, n. 14, p. 1667 - 1677, 2008.

SENGUPTA, B.; BANERJEE, A.; SENGUPTA, P. K. Investigations on the binding and antioxidant, properties of the plant flavonoid fisetin in model biomembranes. **FEBS Lett**, v. 540, p. 77 - 81, 2004.

SGHAIER, M. B.; BOUBAKER, J.; NEFFATI, A.; LIMEM, I.; SKANDRANI, I.; BHOURI, W.; BOUHLEL, I.; KILANI, S.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; GHEDIRA, K. Antimutagenic and antioxidant potentials of *Teucrium ramosissimum* essential oil. **Chem Biodivers**, v. 7, n. 7, p. 1754 – 1763, 2010.

SHEN, P.; GUO, B. L.; GONG, Y.; HONG, D. Y.; HONG, Y.; YONG, E. L. Taxonomic, genetic, chemical and estrogenic characteristics of *Epimedium* species. **Phytochem**, v. 68, n. 10, p. 1448-1458, 2007.

SILVA, I. D.; GASPAR, J.; GOMES DA COSTA, G.; RODRIGUES, A. S.; LAIRES, A.; RUEFF, J. Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutical agents. **Chemico-Biol Interact**, v. 124, p. 29-51, 2000.

SILVA, J.; HERRMANN, S. M.; HEUSER, V.; PERES, W.; POSSA MARRONI, N.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food Chem Toxicol**, v. 40, p. 941 - 947, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2007.

SNIJMAN, P. W.; SWANEVELDER, S.; ELIZABETH JOUBERT, E.; GREEN, I. R.; GELDERBLOM, W. C. A. The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): Some dose-response effects on mutagen activation-flavonoid interactions. **Mutat Res**, v. 631, p. 111–123, 2007.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric citotoxicity assay for anticancer rdrug screnning. **J Nat Cancer Inst**, v.82, p. 1107 - 1112, 1990.

SOTO, A. M.; LIN, T. M.; JUSTICIA, H.; SILVIA, R. M.; SONNENSCHNEIN, C. **An "in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics**. In: COLBORN, T.; CLEMENT, C. (Eds.) *Chemically induced alterations in sexual development: The wildlife/ human connection* Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing, 1992. p. 295-309.

SOTO, A. M.; MAFFINI, M. V.; SCHAEBERLE, C. M.; SONNENSCHNEIN, C. Strengths and weaknesses of *in vitro* assays for estrogenic and androgenic activity. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 20, n. 1, p. 15 – 33, 2006.

SOTO, A. M.; SONNENSCHNEIN, C.; CHUNG, K. L.; FERNANDEZ, M. F.; OLEA, N.; SERRANO, F. O. The *E-screen* assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. **Environ Health Perspect**, v. 103, n. 7, p. 113-122, 1995.

SOTO, A. M.; SONNENSCHNEIN, C. Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. **Nat Rev Endocrinol**, v. 6 , n. 7, p. 363 – 370, 2010.

SOULE, H. D.; VASQUEZ, J.; LONG, A.; ALBERT, S.; BRENNAN, M. J. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J Nut Cancer Inst**, v. 51, p. 1409- 1413, 1973.

SPENCER, J. P.E.; VAUZOUR, D.; RENDEIRO, C. Flavonoids and cognition: The molecular mechanisms underlying their behavioural effects. **Arch Biochem Bioph**, v. 492, p. 1–9, 2009.

STEELE, V. E.; KELLOFF, G. J. Development of cancer chemopreventive drugs based on mechanistic approaches. **Mutat Res**, v. 591, p. 16-23, 2005.

STOPPER, H.; SCHMITT, E.; KOBRAS, K. Genotoxicity of phytoestrogens. **Mutat Res**, v. 574, n. 1-2, p. 139 - 155, 2005.

TASHIRO, Y.; TAKAHIRA, K.; NAKANISHI, Y. Improved application of recombinant yeast assays on environmental samples by size exclusion chromatography. **J Environ Monit**, v. 6, n. 6, p. 546 - 551, 2004.

TAYLOR, L. P.; GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. **Curr Opin Plant Biol**, v. 8, p. 317 – 323, 2005.

THAM, D. M.; GARDNER, C. D.; HASKELL, W. L. Potencial health benefits of dietary phytoestrogens: A review of the clinical, epidemiological and mechanistic evidence. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 83, p. 2223 - 2235, 1998.

TOMASZ, M. Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). **Chem Biol**, v. 2, n. 9, p. 575 - 579, 1995.

TOYOKUNI, S.; SAGRIPANTI, J. L. Association between 8-hydroxy-29-deoxyguanosine formation and DNA strand breaks mediated by copper and iron. **Free Rad Biol Med**, v. 20, p. 859 – 864, 1996.

TRIAS, J.; GORDON, E. M. Innovative approaches to novel antibacterial drug discovery. **Curr Opin Biotechnol**, v. 8, p. 757-762, 1997.

UHL, M.; ECKER, S.; KASSIE, F.; LHOSTE, E.; CHAKRABORTY, A.; MOHN, G.; KNASMÜLLER, S. Effect of chrysin, a flavonoid compound, on the mutagenic activity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- b]pyridine (PhIP) and benzo(a)pyrene (B(a)P) in bacterial and human hepatoma (HepG2) cells. **Arch Toxicol**, v. 77, n. 8, p. 477 - 484, 2003.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biol Interact**, v. 160, p. 1 - 40, 2006.

VAN DER WOUDE, H.; ALINK, G. M.; VAN ROSSUM, B. E. J.; WALLE, K.; VAN STEEG, H.; WALLE, T.; RIETJENS, I. M. C. M. Formation of transient covalent protein and DNA adducts by quercetin in cells with and without oxidative enzyme activity. **Chem Res Toxicol**, v. 18, p. 1907 - 1916, 2005.

VAN DUURSEN, M. B.; SANDERSON, J. T.; DE JONG, P. C.; KRAAIJ, M.; VAN DEN BERG, M. Phytochemicals inhibit catechol-O-methyltransferase activity in cytosolic fractions from healthy human mammary tissues: implications for catechol estrogen-induced DNA damage. **Toxicol Sci**, v. 81, n. 2, p. 316 – 324, 2004.

VANPARYS, C.; DEPIEREUX, S.; NADZIALEK, S.; ROBBENS, J.; BLUST, R.; KESTEMONT, P.; DE COEN, W. Performance of the flow cytometric *E-screen* assay in screening estrogenicity of pure compounds and environmental samples. **Sci Total Environ**, v. 408, n. 20, p. 4451 - 4460, 2010.

VARGAS, V. M. F.; MOTA, V. E. P.; HENRIQUES, J. A. P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. **Mutat Res**, v. 319, p. 31 – 45, 1993.

VERES, Z.; TÖRÖK, G.; TÓTH, E.; VERECZKEY, L.; JEMNITZ, K. The spectrum of enzymes involved in activation of 2-aminoanthracene varies with the metabolic system applied. **Mutat Res**, v. 586, n. 1, p. 18-27, 2005.

VIEIRA, L. H. L.; SOARES JÚNIOR, J. M.; NUNES, M. G.; SIMÕES, R. S.; KAARI, C.; HAIDAR, M. A.; BARACAT, E. C. Efeitos da isoflavona e dos estrogênios conjugados equinos sobre a qualidade de vida na pós-menopausa. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 29, n. 5, p. 248-252, 2007.

VILLALOBOS, M.; OLEA, N.; BROTONS, J. A.; OLEA-SERRANO, M. F.; RUIZ DE ALMODOVAR, J. M.; PEDRAZA, V. The *E-screen* assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. **Environ Health Perspect**, v. 103, n. 9, p. 844 – 850, 1995.

VIRK-BAKER, M. K.; NAGY, T. R.; BARNES, S. Role of phytoestrogens in cancer therapy. **Planta Med**, v. 76, n. 11, p. 1132 – 1142, 2010.

XIA, Y.; CHENG, S.; HE, J.; LIU, X.; TANG, Y.; YUAN, H.; HE, L.; LU, T.; TU, B.; WANG, Y. Effects of subchronic exposure to benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) on learning and memory, and neurotransmitters in male Sprague-Dawley rat. **Neurotoxicol**, v. 32, p. 188 - 198, 2011.

WALLE, T.; TA, N.; KAWAMORI, T.; WEN, X.; TSUJI, P. A.; WALLE, U. K. Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids - methylated versus unmethylated flavones. **Biochem Pharmacol**, v.73, p.1288 - 1296, 2007.

WANDA, G. J.; NJAMEN, D.; YANKEP, E.; FOTSING, M. T.; FOMUM, Z. T.; WOBER, J.; STARCKE, S.; ZIERAU, O.; VOLLMER, G. Estrogenic properties of isoflavones derived from *Millettia griffoniana*. **Phytomed**, v. 13, n. 3, p. 139 – 145, 2006.

WANG, Y.; CHEN, S.; YU, O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 91 (4), p. 949-956, 2011.

WANG, J.; OGATA, M.; HIRAI, H.; KAWAGISHI, H. Detoxification of aflatoxin B1 by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. **FEMS Microbiol Lett**, v. 314, p. 164 - 169, 2011.

WARD, H. A.; KUHNLE, G. G. Phytoestrogen consumption and association with breast, prostate and colorectal cancer in EPIC Norfolk. **Arch Biochem Bioph**, v. 501, n. 1, p. 170 – 175, 2010.

WATANABE, C.; EGAMI, T.; MIDORIKAWA, K.; HIRAKU, Y.; OIKAWA, S.; KAWANISHI, S.; MURATA, M. DNA damage and estrogenic activity induced by the environmental pollutant 2-nitrotoluene and its metabolite. **Environ Health Prev Med**, v. 15, n. 5, p. 319 - 326, 2010.

WATERS, M. D.; STACK, H. F.; JACKSON, M. A.; BROCKMAN, H. E.; DE FLORA, S. Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. **Mutat Res**, v. 350, n. 1, p. 109 – 129, 1996.

WEI, H.; BOWEN, R.; CAI, Q. Antioxidant and promotional effects of soybean isoflavone genistein. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 208, p. 124 - 130, 1995.

WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Uña de Gato and Sangre de Gato. **Altern Med Rev**, v. 6, p. 567 - 579, 2001.

WISEMAN, L. R.; BALFOUR, J. A. Ciprofloxacin. A review of its pharmacological profile and therapeutic use in the elderly. **Drugs & Aging**, v. 4, n. 2, p. 145 – 173, 1994.

ZACHAREWSKI, T. Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of *in vivo* and *in vitro* assays. **Environ Health Perspect**, v. 106, n. 2, p. 577-582, 1998.

ZACHAREWSKI, T. *In vitro* bioassays for assessing estrogenic substances. **Environ Sci Technol**, v. 31, p. 613 – 623, 1997.

ZAHA, A. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996.

ZAHIN, M.; AQIL, F.; AHMAD, I. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. peel extracts. **Mutat Res**, v. 703, p. 99 - 107, 2010.

ZAND, R.S.; JENKINS, D.J.; DIAMANDIS, E.P. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. **Breast Cancer Res Treat**, v. 62, n. 1, p. 35 - 49, 2000.

ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: Faulty theory or fault tests? **Mutat Res**, v. 492, p. 29 - 38, 2001.

ZHU, M.; CHEN, Y.; LI, R. C. Oral absorption and bioavailability of tea catechins. **Planta Med**, v. 66, p. 444 - 447, 2000.

Referências eletrônicas:

Surto de infecção hospitalar causado por superbactéria mata 18 no DF (http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20101008/not_imp622176,0.php), 08 de outubro de 2010. Acesso dia: 14-04-2011.

TGR Biosciences: <http://www.tgrbio.com/cancer-cell-lines-primary-cell-cultures/cell-models-mcf7-cells.html>. Acesso dia: 28-09-2011.

Anexos

ANEXO I. Ensaios de mutagenicidade:

A. Soluções e meios de cultura:

- Caldo nutriente:

Meio Oxoid.....0,75g
Água destilada q.s.p.....30mL
Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- Top agar:

Agar.....1,2g
NaCl.....1,0g
água destilada q.s.p.....200mL
Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- Solução de Histidina/Biotina (0,5 mM):

Biotina.....0,00247g
Histidina.....0,00192g
Água destilada (45°C) q.s.p.....20mL
Autoclavar (121°C, 15 minutos).

Agar mínimo glicosado (AGM):

Agar.....7,5g
Água destilada.....465mL
Glicose 40%: 50mL/1L de meio (45 mL água destilada + 20g glicose); VB: 20 mL/1 L de meio.
Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- VB (Vogel Bonner E):

Sulfato de magnésio.....0,75g
Ácido cítrico.....7,5g
Fosfato de potássio dibásico.....37,5g
Fosfato de sódio e amônio.....13,13g
Água destilada (45°C).....50,25mL

Dissolver os reagentes (1-4) sequencialmente na água, mantendo a temperatura em 45°C (banho quente).

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- Tampão fosfato (0,2 M):

Solução estoque A:

2,84g (Na₂HPO₄).....100mL (água destilada)

Solução estoque B:

2,76g (NaH₂PO₄).....100mL água destilada)

Solução de uso: Misturar 30 mL da solução A e 7mL da solução B. Ajustar o pH (7,4).

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- Solução de MgCl (0,4 M):

MgCl₂.6H₂O.....8,13g

H₂O destilada.....100mL

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- Solução de KCl (1,65M):

KCl.....12,3g

H₂O.....100mL

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- Solução de glicose 6-fosfato (G-6-P) 1M:

G-6-P.....2,821g

H₂O destilada (estéril).....10 mL

- Solução NAPD (0.1 M):

NAPD.....0,7654g

H₂O destilada (estéril).....10mL

- Solução de tetraciclina:

HCl 0,02N

HCl fumegante (Merck).....14 µL

H₂O destilada (estéril).....10mL

0,008g tetraciclina em 1 mL HCl 0,02N

Filtrar a solução de HCl (Millipore) antes de acrescentar o antibiótico; trabalhar na capela.

B. Controles positivos utilizados no Teste de Ames:

- **Azida sódica:** 50 µL para TA 100

10 mL água destilada estéril.....0,00025g

- **4-nitro-*o*-fenilenodiamina:** 50 µL – TA98

5mL DMSO.....0,001g

- **Mitomicina C:** 50 µL – TA102

10 mL água destilada estéril.....0,0001g

- **2-aminoantraceno:** 50 µL – TA100, TA98, TA102 ensaios com S9

10 mL DMSO.....0,00025 g

- **Benzo[*a*]pireno:** 50 µL – TA98, ensaios com S9

10 mL DMSO.....0,0002g

- **Aflatoxina B₁:** 50 µL – TA100, ensaios com S9

10 mL DMSO.....0,0001g

- **2-aminofluoreno:** 50 µL – TA102, ensaios com S9

10 mL DMSO.....0,00025g

C. Solução de congelamento das linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas no Teste de Ames:

Cultura1 mL

DMSO.....0,2 mL

Estocar por 24 h à -20°C e passar para - 80 °C.

D. Cultura (estoque)

- 30mL de caldo nutriente;

- Linhagens (TA): 95 µL de ampicilina (8 mg/mL);

- Acrescentar o antibiótico após a esterilização dos meios.

E. Controle e testes das linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas no Teste de Ames:

E.1. SENSIBILIDADE AO CRISTAL VIOLETA:

Realizar o teste com apenas uma linhagem por placa;

Agar nutriente (CN + 1,5% agar);

Solução de cristal violeta 0,1% (0,01g/10 mL de água estéril);

Semear com Drigalski 0,1mL de suspensão bacteriana; utilizar 3 discos estéreis.

Utilizar a técnica de difusão em disco, como antibiograma, 10µL de solução/disco.

E.2. RESISTÊNCIA À AMPICILINA:

Em placa de AGM, usando alça de semeadura, fazer um “V” com o antibiótico e outro perpendicularmente, outro com a cultura (2 linhagens /placa).

E.3. REQUERIMENTO DE BIOTINA:

Esparramar 0,1mL da solução de biotina com drigalski, esperar secar e fazer estrias com a cultura (2 linhagens/ placa).

E.4. REQUERIMENTO DE HISTIDINA/BIOTINA:

- 2 linhagens por placa;

- AMG;

- BIOTINA (0,5 mM): 0,0012g – 100mL água destilada

- HISTIDINA (0,5%): 0,015g – 3 mL água destilada

Autoclavar as soluções de aminoácidos. Com o mesmo procedimento do teste E.4., nesse caso, colocando primeiro a biotina.

E.5. SENSIBILIDADE À LUZ ULTRAVIOLETA:

- 30 cm por 8 segundos;

Uma linhagem por placa (100 µl de cultura, com drigalski); Deixar as placas abertas.

ANEXO II – Meios e soluções utilizadas para o ensaio RYA.

- Meio YPD

Extrato levedura.....	10g
Peptona.....	20g
Água MiliQ.....	900 mL
Glicose 40%.....	50mL

- Ajustar o pH para 5,5 com HCl antes de completar o volume com água (1 L no final).
Autoclavar (121°C, 15 minutos).

Para **meio sólido** acrescentar ágar (20 g/L)

- Meio Mínimo (MM)

Yeast Nitrogen Base.....	1,7 g
Sulfato de Amônio (NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
Água MiliQ.....	1,0 L

Adicionar (soluções preparadas e autoclavadas separadamente):

Glicose 40%.....	50 mL
Metionina 10%.....	1 mL
Histidina 10%.....	1 mL

Ajustar o pH para 5,5 com HCl antes de completar o volume com água (1 L no final).
Autoclavar (121°C, 15 minutos).

Para **meio sólido** acrescentar ágar (20 g/L)

-Metionina 10%

Metionina.....	0,1g
Água MiliQ.....	1mL

-Histidina 10%:

Histidina.....	0,1g
Água MiliQ.....	1mL

-MuGal

Tampão Z.....	100 mL
Triton X – 100 10%.....	1 mL
SDS 10%.....	1 mL
Mercaptoetanol (Usar na capela).....	70 uL
MuGal.....	21 mg

-Triton X – 100 10% (líquido):

Triton X – 100.....	0,1 mL
Água MiliQ.....	0,9 mL

-SDS 10% (em pó):

SDS.....	100 mg
Água MiliQ.....	1 mL

-Tampão Z

Na ₂ PO ₄ – 60 mM.....	8,52 g
NaH ₂ PO ₄ – 40 mM.....	5,52 g
KCl – 10 mM.....	0,75 g
MgSO ₄ 7 H ₂ O – 1 mM.....	1 mL
Água MiliQ.....	completar para 1 L

Ajustar o pH para 7,0 (se precisar) com HCl antes de completar o volume de água.

Não precisa autoclavar,

-MgSO₄ 7 H₂O – 1 mM

MgSO ₄ 7 H ₂ O – 1 mM.....	12,32 g
Água MiliQ.....	50 mL

ANEXO III. Ensaio com cultivos celulares:

A. Soluções e meios de cultura:

- Meio DMEM:

DMEM (Sigma).....	10g
NaHCO ₃	1,2g
HEPES.....	2,38g
Suspensão de antibiótico e antimicótico (100x)...	10 mL
Água destilada.....	1000mL

O pH foi ajustado a pH a 7,2 a 7,4, com ácido clorídrico 1N (88,2% (v/v) ácido clorídrico em água destilada) ou hidróxido de sódio 1N (4% (m/v) hidróxido de sódio em água destilada).

O meio de cultura foi esterilizado em sistema de filtração à vácuo, com membrana de poros de 0,22 µm de diâmetro (Corning Incorporated, Acton MA, USA) e aliquotado para ser estocado sob congelamento (-20°C).

- PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

NaCl.....	8g
Na ₂ HPO ₄	11,1580g
KH ₂ PO ₄	6g
Água destilada.....	1000mL

O pH foi ajustado a 7,0.

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

- Solução de ácido tricloroacético 10%:

Ácido tricloroacético.....	100g
Água destilada.....	1000mL

Dissolver bem o ácido em água e armazenar a 4°C.

- Solução de sulforodamina-B 0,4% em ácido acético 1%:

Sulforodamina-B.....	0,4g
Ácido acético 1%.....	100mL

Dissolver bem e armazenar em temperatura ambiente.

- Tampão TRIS Base 10mM, pH 10:

TRIS Base.....1,21g
Água destilada.....1000mL

Dissolver bem, o pH foi ajustado a 10,5 e armazenar em temperatura ambiente.

- Solução NaOH 10N:

TRIS Base.....1,21g
Água destilada.....1000mL

Dissolver bem e armazenar em temperatura ambiente.

- 17- β - estradiol (1mM)

17- β - estradiol.....1 mg
Etanol absoluto P.A.....4 mL

ANEXO IV

Ensaio de atividade antimicrobiana:

A. Soluções e meios de cultura:

- Meio Mueller-Hinton (composição e preparo)

- Infusão de carne30%
- Caseína hidrolisada1,75%
- Amido0,15%
- agar1,7%

Esterelizar em autoclave por 15 minutos (121°C). Foram utilizadas placas de Petri plásticas, descartáveis e de fundo chato, atingindo uma espessura máxima de 4 mm de agar. O pH (entre 7,2-7,4) deve ser confirmado com eletrodo de pHmetro comum, devidamente calibrado, em contato com a superfície de uma pequena porção de meio solidificado e macerado. As placas devem ser resfriadas em temperatura ambiente e armazenadas sob refrigeração (4°C). Utilizar até 7 dias após cada preparação. Cada lote de placas deve ser submetida ao teste de esterilidade, que consiste em incubação a 30-35°C em uma média de 48h para comprovação da ausência de crescimento bacteriano ou fúngico.

Capítulo II

*"Nunca deixe que lhe digam que
não vale a pena acreditar nos sonhos que se têm
ou que os seus planos nunca vão dar certo
ou que você nunca vais ser alguém..."*

Renato Russo

“Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (Ames) test”

Flávia Aparecida Resende^a, Wagner Vilegas^b, and Eliana Aparecida Varanda^{a,*}

^aDepartment of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, São Paulo State University, CEP 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brazil

^bChemical Institute of Araraquara, São Paulo State University, c.p. 355, CEP 14800-900, Araraquara, São Paulo, Brazil

*Corresponding author at: Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, São Paulo State University, Rodovia Araraquara-Jaú, Km 1, 14801-902, Araraquara, São Paulo, Brazil.

Tel.: +55 16 33016951; fax: +55 16

E-mail address: varandae@fctar.unesp.br (E.A. Varanda)

ABSTRACT

The mutagenicity of ten flavonoids was assayed by the Ames test, in *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100 and TA102, carried out with and without metabolic activation, with the aim of tracing hydroxylation pattern-mutagenicity relationship profile, since the biological activity of flavonoids and their metabolites depends on their chemical structure and the relative orientation of various moieties in the molecule. The compounds assessed were: quercetin, kaempferol, luteolin, fisetin, chrysin, galangin, flavone, 3-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone and 7-hydroxyflavone. In the Ames assay, quercetin acted directly and its mutagenicity increased with metabolic activation. In the presence of S9 mix, kaempferol and galangin were mutagenic in the strain TA98. The absence of hydroxyl groups, as in flavone, eliminates the mutagenicity and, among monohydroxylated flavones (3- hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone and 7- hydroxyflavone), the presence of hydroxyl groups resulted in minor changes only. Finally, chrysin, which has only two hydroxy groups, at the 5-OH and 7-OH positions, also did not induce mutagenic activity in any of the bacterial strains used, in either activation condition. All the flavonoids were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and tested at concentrations extending into the toxic range, varying from 2.6 to 30.7 nM/ plate for galangin and 12.1 to 225.0 nM/ plate for other flavonoids. In light of the above, it is necessary to clarify the conditions and the mechanisms that mediate the biological effects of flavonoids before treating them as therapeutical agents, since some compounds can be biotransformed into more genotoxic products; as is the case for galangin, kaempferol and quercetin.

Keywords: mutagenicity; Ames test; flavonoids

1. Introduction

In recent years, there has been a growing academic and industrial interest in the health benefits of flavonoids (Chebil et al., 2007). Flavonoids are low-molecular-weight secondary metabolites of plants that, unlike primary metabolites, are not essential to their survival. Nevertheless, they are bioactive across kingdoms with over 9,000 structural variants known (Wang et al., 2011; Williams and Grayer, 2004). The diversity in size, three-dimensional shape and physical and biochemical properties of flavonoids allow them to interact with targets in a variety of subcellular locations, to influence biological activity in plants, animals, and microbes (Buer et al., 2010; Peer and Murphy, 2007; Taylor and Grotewold, 2005).

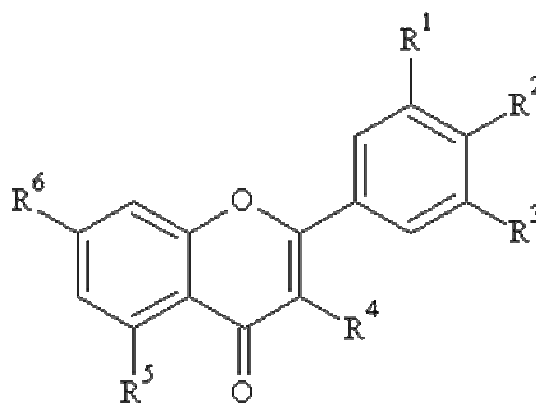
The basic molecular skeleton of flavonoid compounds (Fig. 1) consists of two fused aromatic carbon rings, constituting benzopyran rings (A and C), and a benzene ring (B). These compounds can be divided into various sub-groups based on the degree of oxidation of the C-ring, the hydroxylation pattern of the ring structure and the substituent at position 3 (Spencer et al., 2009). Basically, they are classified into seven groups: flavones, flavanones, flavonols, flavanonols, isoflavones, flavanols (catechins) and anthocyanidins (Ross and Kasum, 2002).

Flavonoids have anti-oxidant, anti-proliferative, antitumor, anti-inflammatory, and pro-apoptotic activities, and some molecular targets have been identified. The health-promoting effects of flavonoids may relate to interactions with key enzymes, signaling cascades involving cytokines and transcription factors, or antioxidant systems (Buer et al., 2010).

Carcinogenicity and mutagenicity are among the toxicological effects that cause the highest concern for human health; thus, they are the object of intense research activity, as well as of recognized regulatory testing methods (Benigni and Bossa, 2008). Generally, flavonoids

have been characterized as antioxidants capable of providing beneficial health effects. However, many flavonoids have also been reported to be mutagenic in diverse strains of *Salmonella typhimurium* in the Ames test as well as in several mammalian cell systems used to assess different toxic end points (Boersma et al., 2000). In the field of flavonoid mutagenicity research, reports of activity are widely conflicting, probably owing to varying characteristics of chemical structure on inter- and intra-assay variation (Cushnie and Lamb, 2005), and it seems that the activity is dependent either on the biotransformation of the compound or on the production of reactive oxygen species (Duarte Silva et al., 2000).

Thus, the objective of this study was to evaluate the mutagenic activity of the flavonoid compounds quercetin, kaempferol, luteolin, fisetin, galangin, chrysin, flavone, 3-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone, 7-hydroxyflavone (Fig. 1) and their mutagenicity, measured by the *Salmonella* microsome assay (Ames test), in the presence and in the absence of *in vitro* metabolizing systems and investigate hydroxylation pattern-mutagenicity relationship profile. The mutagenic activities of compounds were assayed in the *S. typhimurium* tester strains TA98 (detects frameshift mutations), TA100 (detects base-pair-substitution mutations) and TA102 (normally used to detect mutagens that cause oxidative damage and base-pair-substitution mutations).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Quercetin	OH	OH	-	OH	OH	OH
Kaempferol	OH	-	-	OH	OH	OH
Fisetin	OH	OH	-	OH	-	OH
Luteolin	OH	OH	-	-	OH	OH
Chrysin	-	-	-	-	OH	OH
Galangin	-	-	-	OH	OH	OH
Flavone	-	-	-	-	-	-
3-hydroxyflavone	-	-	-	OH	-	-
5-hydroxyflavone	-	-	-	-	OH	-
7-hydroxyflavone	-	-	-	-	-	OH

Figure 1 – Hydroxylation pattern of flavonoids

2. Material and methods

2.1. Chemicals and culture media

Quercetin, kaempferol, fisetin, luteolin, flavone, 3-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, chrysin, galangin, dimethyl sulfoxide (DMSO), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt (NADP), D-glucose-6-phosphate disodium salt, magnesium chloride, L-histidine monohydrate, D-biotin, sodium azide, 2-anthramine and 2-aminofluorene were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Oxoid Nutrient Broth No. 2 (Oxoid, England) and Difco Bacto Agar (Difco, USA) were used as bacterial media. D-Glucose, magnesium sulfate, citric acid monohydrate,

anhydrous dibasic potassium phosphate, sodium ammonium phosphate, monobasic sodium phosphate, dibasic sodium phosphate and sodium chloride were purchased from Merck (Whitehouse Station, NJ, USA).

2.2. Metabolic Activation System (S9 Mixture)

The S9 fraction, prepared from livers of Sprague–Dawley rats treated with the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 (500 mg/ kg), was purchased from Molecular Toxicology Inc. (USA). The metabolic activation system consisted of 4% of S9 fraction, 1% of 0.4 M MgCl₂, 1% of 1.65 M KCl, 0.5% of 1 M D-glucose-6-phosphate disodium and 4% of 0.1 M NADP, 50% of 0.2 M phosphate buffer and 39.5% sterile distilled water (Maron and Ames, 1983).

2.3. *Salmonella mutagenic assay*

Mutagenic activity was tested by the *Salmonella* microsome assay, using the *Salmonella typhimurium* tester strains TA98, TA100 and TA102, kindly provided by Dr. B.N. Ames (Berkeley, CA, USA), with and without metabolization by the pre-incubation method (Maron and Ames, 1983). The strains from frozen cultures were grown overnight for 12–14 h in Oxoid Nutrient Broth No. 2. The metabolic activation mixture (S9) was freshly prepared before each test. Five different doses of test compounds were assayed. All of them were diluted in DMSO. The concentrations were selected on the basis of a preliminary toxicity test. In all subsequent assays, the upper limit of the dose range tested was either the highest non-toxic dose or the lowest toxic dose determined in this preliminary assay. Toxicity was apparent either as a reduction in the number of His⁺ revertants, or as an alteration in the

auxotrophic background (i.e. background lawn). The concentrations varied from 2.6 to 30.7 nM/ plate for galangin and 12.1 to 225.0 nM/ plate for the other flavonoids. The various concentrations of compounds to be tested were added to 0.5 mL of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) or with 0.5 mL of 4% S9 mixture and 0.1 mL of bacterial culture and then incubated at 37 °C for 20–30 min. After this time, 2 mL of top agar was added to the mixture and poured on to a plate containing minimal agar. The plates were incubated at 37 °C for 48 h and the revertant colonies were counted manually. All experiments were analyzed in triplicate. The results were analyzed with the statistical software package Salanal (*U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, version 1.0, from Research Triangle Institute, RTP, North Carolina, USA*), adopting the Bernstein et al. (1982) model. The data (revertants/ plate) were assessed by analysis of variance (ANOVA), followed by linear regression. The mutagenic index (MI) was also calculated for each concentration tested, this being the average number of revertants per plate with the test compound divided by the average number of revertants per plate with the negative (solvent) control. A sample was considered mutagenic when a dose-response relationship was detected and a two-fold increase in the number of mutants ($MI \geq 2$) was observed with at least one concentration (Santos et al., 2006). The standard mutagens used as positive controls in experiments without S9 mix were 4-nitro-*o*-phenylenediamine (10 µg/ plate) for TA98, sodium azide (1.25 µg/ plate) for TA100 and mitomycin (0.5 µg/ plate) for TA102. 2-Anthramine (1.25 µg /plate) was used with TA98 and TA100 and 2-aminofluorene (1.25 µg/ plate) with TA102 in the experiments with metabolic activation. DMSO served as the negative (solvent) control (75 µL/ plate).

3. Results

Table 1 shows the mean number of revertants/plate (M), the standard deviation (SD) and the mutagenic index (MI) after the treatments with the various flavonoids, observed in *S. typhimurium* strain TA98, TA100 and TA102, in the presence (+S9) and absence (-S9) of metabolic activation.

In the absence of the external metabolizing system, S9 mix, quercetin is the only mutagenic flavonoid, with a mutagenic index higher than 2.0 at the concentration of 24.5 nM/plate in strain TA98. Its mutagenicity increases in the presence of metabolic activation, in a dose-dependent manner, in strain TA98, with a mutagenic index higher than 2.0 at 147.8 nM/plate. In the strain TA100, quercetin also induced an increase in the number of revertant colonies relative to the negative control in the absence of metabolic activation, with a mutagenic index of 2.0 at the concentration of 98.4 nM/plate, indicating the direct mutagenic activity also this strain. In the strain TA102, no mutagenicity was detected in the absence of metabolic activation but in its presence a mutagenic effect was observed, both the strain TA100 and TA102. In these strains, the largest mutagenic indexes found were 3.16 and 2.11, respectively. According to the strains involved, quercetin, induces substitution of base pairs (TA100, TA102), oxidative damage (TA102) and, at a much higher rate, frameshift mutations (TA98).

Kaempferol also shows a dose-dependent induction of revertants in the strain TA98, in the presence of S9 mix. Without metabolic activation, kaempferol does not induce any increase of revertants in this strain.

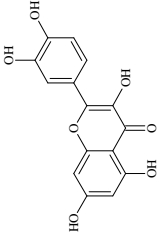
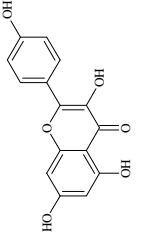
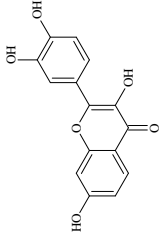
The strains were rather sensitive to the toxic effects of galangin, and it was thus necessary to decrease the doses. In fact, the lowest dose used in the experiments with the other flavonoids was close to the highest dose used with galangin. The test concentrations of

galangin varied from 2.6 to 30.7 nM/ plate and proved to be mutagenic only in the strain TA98, in the presence of S9 mix.

None of the other flavonoids (luteolin, fisetin, flavone, chrysin, 3-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone and 7-hydroxyflavone) were mutagenic, in the conditions used in this study.

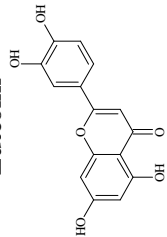
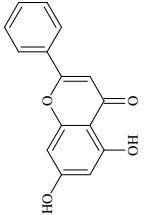
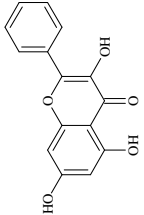
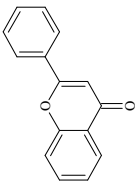
Table 1

Mutagenic activity expressed as the mean and standard deviation of the number of revertants/ plate and the mutagenic index (MI), in bacterial strains TA98, TA100 and TA102 treated with flavonoids (quercetin, kaempferol, fisetin, luteolin, flavone, 3-hydroxyflavone, 5- hydroxyflavone, 7- hydroxyflavone, chrysin, galangin), at various doses, with (+S9) or without (-S9) metabolic activation.

Treatments	Number of revertants/plate in <i>S. typhimurium</i> strains (M ± SD) and (MI)						
	TA 98		TA 100		TA 102		
Quercetin 	nM/plate	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
	0.0 ^a	53 ± 8	39 ± 1	115 ± 3.5	206 ± 5	273 ± 15	248 ± 3
	12.1	81 ± 0.6* (1.5)	136 ± 5** (3.5)	134 ± 8.5 (1.2)	320 ± 2* (1.5)	279 ± 8 (1.0)	305 ± 1 (1.2)
	24.5	115 ± 6** (2.2)	196 ± 4** (5.0)	178 ± 6.1 (1.5)	389 ± 4** (1.9)	302 ± 4 (1.1)	351 ± 13 (1.4)
	49.1	172 ± 1** (3.3)	393 ± 7** (10.0)	202 ± 3.2** (1.7)	492 ± 5** (2.4)	331 ± 6 (1.2)	446 ± 11** (1.8)
	98.4	135 ± 11** (2.6)	658 ± 10** (16.9)	227 ± 2.5** (2.0)	651 ± 4** (3.2)	324 ± 3 (1.2)	471 ± 1** (1.9)
	147.8	197 ± 4** (3.8)	794 ± 5** (20.4)	212 ± 5.0** (1.8)	642 ± 5** (3.1)	310 ± 6 (1.1)	524 ± 6** (2.1)
Ctrol +	1347 ± 51 ^b	1567 ± 47 ^c	1582 ± 102 ^c	1456 ± 67 ^e	1656 ± 89 ^d	1932 ± 93 ^f	
Kaempferol 	nM/plate	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
	0.0 ^a	58 ± 2	39 ± 1	106 ± 4	206 ± 53	235 ± 4	248 ± 3
	14.3	54 ± 5 (0.9)	141 ± 7** (3.6)	131 ± 1 (1.2)	286 ± 15 (1.4)	287 ± 4 (1.2)	336 ± 8 (1.3)
	29.0	56 ± 4 (1.0)	172 ± 3** (4.4)	146 ± 2 (1.4)	313 ± 5 (1.5)	258 ± 6 (1.1)	367 ± 7 (1.5)
	58.0	53 ± 1 (0.9)	199 ± 8** (5.1)	143 ± 4 (1.3)	369 ± 4** (1.8)	301 ± 9 (1.3)	430 ± 5** (1.7)
	116.4	58 ± 2 (1.0)	205 ± 3** (5.3)	130 ± 6 (1.2)	384 ± 12** (1.9)	305 ± 9 (1.3)	418 ± 8 (1.4)
	174.7	62 ± 3 (1.1)	177 ± 4** (4.5)	138 ± 3 (1.3)	400 ± 18** (1.9)	242 ± 9 (1.0)	473 ± 13** (1.9)
Ctrol +	1324 ± 61 ^b	1567 ± 47 ^c	1457 ± 53 ^c	1456 ± 67 ^e	1473 ± 119 ^d	1932 ± 93 ^f	
Fisetin 	nM/plate	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
	0.0 ^a	50 ± 4	32 ± 1	146 ± 1	190 ± 1	264 ± 3	291 ± 8
	14.3	50 ± 1 (1.0)	41 ± 1 (1.3)	157 ± 7 (1.1)	209 ± 7 (1.1)	341 ± 11 (1.3)	333 ± 8 (1.1)
	29.0	52 ± 3 (1.0)	44 ± 2 (1.4)	142 ± 1 (1.0)	233 ± 6 (1.2)	334 ± 2 (1.3)	346 ± 10 (1.2)
	58.0	57 ± 1 (1.1)	40 ± 1 (1.2)	175 ± 6 (1.2)	232 ± 2 (1.2)	372 ± 4 (1.4)	348 ± 11 (1.2)
	116.4	58 ± 2 (1.1)	40 ± 2 (1.3)	133 ± 3 (0.9)	224 ± 8 (1.2)	472 ± 16** (1.8)	364 ± 15 (1.2)
	174.7	60 ± 1 (1.2)	36 ± 1 (1.1)	131 ± 3 (0.9)	232 ± 4 (1.2)	339 ± 15 (1.3)	387 ± 7 (1.3)
Ctrol +	1425 ± 81 ^b	1634 ± 88 ^e	1325 ± 91 ^c	1721 ± 72 ^e	1689 ± 72 ^d	1789 ± 90 ^f	

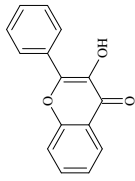
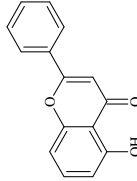
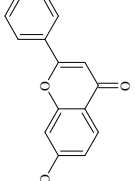
continued

continued

Luteolin		0.0^a	49 ± 3	39 ± 1	141 ± 2	206 ± 5	265 ± 2	248 ± 3
		14.3	37 ± 2 (0.8)	33 ± 2 (0.8)	117 ± 3 (0.8)	226 ± 8 (1.1)	288 ± 6 (1.1)	264 ± 2 (1.1)
		29.0	45 ± 5 (0.9)	38 ± 3 (1.0)	129 ± 3 (0.9)	249 ± 10 (1.2)	282 ± 1 (1.1)	310 ± 7 (1.2)
		58.0	40 ± 3 (0.8)	35 ± 2 (0.9)	107 ± 3 (0.8)	253 ± 11 (1.2)	299 ± 16 (1.1)	380 ± 4 (1.5)
		116.4	45 ± 4 (0.9)	31 ± 3 (0.8)	150 ± 8 (1.1)	188 ± 5 (0.9)	340 ± 6 (1.3)	387 ± 6* (1.6)
		174.7	48 ± 1 (1.0)	27 ± 1 (0.7)	148 ± 5 (1.0)	198 ± 13 (1.0)	288 ± 5 (1.1)	404 ± 3* (1.6)
Ctrol +			1376 ± 67 ^b	1567 ± 47 ^c	1276 ± 72 ^c	1456 ± 67 ^e	1767 ± 41 ^d	1932 ± 93 ^f
Chrysin		0.0^a	49 ± 3	39 ± 1	156 ± 3	206 ± 5	235 ± 2	248 ± 3
		16.1	34 ± 5 (0.7)	34 ± 3 (0.9)	154 ± 2 (1.0)	222 ± 10 (1.1)	253 ± 4 (1.1)	305 ± 3 (1.2)
		32.6	40 ± 2 (0.8)	38 ± 2 (1.0)	141 ± 3 (0.9)	268 ± 7 (1.3)	298 ± 8 (1.3)	259 ± 2 (1.0)
		65.3	37 ± 2 (0.7)	33 ± 1 (0.8)	144 ± 2 (0.9)	274 ± 10 (1.3)	265 ± 5 (1.1)	233 ± 10 (0.9)
		131.0	44 ± 1 (0.9)	35 ± 3 (0.9)	151 ± 4 (1.0)	278 ± 15 (1.3)	282 ± 2 (1.2)	232 ± 6 (0.9)
		196.7	49 ± 1 (1.0)	32 ± 2 (0.8)	124 ± 5 (0.8)	254 ± 3 (1.2)	230 ± 7 (1.0)	231 ± 14 (0.9)
Ctrol +			1376 ± 67 ^b	1567 ± 47 ^c	1579 ± 95 ^c	1456 ± 67 ^e	1377 ± 67 ^d	1932 ± 93 ^f
Galangin		0.0^a	22 ± 3	26 ± 1	208 ± 13	165 ± 1	144 ± 1	172 ± 5
		2.6	22 ± 2 (1.0)	34 ± 5 (1.3)	238 ± 2 (1.1)	209 ± 4 (1.3)	155 ± 4 (1.1)	144 ± 9 (0.8)
		5.1	23 ± 2 (1.0)	43 ± 2* (1.6)	235 ± 3 (1.1)	207 ± 4 (1.3)	150 ± 4 (1.0)	162 ± 3 (0.9)
		10.2	23 ± 2 (1.0)	55 ± 3** (2.1)	233 ± 9 (1.1)	196 ± 5 (1.2)	148 ± 7 (1.0)	158 ± 6 (0.9)
		20.5	25 ± 4 (1.1)	57 ± 3** (2.1)	209 ± 9 (1.0)	177 ± 7 (1.1)	143 ± 1 (1.0)	151 ± 3 (0.9)
		30.7	26 ± 2 (1.2)	58 ± 3** (2.2)	199 ± 7 (1.0)	161 ± 9 (1.0)	127 ± 2 (0.9)	112 ± 7 (0.6)
Ctrol +			1329 ± 66 ^b	1422 ± 81 ^e	1498 ± 45 ^c	1667 ± 39 ^e	1733 ± 77 ^d	1980 ± 91 ^f
Flavone		0.0^a	35 ± 2	32 ± 1	173 ± 5	190 ± 1	313 ± 6	291 ± 8
		18.4	36 ± 2 (1.0)	38 ± 2 (1.2)	182 ± 2 (1.0)	221 ± 1 (1.2)	282 ± 3 (0.9)	350 ± 4 (1.2)
		37.3	34 ± 3 (1.0)	37 ± 2 (1.2)	174 ± 2 (1.0)	196 ± 4 (1.0)	251 ± 4 (0.8)	369 ± 7 (1.3)
		74.7	38 ± 1 (1.1)	36 ± 1 (1.1)	179 ± 1 (1.0)	208 ± 2 (1.1)	212 ± 7 (0.7)	414 ± 3 (1.4)
		149.8	35 ± 3 (1.0)	31 ± 2 (1.0)	144 ± 5 (0.8)	205 ± 4 (1.1)	136 ± 2 (0.4)	470 ± 8* (1.6)
		225.0	46 ± 2 (1.3)	23 ± 2 (0.7)	106 ± 4 (0.6)	207 ± 5 (1.1)	109 ± 3 (0.3)	525 ± 6** (1.8)
Ctrol +			1217 ± 72 ^b	1634 ± 88 ^c	1219 ± 65 ^c	1721 ± 72 ^e	1617 ± 60 ^d	1789 ± 90 ^f

continued

continued

3- hydroxyflavone		0.0^a	50 ± 2	32 ± 1	194 ± 8	190 ± 1	235 ± 13	291 ± 8
		17.2	50 ± 4 (1.0)	39 ± 3 (1.2)	196 ± 6 (1.0)	235 ± 3 (1.2)	216 ± 11 (0.9)	308 ± 5 (1.1)
		34.8	43 ± 6 (0.8)	36 ± 3 (1.1)	207 ± 5 (1.1)	196 ± 2 (1.0)	207 ± 19 (0.8)	308 ± 7 (1.1)
		69.7	38 ± 7 (0.8)	34 ± 2 (1.1)	192 ± 5 (1.0)	192 ± 8 (1.0)	214 ± 8 (0.9)	334 ± 4 (1.1)
		139.8	48 ± 10 (0.9)	34 ± 2 (1.1)	217 ± 2 (1.1)	204 ± 6 (1.1)	212 ± 10 (0.9)	348 ± 3 (1.2)
		209.9	53 ± 1 (1.0)	27 ± 3 (0.8)	196 ± 5 (1.0)	212 ± 12 (1.1)	222 ± 16 (0.9)	348 ± 7 (1.2)
		Ctrol +	1337 ± 92 ^b	1634 ± 88 ^c	1523 ± 85 ^c	1721 ± 72 ^e	1384 ± 82 ^d	1789 ± 90 ^f
5- hydroxyflavone		0.0^a	32 ± 1	32 ± 1	177 ± 2	190 ± 1	306 ± 8	291 ± 8
		17.2	32 ± 2 (1.0)	26 ± 1 (0.8)	166 ± 3 (0.9)	202 ± 10 (1.1)	290 ± 7 (0.9)	353 ± 4 (1.2)
		34.8	36 ± 2 (1.1)	28 ± 2 (0.9)	156 ± 3 (0.9)	208 ± 17 (1.1)	303 ± 5 (1.0)	361 ± 8 (1.2)
		69.7	30 ± 2 (0.9)	29 ± 3 (0.9)	185 ± 3 (1.0)	203 ± 6 (1.1)	296 ± 4 (1.0)	391 ± 8 (1.3)
		139.8	44 ± 2 (1.4)	31 ± 1 (1.0)	166 ± 3 (0.9)	206 ± 1 (1.1)	285 ± 4 (0.9)	405 ± 10 (1.4)
		209.9	34 ± 2 (1.1)	31 ± 4 (1.0)	142 ± 4 (0.8)	193 ± 8 (1.0)	265 ± 6 (0.9)	438 ± 6 (1.5)
		Ctrol +	1237 ± 61 ^b	1634 ± 88 ^c	1211 ± 72 ^c	1721 ± 72 ^e	1877 ± 52 ^d	1789 ± 90 ^f
7- hydroxyflavone		0.0^a	50 ± 2	32 ± 1	136 ± 8	190 ± 1	229 ± 7	291 ± 8
		17.2	57 ± 4 (1.1)	30 ± 4 (0.9)	124 ± 3 (0.9)	211 ± 5 (1.1)	246 ± 25 (1.1)	344 ± 6 (1.2)
		34.8	56 ± 3 (1.1)	35 ± 3 (1.1)	121 ± 5 (0.9)	190 ± 9 (1.0)	270 ± 22 (1.2)	344 ± 5 (1.2)
		69.7	55 ± 8 (1.1)	36 ± 1 (1.1)	145 ± 6 (1.1)	205 ± 4 (1.1)	249 ± 13 (1.1)	345 ± 4 (1.2)
		139.8	65 ± 2 (1.3)	36 ± 1 (1.1)	143 ± 4 (1.0)	197 ± 8 (1.0)	246 ± 16 (1.1)	351 ± 13 (1.2)
		209.9	54 ± 4 (1.1)	39 ± 3 (1.2)	132 ± 18 (1.0)	177 ± 2 (0.9)	244 ± 16 (1.1)	369 ± 2 (1.3)
		Ctrol +	1337 ± 92 ^b	1634 ± 88 ^c	1398 ± 51 ^c	1721 ± 72 ^e	1277 ± 57 ^d	1789 ± 90 ^f

*P < 0.05 (ANOVA); **P < 0.01 (ANOVA), M ± SD = mean and standard deviation; ^aNegative Control: dimethyl sulfoxide (DMSO - 75 µL/plate); Positive Control (Ctrl +): ^b4-nitro-*o*-phenylenediamine (10.0 µg/plate - TA98); ^csodium azide (1.25 µg/plate - TA100); ^dmitomycin (0.5 µg/plate - TA102), in the absence of S9, and ^e2-anthramine (1.25 µg/plate - TA98, TA100); ^f2-aminofluorene (10.0 µg/plate - TA102), in the presence of S9.

4. Discussion

This work is based on the need to clarify the causes of the mutagenicity of 10 flavonoids, some of which have beneficial properties as antioxidants and anti-inflammatory activities and prevent cancer. Ames test was used which has been extensively employed as a screening tool to establish an initial estimate of mutagenicity and carcinogenicity (Mazzatorta et al., 2007).

Flavonoids are known to exhibit a variety of effects in different biological systems. They modulate the activities of enzymes involved in the biotransformation of precarcinogens, altering their biological activity, while under certain conditions flavonoids may exhibit genotoxic activity by yielding reactive intermediates, such as free radicals. It is therefore of importance that, depending on the assay performed, either *in vivo* or *in vitro*, a flavonoid may exhibit different properties in targets cells, depending on the concentration and its metabolic fate (Snijman et al., 2007).

Early studies of flavonoids first documented the mutagenicity of quercetin and its capacity to cause base-pair substitutions and frameshift mutations in the Ames test (Macgregor, 1986), as well as to induce chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in CHO cells (Skibola and Smith, 2000), but conflicting results were obtained in the micronucleus test *in vivo* (Das et al., 1994; Macgregor, 1986; Sahu et al., 1981).

The results obtained in this study indicate that there is a structure–activity relationship considering the pattern of hydroxyls presents in the molecule and depending on the tester strain.

According to Rietjens et al. (2005), the structural features essential to mutagenic activity are a flavonoid ring structure with a free hydroxyl group at position 3, a double bond linking positions 2 and 3, and a keto-group at position 4, allowing the proton of the hydroxyl

group at 3 to tautomerise to a 3-keto moiety. These structural features are exhibited by the molecule of quercetin, kaempferol, galangin, fisetin and 3-hydroxyflavone.

However, according to results obtained in this study, the hydroxylation pattern of quercetin was also important for mutagenicity observed. Quercetin, which has two hydroxyl groups in the *ortho* position to each other on the B ring and free hydroxyl groups at position 3, 5 and 7 is directly mutagenic and its mutagenicity increases in the presence of metabolic activation (Duarte Silva et al., 2000). In this study, quercetin showed greatest mutagenic activity in the *Salmonella* strain TA98, with mutagenic indices of 3.76 and 20.37, with and without S9 mix, respectively, at the highest concentration. In the *Salmonella* strains TA100 and TA 102, the mutagenic indices were 2.0 in the absence of metabolic activation in the TA100 and 3.12 and 2.11, respectively, after metabolization. The elimination or modification of either of these hydroxyl groups significantly reduced the mutagenicity, as observed in the results with kaempferol and galangin.

The structural difference between kaempferol and quercetin is only the lack of the hydroxyl group at position 3' (Hou and Kumamoto, 2010) and galangin is a flavonol that does not have any hydroxyl group on the B ring. In this study, kaempferol and galangin showed mutagenic activity in the *Salmonella* strain TA98 only after metabolic activation, with mutagenic index of 4.54 and 2.20, respectively, indicating that the number and position of hydroxyl groups on the B ring seem to have a specific influence on the genotoxicity of the compounds (Duarte Silva et al., 2000).

Galangin is a possible substrate of cytochrome P450 which, by hydroxylating the B ring, can metabolise it to kaempferol or even quercetin. This hypothesis has been raised by Brown and Dietrich in 1979. Duarte Silva et al. (1997) investigated if cytochrome P450 monooxygenase system is involved in the metabolism of galangin and consequently in its

mutagenicity, and found that galangin really requires metabolic activation by cytochrome P450, in order to be mutagenic.

Kaempferol which has only one hydroxyl group on the B-ring exhibited a similar response to galangin. The mutagenicity of kaempferol in these cells also depends on its activation via the cytochrome P450 monooxygenase system (Duarte Silva et al., 1997). The metabolization of kaempferol by the S9 mix gives rise to quercetin, increasing its genotoxicity (Duarte Silva et al., 2000).

The structural formula of quercetin contains all the structural elements required for both antioxidant and pro-oxidant activity (Rietjens et al., 2005) and these forms of quercetin may provide an insight into its apparent *in vitro* mutagenicity (Harwood et al., 2007; van der Woude et al., 2005) or antimutagenicity.

The pro-oxidant activity of quercetin may deplete the nuclear antioxidant defenses and lead to oxidative DNA damage, which may be responsible for its mutagenicity (Silva et al., 2002). A variety of genotoxicity assays have been conducted, because of the prevalence of quercetin in the diet and its potential clinical and food applications. Moreover, there is an ongoing attempt to reconcile the differences between *in vitro* results demonstrating quercetin-related mutagenic activity and the apparent absence of carcinogenicity *in vivo* (Harwood et al., 2007).

The mechanism suggested involves metabolic activation, leading to the formation of catechol metabolites and subsequent oxidation to *o*-quinone and in some cases *p*-quinone methide metabolites. Quercetin already possesses a catechol group in the B-ring, which, due to its oxidant properties, provides a basis for the pro-oxidative toxic effects of this flavonoid (van der Woude et al., 2005). These quinone methides are said to be alkylating DNA-reactive intermediates. An essential part of this hypothesis is that for mutagenic activity, the B-ring has to be oxidized to a quinoid intermediate and the proton of the hydroxyl group on C3 needs

to rearrange to give a 3- keto isomer, which requires a double bond in the 2,3- position (Duarte Silva et al., 2000; Rietjens et al., 2005).

This explains why the absence of the hydroxyl on C3 eliminates the mutagenicity in the tested strains, as observed in the results with luteolin.

However, in spite of the observation that the position of the 3-hydroxyl on the C ring is clearly important as indicated by the activity of galangin in the *Salmonella* strain TA98 after metabolic activation, the same effect was not observed for fisetin.

Comparison of the mutagenicity of quercetin with that of fisetin also illustrates the potentiating effect of a hydroxyl group on C5. This effect occurs because this hydroxyl forms a strong hydrogen bond with the 4-keto group, thereby preventing and/ or weakening the hydrogen bonding of the 3-hydroxyl with the 4-keto group. This weakening of the 3-hydroxyl 4-keto hydrogen bond increases the likelihood of tautomerisation of the 3-hydroxyl group to give the quinone methides. Thus, the absence of the 5-hydroxyl (fisetin) also eliminates mutagenicity (Rietjens et al., 2005). But the presence of 5-hydroxy on the A ring is not also mutagenicity warranty, as observed in the results with 5-hydroxyflavone, that lacks mutagenicity, probably due the absence of other structural elements, as for instance 3-hydroxyl on the C ring.

The total absent of hydroxyl groups, as in flavone, no induced mutagenicity. The presence of hydroxyl groups on the A ring, carbonyl and C2-C3 double bond on the C-ring seems not to be a determinant when considering the different flavone structures. Among monohydroxylated flavones (3- hydroxyflavone, 5- hydroxyflavone and 7- hydroxyflavone), the presence of hydroxyl groups results in only minor changes (Edenharder et al., 1997). Hydroxyl groups at carbons 3, 5 and 7 did not generate mutagenic compounds.

Finally, with chrysin, the two hydroxyl groups at positions 5 and 7 were not reactive with 4-keto group. Moreover the lack of the C-3 hydroxyl group and the 3',4' dihydroxy (or

prenyl) on the B-ring of this flavonoid also can be the reason for the absent mutagenic activity.

Given the above results and hypotheses, it is still necessary to clarify the mechanisms and the conditions that mediate the biological effects of flavonoids, before considering them as therapeutic agents. It is true that flavonoids may inhibit the bioactivation of precarcinogens by repressing several biotransformation enzymes or by blocking membrane receptors involved in the cellular uptake of precarcinogens. However, these compounds may themselves be biotransformed into more genotoxic products, as is the case for galangin, kaempferol and quercetin.

Conflict of interest

No competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)” and “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)”, Brazilian state and federal agencies.

References

Benigni, R., and Bossa, C., 2008. Structure alerts for carcinogenicity, and the *Salmonella* assay system: A novel insight through the chemical relational databases technology. *Mutat. Res.* 659, 248–261.

Bernstein, L., Kaldor, J., Mccann, J., Pike, M.C., 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.* 97, 267–281.

Boersma, M.G., Vervoort, J., Szymusiak, H., Lemanska, K., Tyrakowska, B., Cenas, N., Segura-Aguilar, J., Rietjens, I.M.C.M., 2000. Regioselectivity and reversibility of the glutathione conjugation of quercetin quinone methide. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 185-191.

Brown, J.P., Dietrich, P.S., 1979. Mutagenicity of plant flavonoids in the *Salmonella*/mammalian microsome test. Activation of flavonol glycosides by mixed glycosides from rat fecal bacteria and other sources. *Mutat. Res.* 66, 223–240.

Buer, C.S., Imin, N., Djordjevic, M.A., 2010. Flavonoids: new roles for old molecules. *J. Integr. Plant Biol.* 52, 98–111.

Chebil, L., Anthoni, J., Humeau, C., Gerardin, C., Engasser, J.M., Ghoul, M., 2007. Enzymatic acylation of flavonoids: Effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9496 - 9502.

Cushnie, T.P., Lamb, A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26, 343–356.

Das, A., Wang, J.H., Lien, E.J., 1994. Carcinogenicity, mutagenicity and cancer preventing activities of flavonoids: a structure-system activity relationship (SSAR) analysis. *Progress in Drug Res.* 42, 133–167.

Duarte Silva, I., Gaspar, J., Gomes da Costa, G., Rodrigues, A.S., Laires, A., Rueff, J., 2000. Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutical agents. *Chem. Biol. Interact.* 124, 29–51.

Duarte Silva, I., Rodrigues, A.S., Gaspar, J., Laires, A., Rueff, J., 1997. Metabolism of galangin by rat cytochromes P450: relevance to the genotoxicity of galangin. *Mutat. Res.* 393, 247–257.

Edenharder, R., Rauscher, R., Platt, K.L., 1997. The inhibition by flavonoids of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline metabolic activation to a mutagen: a structure–activity relationship study. *Mutat. Res.* 379, 21–32.

Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J.F., Flamm, G.W., Williams, G.M., Lines, T.C., 2007. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/ carcinogenic properties. *Food Chem. Toxicol.* 45, 2179–2205.

Hou, D.X., Kumamoto, T., 2010. Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: direct binding and molecular modeling. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 691–719.

Macgregor, J.T., 1986. Mutagenic and carcinogenic effects of flavonoids. In: Cody, V., Middlenton, E., Harbone, J.B. (Eds.), *Plant Flavonoids in Biology and Medicine. Biochemical Pharmacological and Structure–Activity Relationships*. Alan R. Liss, New York, pp. 411–424.

Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173-215.

Mazzatorta, P., Tran, L.A., Schilter, B., Grigorov, M., 2007. Integration of structure-activity relationship and artificial intelligence systems to improve in silico prediction of Ames test mutagenicity. *J. Chem Inf. Model.* 47, 34-38.

Peer, W.A., Murphy, A.S., 2007. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Sci.* 12, 556–563.

Rietjens, I.M.C.M., Boersma, M.G., van der Woude, H., Jeurissen, S.M.F., Schutte, M.E., Alink, G.M., 2005. Flavonoids and alkenylbenzenes: Mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutat. Res.* 574, 124–138.

Ross, J.A., Kasum, C.M., 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 19–34.

Sahu, R.K., Basu, R., Sharma, A. 1981. Genetic toxicological testing of some plant flavonoids by the micronucleus test. *Mutat. Res.* 89, 69–74.

Santos, F.V., Colus, I.M.S., Silva, M.A., Vilegas, W., Varanda, E.A., 2006. Assessment of DNA damage induced by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1585–1589.

Silva, J., Herrmann, S.M., Heuser, V., Peres, W., Possa Marroni, N., González-Gallego, J., Erdtmann, B., 2002. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.* 40, 941–947.

Skibola, C.F., Smith, M.T., 2000. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 375–383.

Snijman, P.W., Swanevelder, S., Elizabeth Joubert, E., Green, I.R., Gelderblom, W.C. A., 2007. The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): Some dose-response effects on mutagen activation-flavonoid interactions. *Mutat. Res.* 631, 111–123.

Spencer, J.P.E., Vauzour, D., Rendeiro, C., 2009. Flavonoids and cognition: The molecular mechanisms underlying their behavioural effects. *Arch. Biochem. Biophys.* 492, 1-9.

Taylor, L.P., Grotewold, E., 2005. Flavonoids as developmental regulators. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 317–323.

van der Woude, H., Alink, G.M., van Rossum, B.E.J., Walle, K., van Steeg, H., Walle, T., Rietjens, I.M.C.M., 2005. Formation of transient covalent protein and DNA adducts by

quercetin in cells with and without oxidative enzyme activity. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1907-1916.

Wang, Y.; Chen, S.; Yu, O., 2011. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91 (4), 949-956.

Williams, C.A., Grayer, R.J., 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* 21, 539-573.