

“Estudo do potencial genotóxico da Gutiferona A em diferentes células de camundogos *in vivo*.”

PETERSON MENEZES TERRAZAS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas: estrutura e função.

Orientador: *Prof. Dr. Edson Luis Maistro*



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

“Estudo do potencial genotóxico da Gutiferona A em diferentes células de camundogos *in vivo*.”

PETERSON MENEZES TERRAZAS

EDSON LUIS MAISTRO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas: estrutura e função.

Prof. Dr. Edson Luis Maistro

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Terrazas, Peterson Menezes.

Estudo do potencial genotóxico da Gutiferona A em diferentes células de camundogos in vivo / Peterson Menezes Terrazas. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Edson Luis Maistro

Capes: 20206003

1. Plantas medicinais - Uso terapêutico. 2. Toxicologia genética. 3. Ensaio cometa. 4. Mutagênese.

Palavras-chave: Ensaio cometa; Gutiferona A; Mutagênese; Plantas medicinais; Teste do micronúcleo.

Dedico este trabalho...
...Aos meus amados pais, irmãos, avó e esposa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, saúde, a vida, simplesmente por tudo.

Aos meus pais, José Enrique e Marilene, pelo amor, dedicação e principalmente pela paciência, vocês são meu melhor exemplo em tudo.

Aos meus irmãos, Patrícia (Paty) e Thiago (Thi), que sempre me apoiaram, com conversas, brigas e gestos, sei que sempre estiveram ao meu lado e sempre estarão.

À minha linda avó, “Nêna”, sempre, mas sempre mesmo, em minha defesa.

À minha amada esposa Areadny, pelo amor, carinho, companheirismo, dedicação, paciência, broncas, sobrancelhas elevadas e seus “Hams”, o que seria de mim sem você? Amo você minha “Amorinha”.

Aos meus tios, “Manôlo” e Fernanda, pela confiança, desde o primeiro dia em Botucatu, companhia, hospedagem e claro, ótimas refeições.

Aos meus amigos Martins e Danilo, no mínimo pelas risadas, mas também pelo companheirismo. Valeu seus doídos.

Ao meu orientador, professor e grande pessoa, Prof. Dr. Edson Luís Maistro, por abrir as portas do laboratório, pela orientação, paciência,

amizade e respeito. Obrigado por transmitir e compartilhar, não apenas seus conhecimentos e experiências profissionais, mas também os de vida.

Aos meus grandes parceiros e colegas de laboratório, Álvaro, Eduardo, Rafael e Larissa, pela amizade, risadas, viagens e “força”, muito obrigado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, pela oportunidade, atenção e comprometimento.

A todos da Seção de Pós-Graduação, Davi, Lu(s) e Herivaldo, por todos os atendimentos, sempre atenciosos e comprometidos.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Aos professores Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, Dr. Pedro de Magalhães Padilha e Dra Cláudia Aparecida Rainho, por participarem de minha banca de qualificação.

E por fim, a todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigado.

*“Impossível é apenas uma grande palavra usada por gente fraca que
prefere viver no mundo como está em vez de usar o poder que tem para mudá-
lo. Impossível não é um fato, é uma opinião. Impossível não é uma declaração, é
um desafio. Impossível é hipotético. Impossível é temporário”.*
Muhammad Ali

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Quadro 1. Fontes de exposição humana a agentes mutagênicos.....	16
Figura 1. Classes de cometas observadas.....	19
Figura 2. Eritrócito policromático com presença de micronúcleo (EPM).....	21
Figura 3. Célula binucleada com presença de micronúcleo cromatídico.....	22
Figura 4. Cultura de células com citocalasina B.....	22
Figura 5. Diferentes partes da <i>Garcinia achachairu</i> – A = partes aéreas; B e C = folhas e frutos; D = sementes; E = flores; F = fruto <i>achachairu</i>	24
Figura 6. Estrutura química da Gutiferona A isolada das sementes da <i>G. achachairu</i>	25
Quadro 2. Gutiferonas: espécies e estruturas de origem.....	26

ARTIGO

Figure 1. Molecular structure of guttiferone A isolated from <i>G. achachairu</i>	61
Table 1. DNA migration in the comet assay for assessing the genotoxicity of Guttiferone A (GA) in different cells of male Swiss mice <i>in vivo</i> . (Mean \pm SD).....	62
Table 2. Number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) observed in the bone marrow cells of male Swiss mice (M ₁₋₆) treated with Guttiferone A (GA), and respective controls. Two thousand cells were analyzed. SD = standard deviation from the mean.....	63

ANEXOS

Anexo 1. Parecer do comitê de ética experimental da Faculdade de Medicina de Marília, SP.....	64
Anexo 2. Carta de submissão do artigo: Benzophenone guttiferone A from <i>Garcinia achachairu</i> Rusby (Clusiaceae) presents genotoxic effects in different cells of mice	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – Grau celsius

µg/mL – Micrograma por mililitro

µL – Microlitro

ABTS – Sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)

A2780 – Células do câncer do ovário

ATP – Adenosina trifosfato

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEP/FAMEMA – Comitê de Ética em Pesquisa/Faculdade de Medicina de Marília

CHCl₃ – Clorofórmio

cm – Centímetro

CTB – Citocalasina B

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucléico)

DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

DXR – Doxorrubicina

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ECVAM – Laboratório de Referência da União Européia de Alternativas aos Testes em Animais

EM – Ensaio cometa

EROS – Espécies reativas do oxigênio

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

g – Grama

GA – Gutiferona A

GAC – *Garcinia achachairu*

HCl – Ácido clorídrico

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HCT 116 – Células de câncer do cólon

HeLa C3 – Câncer do colo do útero

HepG2 – Células do câncer hepático

HT – Células de câncer do cólon

KB – Células de carcinoma epidermóide oral humano

Kg – Quilograma

L 5125 – Sodium salt *N*-lauroyl sarcosinate

LMP – Low melting point agarose

LXRR-SPA – Ensaio de proximidade de cintilação do receptor X do fígado

M – Molar

MAPKAPK2 – Proteína quinase

MeOH – Metanol

mg/kg – Miligrama/quilograma

min - Minuto

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM - Milimolar

MN – Micronúcleo

MNPCE – Eritrócitos policromáticos micronucleados

MRC 5 – Linhagem de células do pulmão

MTT – Methyl tetrazolium assay

N – Normal

NaCl – Cloreto de sódio

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NaOH – Hidróxido de sódio

NCE - Eritrócitos normocromáticos

nm - Nanômetro

NMP – Normal melting point agarose

NMR – Nuclear magnetic resonance

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PC12 – Linhagem da medula supra-renal de rato

PCE – Eritrócitos policromáticos

pH – Potencial hidrogeniônico

SC –Santa Catarina

SCGE – *Single Cell Gel Electrophoresis*

SW 480 – Câncer do cólon humano

TLC – *Thin Layer Chromatography*

TM – Teste do micronúcleo

Tris – Trisaminometano

Tris-HCl – Tris hidrocloreto

RESUMO

Garcinia achachairu (GAC) é uma planta de origem boliviana que vem sendo utilizada na medicina popular para o tratamento de distúrbios gástricos, reumatismo, inflamações e como cicatrizante. A caracterização fitoquímica do extrato desta planta revelou que, uma benzofenona, a Gutiferona A (GA), é um dos seus compostos majoritários, que segundo estudos recentes, apresenta importante atividade antioxidante e antimicrobiana. Considerando o interesse em se aprofundar as análises do potencial farmacológico da GA e a inexistência de estudos que avaliem a sua toxicidade genética, o presente estudo foi elaborado visando investigar o potencial genotóxico e mutagênico da GA em diferentes células de camundongos *in vivo*, utilizando alguns dos testes tradicionais na área de mutagênese, como o Ensaio Cometa (EC) para a verificação da genotoxicidade e o Teste do Micronúcleo (TM) para a verificação da mutagenicidade. O experimento foi conduzido com camundongos Suíços albinos machos (*Mus musculus*) de 12 semanas, divididos em cinco grupos, constituídos cada um por seis animais. O grupo controle negativo recebeu, via gavagem, 0,3 mL de DMSO 1%. O grupo controle positivo, recebeu intraperitonealmente, 80 mg/kg de doxorrubicina. Os grupos tratados receberam, via gavagem, 0,3 mL da GA nas doses de 15, 30 e 60 mg/kg. Para a avaliação da genotoxicidade foi coletado sangue da veia caudal dos camundongos (4 e 24 horas após o tratamento), células do fígado, medula óssea, cérebro e testículos (coletadas 24 horas após o tratamento). Para a avaliação da mutagenicidade, foram coletadas células da medula óssea 24 horas após o tratamento. A citotoxicidade foi avaliada pela contagem de 200 eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE) e determinação de sua razão (PCE/NCE). Na amostra de sangue de 4h, analisadas pelo EC, os resultados obtidos mostraram que nas doses de 30 mg/kg e 60 mg/Kg houve um aumento estatisticamente significativo de danos no DNA, em comparação ao controle negativo, o que na amostra de sangue de 24h foi apenas evidenciado na dose de 60 mg/Kg. A análise dos demais tipos de células, por este mesmo ensaio, evidenciaram que as 3 diferentes

doses testadas acarretaram um aumento estatisticamente significativo de danos no DNA, em comparação ao controle negativo. Pelo teste do micronúcleo, os resultados mostraram que as doses de GA testadas não causaram alteração na razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos, indicando ausência de citotoxicidade. Por outro lado, a avaliação da mutagenicidade da GA revelou que as três doses da benzofenona causaram um aumento significativo de eritrócitos policromáticos micronucleados na medula óssea dos animais, indicando um efeito clastogênico/aneugênico da GA. Frente aos resultados obtidos e condições do experimento, conclui-se que a Gutiferona A mostrou-se genotóxica e clastogênica/aneugênica em diferentes células de camundongos, o que recomenda cautela em seu uso por seres humanos, considerando a genotoxicidade observada e a sua relação com o processo de carcinogênese.

ABSTRACT

Garcinia achachairu (GAC) is a native plant from Bolivia that has been used in folk medicine for the treatment of gastric disorders, rheumatism, inflammation and as a healing. The phytochemical characterization of this plant extract revealed that the benzophenone guttiferone A (GA) is one of its major compounds, which according to recent studies, has important antioxidant and antimicrobial activity. Considering the interest in deepening the analysis of the pharmacological potential of GA and the lack of studies assessing its genetic toxicity, the present study was designed in order to investigate the genotoxic and mutagenic effects of GA in different cells of mice *in vivo*, using some of the traditional tests in the mutagenesis area, the Comet Assay (CA) for genotoxicity evaluation and the Micronucleus Test (MT) for the mutagenicity assessment. The experiment was conducted in Swiss albino male mice (*Mus musculus*) with 12 weeks, divided into five groups with six animals each. The negative control group received, by oral gavage, 0.3 mL of 1% DMSO. The positive control group received, intraperitoneally, 80 mg/Kg of doxorubicin. The treated groups received 0.3 ml of GA at 15, 30 and 60 mg/kg, by gavage. For the genotoxicity evaluation, blood was collected from the tail vein of the mice (4 and 24 hours after treatment), and liver, bone marrow, brain and testicular cells were collected 24 hours after treatment. For the mutagenicity assessment, bone marrow cells were collected 24 hours after treatment. Cytotoxicity was assessed by scoring 200 consecutive polychromatic (PCE) and normochromatic (NCE) erythrocytes and their ratio (PCE/NCE) determined. For the 4 h blood sample, the results with GA at doses of 30 and 60 mg/kg showed that was a statistically significant increase in DNA damage in comparison to the negative control. For the 24 h blood sample, only 60 mg/kg dose showed significant genotoxicity. The analysis of other cell types, with this same test, showed that the three different doses tested induced a statistically significant increase in DNA damage compared to the negative control. By micronucleus test, the results showed that all tested doses of GA no caused change in the polychromatic and normochromatic

erythrocytes ratio, indicating absence of cytotoxicity. However, the mutagenicity assessment of GA by the MN test showed that all three doses of the benzophenone tested caused a significant increase of micronucleated polychromatic erythrocytes in the bone marrow cells of animals, showing an clastogenic/aneugenic effect. Given our results and the experimental conditions, we concluded that GA showed genotoxic and clastogenic/aneugenic effects in different cells of mice, which recommends caution in its use by humans, considering the genotoxicity observed and their relationship with the carcinogenesis process.

SUMÁRIO

	Pg.
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Mutagênese e Mutação.....	15
1.2 Ensaio Cometa.....	18
1.3 Teste do Micronúcleo.....	20
1.4 <i>Garcinia achachairu</i>	23
1.5 Considerações sobre as Gutíferonas	25
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo geral.....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33
3. REFERÊNCIAS	35
4. ARTIGO – Benzophenone guttiferone A from <i>Garcinia achachairu</i> Rusby (Clusiaceae) presents genotoxic effects in different cells of mice.	47
5. ANEXOS	64
Anexo 1.....	64
Anexo 2.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mutagênese e mutação

Mutação é definida como alterações permanentes no DNA não resultantes de processos naturais, como a recombinação e a segregação, sendo a mutagênese a ciência que estuda os mecanismos que induzem essas possíveis alterações (GUYTON, 2009). Essas alterações podem ou não modificarem a atividade normal da unidade genética onde ocorreu, envolvendo desde um único gene até todo o cromossomo (LEWIN, 2000). Quando não reparadas, essas alterações podem levar ao aparecimento de mutações (GRISOLIA, 2005). As mutações podem ocorrer em células somáticas, que estão envolvidas com o aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer, bem como em células germinativas, podendo ser transmitida para as células dos descendentes, sendo essas relacionadas a doenças hereditárias (DE FLORA; FERGUSON, 2005).

A Mutação pode ser dividida em mutação genômica, ocorrendo adição ou perda de cromossomos inteiros, mutação cromossômica, onde há rearranjo dos cromossomos e dos genes contidos nele e mutação gênica, onde há alteração de um único par de bases, em uma determinada região do DNA (NUSSBAUM *et al.*, 2006; MITCHELL *et al.*, 2006).

Diferente de agentes mutagenéticos, os agentes genotóxicos causam lesões primárias no DNA, passíveis de reparo, mas se essas não forem reparadas podem levar ao aparecimento de mutações (GONTIJO; TICE, 2003).

Os organismos vivos estão expostos a variados agentes ambientais (quadro 1), como químicos, físicos e biológicos e alguns desses agentes podem induzir alterações no DNA. O DNA sofre alterações ao longo da vida e com o passar do tempo e aumento da longevidade do organismo, a capacidade de reparo de tais alterações diminui e a taxa de mutação em cada divisão celular aumenta (GRISOLIA, 2005). Também sabemos que lesões persistentes no DNA

levam a um aumento do aparecimento de mutações, devido a maior probabilidade de ocorrerem replicação em um dos moldes alterados (PINTO; FELZENSZWALB, 2003). Por outro lado, sabe-se que, apesar disso, as mutações são as responsáveis pela diversidade genética, necessárias para evolução de todo ser vivo (PACHECO *et al.*, 2009).

Quadro1: Exemplos de fontes de exposição humana a diferentes agentes ambientais

AGENTES AMBIENTAIS		
Agentes Químicos	Agentes Físicos	Agentes Biológicos
Gases/Vapores	Pressão	Vírus
Produtos industrializados	Temperatura	Bactérias
Fumo	Iluminação	Parasitas
Poluição	Umidade	Animais peçonhentos
Drogas	Radiações	Infecções crônicas em geral

Sempre fomos expostos a diversos agentes ambientais, mas atualmente essa exposição está cada vez maior, com o aumento da presença de produtos carcinogênicos no nosso ambiente. Muitas substâncias estão presentes em nossa alimentação, em medicações, em produtos industrializados, além de também nos expormos às radiações e a outras fontes indutoras de mutação (FERGUSON *et al.*, 2004). Podemos destacar entre as fontes de exposição os medicamentos provenientes de plantas medicinais, essas usadas de diferentes formas, como chás, sopas, pastas, etc., sendo que a maioria dessas, apesar de uso comum pela população em geral, não foi avaliada adequadamente quanto ao seu potencial genotóxico. Essas plantas podem conter compostos que protegem o DNA (efeito antimutagênicos) ou que agem de maneira contrária, nós levando a uma exposição a efeitos mutagênicos (FRANCY-GUILFORD; PEZZUTO, 2008).

Segundo Novick e Szilard (1952), os compostos que possuem capacidade de reduzir as mutações, sendo essas espontâneas ou induzidas, são chamadas de antimutagênicos. Essas substâncias são então consideradas importantes devido à possibilidade da redução de mutações e com isso a diminuição na incidência de patologias graves, como o câncer (FERGUSON *et al.*, 2004). Esses compostos antimutagênicos são subdivididos em duas maneiras: os desmutagênicos, aqueles que inibem o aparecimento de lesões e os bioantimutagênicos, aqueles que colaboram no reparo das lesões existentes no DNA (LIVIERO; VON BORSTEL, 1996).

Devido a tudo isso, é imperativo que testes citogenéticos sejam desenvolvidos com essas substâncias, para que se observem os possíveis danos que estas possam promover no material genético, bem como avaliar os seus feitos genotóxicos/mutagênicos e, não menos importantes, antigenotóxicos/antimutagênicos. Outro fator importante é a forte correlação entre a mutagênese e a carcinogênese, relacionada ao acúmulo de agressões que podem levar a alterações as células, química e geneticamente, reforçando a importância do desenvolvimento da bateria de testes, que fazem parte da Genética Toxicológica, para avaliação o potencial genotóxico/mutagênico de agentes biológicos, físicos e químicos (McGREGOR *et al.*, 2000; ERDTMANN, 2003).

Com grande aceitação na comunidade científica, o ensaio cometa e o teste do micronúcleo estão entre os principais testes da Genética Toxicológica para a avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade, respectivamente. A diferença entre esses dois testes consiste, basicamente, no tipo de alteração detectada no DNA, onde o primeiro teste detecta lesões passíveis de reparo, enquanto o segundo teste detecta lesões irreparáveis (VALENTIN-SEVERIN *et al.*, 2003).

1.2 Ensaio Cometa

Desenvolvido por Rydberg e Johanson (1978) e modificada posteriormente por Östling e Johanson (1984), o ensaio cometa avalia o potencial genotóxico de substâncias naturais e sintéticas sobre organismos vivos, evidenciando possíveis danos primários no DNA. Nessa primeira modificação, é possível detectar danos em DNA de fita dupla, após corrida em eletroforese e sob pH neutro. Novamente modificada, agora por Singh *et al.* (1988), a técnica passa a ser usada com um tampão com pH superior a 13, onde é possível a detecção não apenas das quebras nas fitas duplas, mas também as quebras em fita simples (TICE *et al.*, 2000).

Independentemente da modificação, a metodologia desse teste é baseada na eletroforese de células em lise embebidas no gel de agarose, onde os fragmentos (danos sofridos no DNA) se afastam do seu núcleo principal, o que resulta em uma imagem parecida a um cometa, com sua cabeça e cauda (KLAUDE *et al.*, 1996). O mecanismo principal da técnica consiste então, na separação das estruturas supernoveladas do DNA e a migração das fitas simples e duplas que se quebraram (ÖSTLING; JOHANSON, 1984).

O ensaio cometa é considerado uma técnica simples, sensível, rápida e de baixo custo, permitindo a avaliação de danos em células em experimentos *in vivo* e *in vitro* (WITTE *et al.*, 2007; DHAWAN *et al.*, 2008). Além do mais o ensaio permite a utilização de um pequeno número de células por amostra e ainda poder ser realizadas em diferentes tipos celulares (TICE *et al.*, 2000). Vale lembrar também que, diferente de ensaios como o do micronúcleo, aberrações cromossômicas e trocas de cromátides irmãs, que obrigatoriamente necessitam de células em proliferação para sua viabilidade, o ensaio cometa não necessita desta condição (ROJAS *et al.*, 1999).

Para interpretação dos danos causados no DNA, as lâminas com as células são coradas e examinadas por microscopia de fluorescência, onde o cometa é dividido entre “cabeça”

(nucleóide) e “cauda” (danos). A presença da cauda indica dano no DNA e seu tamanho a quantidade do dano. Assim células sem a presença de cauda, são consideradas sem danos no DNA e os nucleóides totalmente fragmentados (células apoptóticas e necróticas) não são considerados/contados (SPEIT *et al.*, 1996). Os cometas são classificados em 4 classes, de acordo com a extensão do dano (Figura 1):

- cometa classe 0 – nucleóides sem danos (não apresentam cauda);
- cometa classe 1 – nucleóides com danos mínimos (cauda menor que o tamanho do nucleóide);
- cometa classe 2 – nucleóides com danos moderados (cauda até 2 vezes maior que o tamanho do nucleóide);
- cometa classe 3 – nucleóides com danos severos (cauda 2 vezes maior que o tamanho do nucleóide).

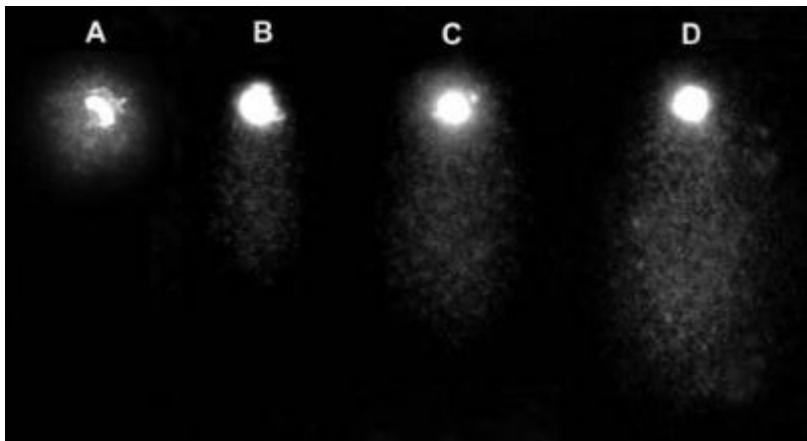


Fig 1: Classes observadas de cometas: A classe 0, B classe 1, C classe 2 e D classe 3 (CORTÉS-GUTIÉRREZ *et al.*, 2011).

A leitura/análise dos cometas além de ser realizada visualmente também pode ser feita de maneira automatizada, com programas computacionais específicos, sendo os resultados desses bastante semelhantes (COLLINS, 2004).

É importante ressaltar que o ensaio cometa detecta lesões genômicas primárias, isto é, passíveis de reparo, diferentemente do teste do micronúcleo, que detecta mutações no DNA (PIPERAKIS, 2009).

1.3 Teste do Micronúcleo

Desenvolvido por Schimid *et al.* (1971) e modificado por Heddle (1973), o teste do micronúcleo surgiu como um ensaio alternativo aos ensaios tradicionais, onde apresenta vantagens, dentre essas a rapidez, simplicidade, baixo custo e podendo ser usado em diferentes células, como as obtidas da medula óssea, sangue periférico e células esfoliadas dos epitélios, bucal, dos brônquios e da bexiga urinária (FERRARI, 1991). Vale lembrar que o Teste do Micronúcleo só deve ser realizado com populações celulares que tenham a capacidade de entrarem em divisão e que a análise seja realizada após um único ciclo, devido à incerteza da permanência destas estruturas por mais de um ciclo de divisão (FENECH, 2000).

Os micronúcleos são resultados da quebra cromossômica e disfunção do aparato mitótico, podendo ser formados então, pelos cromossomos acêntricos ou fragmentos cromatídicos e cromossomos inteiros ou cromátides que se atrasam na anáfase e que acabam expulsos do núcleo-filho na telófase (FENECH, 2000). Apesar do teste do micronúcleo detectar efeitos clastogênicos (micronúcleo contendo fragmento do cromossomo) ou aneugênicos (micronúcleo contendo cromossomo inteiro), só podemos diferenciá-los através da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), e sem esse, observamos apenas a presença ou ausência de micronúcleo nas células avaliadas (MATEUCA *et al.*, 2006). Segundo Valentin-Severin *et al.* (2003), uma substância micronúcleo positiva pode ser considerada mutagênica.

Os testes de micronúcleo são realizados tanto em *in vivo* como também *in vitro*.

Os ensaios *in vivo* são realizados a partir de células da medula óssea e sangue periférico de roedores. Os efeitos dos agentes químicos são observados em eritrócitos policromáticos (EPC), isso porque esses tem um tempo de vida relativamente pequeno. Além da contagem de micronúcleos em EPC, para a avaliação do potencial mutagênico, também é realizada a relação de eritrócitos normocromáticos/eritrócitos policromáticos, usada para avaliar a citotoxicidade (CHOY, 2001). O teste do micronúcleo *in vivo* (figura 2) é amplamente aceito pelas agências internacionais e governamentais e fazem parte dos estudos sobre a avaliação de segurança de vários produtos químicos e farmacêuticos (KRISHNA *et al.*, 2000).

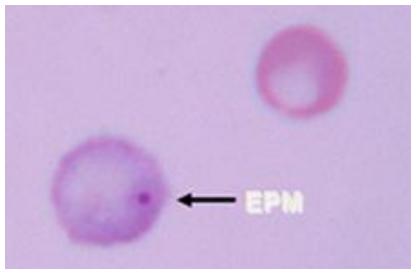


Fig 2: Eritrócito policromático com presença de micronúcleo (EPM)

Fonte: <http://impacgen.com/b-ensayo-de-micro-nucleos.html>

Como na a avaliação *in vivo*, o teste *in vitro* (figura 3), tem como requisito obrigatório: a divisão celular. Baseado nisso, Fenech e Moley (1985) introduziram a citocalasina B (CTB) na cultura de células *in vitro* (figura 4). O princípio do teste baseia-se no bloqueio da citocinese e, conseqüentemente, o aparecimento de células binucleadas e a certeza da divisão celular. Além da contagem do micronúcleo, outros parâmetros podem ser investigados, como a viabilidade celular (células necróticas e apoptóticas), cálculo do índice de divisão nuclear e a instabilidade cromossômica/rearranjo cromossômico, pela presença de brotos e pontes nucleoplasmáticas (FENECH, 2006).

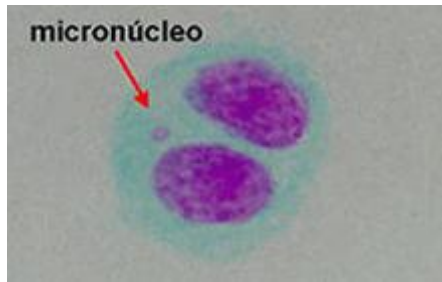


Fig 3: célula binucleada com presença de micronúcleo

Fonte: <http://www.usp.br/agen/repgs/2006/pags/189.htm>

Sua aplicação é bem aceita, tornando-se uma metodologia de referência para avaliação do micronúcleo tanto *in vitro* como *in vivo* e recomendada pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) para avaliação mutagênica de novos produtos químicos (KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2011).

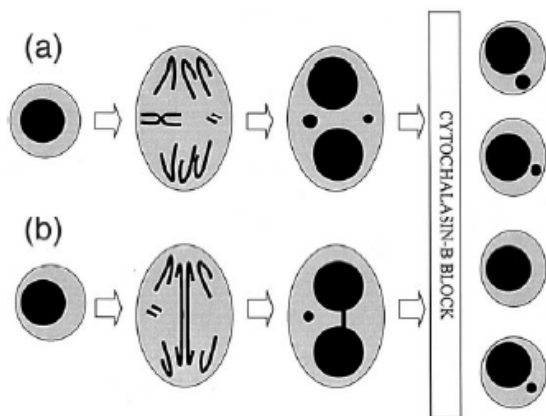


Fig 4: cultura de células com citocalasina B (FENECH, 2000)

Um dos problemas encontrados entre a avaliação do teste do micronúcleo *in vivo* e *in vitro* é a média de falsos positivos, onde teste com resultados negativos *in vivo* deram positivos em 70-90% no teste *in vitro* (KIRKLAND *et al.*, 2006). Segundo Kirsch-Volders *et al.* (2011), essa inconsistência pode ser resultado de problemas técnicos do teste *in vitro*, como também devido a não representatividade dos testes *in vivo*.

Em um workshop realizado pelo Laboratório de Referência da União Européia de Alternativas aos Testes em Animais (ECVAM) concluiu que levar em conta sistemas de reparo de DNA e a proteína p53, o cobrimento de um amplo conjunto de enzimas e o uso correto de concentrações e citotoxicidade, oferecem uma esperança para a redução de falsos positivos (Kirkland *et al.*, 2007).

1.4. *Garcinia achachairu*

A família Guttiferaceae, é composta por cerca de 40 gêneros e 1.350 espécies, sendo *Clusia*, *Garcinia* e *Hypericum* os gêneros mais numerosos com cerca de 400 espécies cada, amplamente distribuídas em regiões tropicais como Ásia, África, Nova Caledônia, Polinésia e Brasil (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Plantas da família Guttiferaceae possuem ampla gama de constituintes, como os derivados de floroglucinol e benzofenonas, sendo que seus representantes são encontrados, principalmente, nas regiões tropicais úmidas, exceto para as do gênero *Hypericum*, encontradas nas zonas temperadas (BENNET; LEE, 1989).

Dentro da família Guttiferaceae encontra-se a *Garcinia achachairu* Rusby (figura 5) conhecida como “achacahairú”. Essa planta de origem Boliviana (Santa Cruz) tem seus frutos e folhas usados na medicina popular como cicatrizantes, digestivos e laxantes e em tratamentos de reumatismo, úlcera gástrica e inflamação (BARBOSA; ARTIOLE, 2007; DAL-MOLIN, 2009). Embora bem adaptada ao Brasil e relativamente fácil de se encontrar tanto aqui como na Bolívia, são raros os estudos científicos sobre esta espécie, onde foi realizada apenas uma avaliação do potencial genotóxico do extrato bruto das suas sementes (BARBOSA; ARTIOLE, 2007; DAL-MOLIN *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2012).

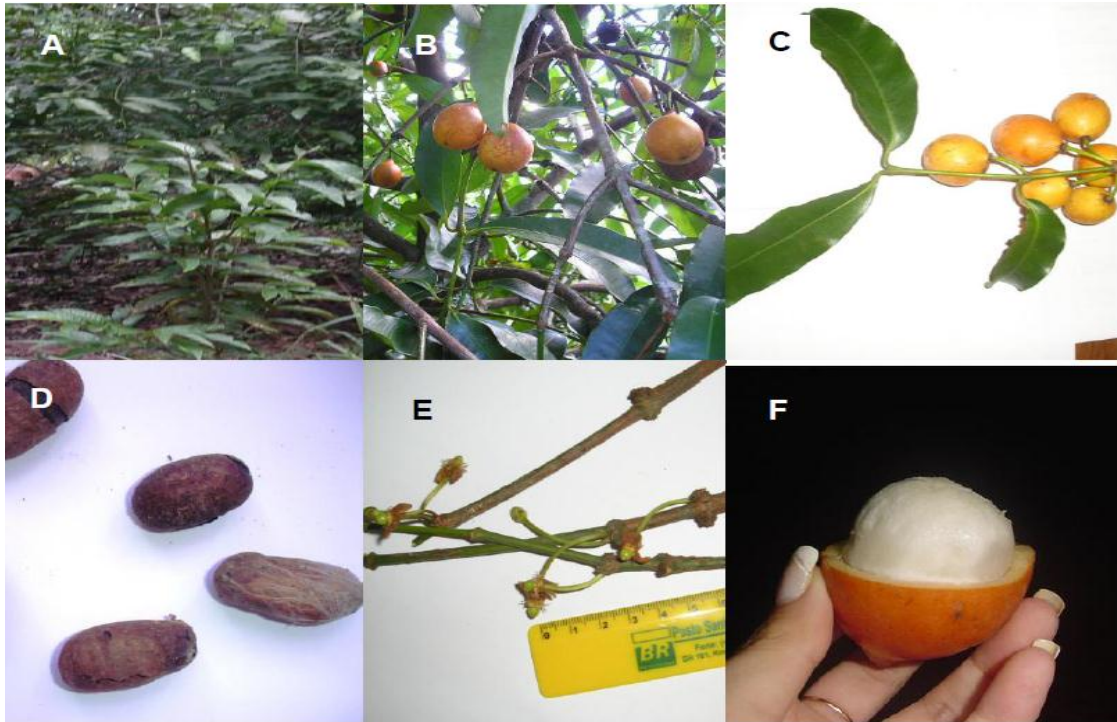


Fig. 5: aspectos das estruturas da *Garcinia achachairu* – A = aspecto geral da plantas; B e C = folhas e frutos; D = sementes; E = flores; F = fruto (DAL-MOLIN, 2009).

A gutiferona A (figura 6), principal constituinte da *G. achachairu*, já foi isolada de outras espécies, como a *Garcinia intermédia*, *Garcinia brasiliense*, *Garcinia macrophylla*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia aristata*, *Symphonia globulifera* e *Symphonia pauciflora*, sendo isolada pela primeira vez dessa planta por Dal-Molin *et al.* (2012).

No capítulo a seguir, será demonstrado as aplicabilidades das diferentes gutiferonas, incluindo a gutiferona A.

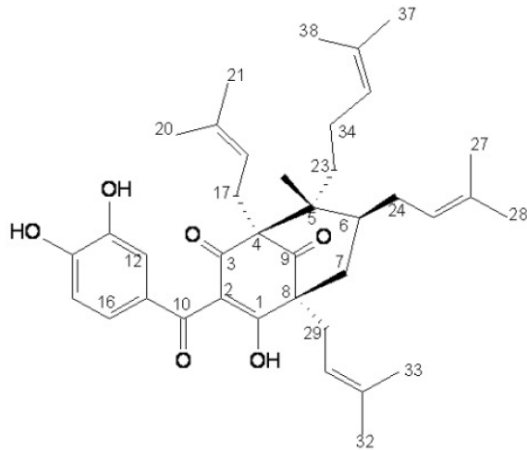


Fig. 6: estrutura química da gutiferona A isolada das sementes da *G. achachairu* (DALMOLIN, 2009).

1.5 Considerações sobre as Gutiferonas

Para que se realize a abordagem conceitual inerente a este tópico salienta-se que as benzofenonas se tratam de compostos fenólicos de origem natural. Tais Fenólicos podem ser encontrados, em especial, nas famílias Guttiferaceae e Gentianaceae (ACUNA *et al.*, 2009). Essas benzofenonas são classificadas como: simples, simples polipreniladas e polipreniladas (BEERHUES; LIU, 2009). São as benzofenonas polipreniladas que oferecem a base estrutural para o conceito de gutiferona, ou seja, entende-se que gutiferonas são benzofenonas polipreniladas associadas com atividades biológicas tais como, captação de radicais livres, efeitos anti-úlceras, citotoxicidade, ação na inibição da sintase do óxido nítrico, ação na quimioprevenção do câncer, indução de apoptose, inibição da desmontagem de microtúbulos, atividade anti-HIV, e efeito tripanocida (NALDONI *et al.*, 2009). Nesta vertente, tem-se que as gutiferonas apresentam, conforme a sua estrutura química, as seguintes classificações: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O e P.

A avaliação de atividade biológica, de compostos isolados de espécies da família Guttiferaceae, tem possibilitado a identificação de moléculas potencialmente capazes de

interferir na atividade celular de diferentes organismos tais como: fungos, bactérias, vírus, protozoários e de células tumorais humanas (MARQUES *et al.*, 2009).

As gutíferonas são encontradas em cascas, caule, sementes, folhas e frutos de plantas dessa família. O quadro 2 apresenta os tipos de gutíferonas e as estruturas vegetal de onde são obtidas.

Quadro 2. Gutíferonas: espécies e estruturas vegetais de origem

COMPOSTOS	PLANTAS	ESTRUTURA VEGETAL DE ORIGEM
GUTIFERONA C e D	<i>Symphonia globulifera</i>	Frutas (GUSTAFSON <i>et al.</i> , 1992)
GUTIFERONA A e G	<i>Garcinia macrophylla</i>	Galhos (WILLIAMS <i>et al.</i> , 2003).
GUTIFERONA H	<i>Garcinia xanthochymus</i>	Frutas (BAGGETT <i>et al.</i> , 2005).
GUTIFERONA I	<i>Garcinia humilis</i>	Casca e Caule (HERATH <i>et al.</i> , 2005).
GUTIFERONA A	<i>Symphonia globulifera</i>	Casca da semente (NGOUELA <i>et al.</i> , 2006).
GUTIFERONA B	<i>Garcinia oblongifolia</i>	Casca (HAMED <i>et al.</i> , 2006).
GUTIFERONAS E, I e J	<i>Garcinia virgata</i>	Casca do caule (MERZA <i>et al.</i> , 2006).
GUTIFERONAS K e L	<i>Rheedia calcicola</i>	Frutas (CAO <i>et al.</i> , 2007).

GUTIFERONA A	<i>Garcinia brasiliensis</i>	Frutas (NALDONI <i>et al.</i> , 2009).
GUTIFERONAS O e P	<i>Garcinia solomonensis</i>	Cascas do caule (CARROLL <i>et al.</i> , 2009)
GUTIFERONAS A e E	<i>Garcinia intermedia</i>	Sementes e casca (ACUNA <i>et al.</i> , 2010).
GUTIFERONAS M e N	<i>Garcinia cambogia</i>	Frutas (MASULLO <i>et al.</i> , 2010)
GUTIFERONAS A, E e K	<i>Garcinia livingstonei</i>	Frutos (YANG <i>et al.</i> , 2010).
GUTIFERONAS E e F	<i>Garcinia multiflora</i>	Galhos (LIU <i>et al.</i> , 2010).
GUTIFERONAS E e O	<i>Garcinia afzelii</i>	Frutos (LANNANG <i>et al.</i> , 2010).
GUTIFERONA A	<i>Garcinia brasiliensis</i>	Frutos (PEREIRA <i>et al.</i> , 2010).
GUTIFERONAS A e I	<i>Symphonia pauciflora</i>	Folhas, flores e frutos (PAN <i>et al.</i> , 2010).
GUTIFERONA A	<i>Garcinia aristata</i>	Frutos (FIGUEREDO <i>et al.</i> , 2011)
GUTIFERONA A	<i>Garcinia aristata</i>	Frutos (MONZOTE <i>et al.</i> , 2011)
GUTIFERONA A	<i>Garcinia aristata</i>	Frutos (PARDO-ANDREU <i>et al.</i> , 2011).
GUTIFERONA F	<i>Allanblackia gabonenses</i>	Casca do caule (AZEBAZE <i>et al.</i> , 20012).

Nos parágrafos adiante, será demonstrado à origem e potenciais terapêuticos das diferentes Gutíferonas.

Dos galhos da *Garcinia macrophylla*, conhecida popularmente como “Bacurí-pari”, foram isolados do extrato de acetato de etila, as gutíferonas A e G. Essas duas gutíferonas, A e G, se mostraram fracamente citotóxicas para as células do câncer do ovário A2780 (WILLIAMS *et al.*, 2003).

Garcinia xanthochymus, conhecida popularmente como “Gamboge”, é usada na medicina popular no tratamento de diarreia e disenteria. Do extrato metanólico das frutas da *G. xanthochymus*, foram isolados 13 compostos, incluindo a gutíferona H. O ensaio DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) foi usado para avaliar sua atividade antioxidante e citotóxica em células de câncer do cólon humano SW-480. Os resultados demonstraram que a gutíferona H possui atividade antioxidante no ensaio DPPH e também potente citotoxicidade nas células SW-480 (BAGGETT *et al.*, 2005).

No extrato de hexano da casca do caule da *Garcinia virgata*, encontrada na Nova Calêdonia, foram isoladas quatro substâncias, incluindo nessas as gutíferonas E, I e J. As gutíferonas I e J mostraram atividade citotóxica fraca em células KB (células de carcinoma epidermóide oral humano) (MERZA *et al.*, 2006).

Rheedia calcicola é uma árvore alta encontrada em Madagascar, onde do extrato etanólico dos seus frutos foram isoladas as gutíferonas K e L. As gutíferonas K e L foram avaliadas quanto a sua atividade antiproliferativa em células de câncer de ovário humano A2780. O resultado mostrou que essas gutíferonas possuem fraca atividade contra essa linhagem de célula do câncer (CAO *et al.*, 2007).

Symphonia pauciflora, conhecida popularmente como “Azinina”, é uma espécie de planta encontrada nas florestas tropicais de Madagascar. Dessa planta (folhas, flores e frutas), foi obtido

um extrato etanólico, contendo as gutíferonas A e I. A atividade antiproliferativa para células de câncer do ovário A2780 foi avaliada e as gutíferonas A e I demonstraram moderada atividade contra essas células (PAN *et al.*, 2010).

Usada popularmente como anti-inflamatório, a *Garcinia multiflora* é uma pequena árvore distribuída pelo sul da China e Hong Kong, onde do extrato de acetona de seus galhos foram isoladas dez substâncias, incluindo as gutíferonas E e F. A avaliação do potencial apoptótico de seus componentes foi realizada pela avaliação imunohistoquímica da caspase-3 utilizando células HeLa-C3 (câncer do colo do útero). Os resultados encontrados demonstraram que gutíferona E induz apoptose nessas células em três concentrações testadas e gutíferona F tem os mesmo resultados apenas nas doses mais altas (LIU *et al.*, 2010).

As Gutíferonas A, E e K foram isoladas dos frutos da *Garcinia livingstonei*, sendo a gutíferona K isolada pela primeira vez nessa espécie. *Garcinia livingstonei*, usada como afrodisíaco e conhecida popularmente como “Imbe”, é uma pequena árvore encontrada nas regiões mais quentes do continente africano. Em sua avaliação citotóxica, células de câncer do cólon HCT-116, HT-29 e SW-480 foram utilizadas. Para a investigação do potencial citotóxico o teste MTT (the methyl tetrazolium assay) foi aplicado. As gutíferonas A e K demonstraram uma forte atividade citotóxica contra as células HCT-116 e HT-29, mas uma baixa atividade em relação às células SW-480 (YANG *et al.*, 2010).

Conhecida popularmente como “Mangostão de Cuba”, a *Garcinia aristata* é usada como laxante, anti-hemorrágico, antitetânico e anti-reumático. Das suas frutas frescas foi extraída a gutíferona A. Foram avaliadas a citotoxicidade da gutíferona A em células do câncer hepático HepG2 e também suas ações na membrana mitocondrial isoladas do fígado de ratos Wistar. A incubação da gutíferona A com as células HepG2 diminuiu a viabilidade dessas células, promoveu uma dissipação do potencial de membrana mitocondrial, induziu depleção de ATP (adenosina trifosfato) e elevou os níveis de espécies reativas do oxigênio (EROS). Já nas

mitocôndrias dos ratos, houve depleção do ATP, efluxo do cálcio, depleção do NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), aumento dos níveis de EROS, fluidez da membrana aumentada (PARDO-ANDREU *et al.*, 2011).

Do extrato de cascas da *Garcinia oblongifolia*, encontradas no Vietnã e usada popularmente como anti-inflamatório e analgésico, foram isoladas seis substâncias, incluindo a gutiferona B. A gutiferona B demonstrou ser inativa na inibição de desmontagem de microtúbulos e ter fraca atividade na inibição de montagem da tubulina (HAMED *et al.*, 2006).

As gutiferonas O e P foram isoladas do extrato metanólico da casca do caule da *Garcinia solomonensis*, planta encontrada na Papua-Nova Guiné. Essas foram avaliadas na sua capacidade de inibição da MAPKAPK2 (proteína quinase relacionada à expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose). Gutiferonas O e P, apresentaram fraca atividade inibitória para MAPKAPK2 (CARROLL *et al.*, 2009).

Da *Garcinia humilis*, conhecida como “Achacha”, foi obtido do extrato de hexano das cascas e caule, a gutiferona I. Essa planta encontrada na ilha de Dominica (Índias Ocidentais) é usada popularmente como inibidor de fome. O ensaio de ligação LXRR-SPA (Ensaio de proximidade de cintilação do receptor X do fígado) foi realizado, onde a gutiferona I demonstrou efeito inibitório a esse receptor de hormônio (HERATH *et al.*, 2005).

As gutiferonas A e E foram isoladas juntamente com outros sete compostos já conhecidos, das sementes e casca da *Garcinia intermedia*. Essa planta encontrada nas florestas tropicais da América Central é conhecida popularmente como “Limão do Mato”. Análises da capacidade antioxidante desses compostos foram realizadas por testes DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) e ABTS (sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico), onde a gutiferona A mostrou forte atividade antioxidante (ACUNA *et al.*, 2010).

Colhidas do jardim botânico de Cuba, *Garcinia aristata* é conhecida popularmente como “Mangostão de Cuba” e usada como laxante, anti-hemorragico, antitetânico e anti-reumático.

Das frutas frescas da *Garcinia aristata* a substância gutiferona A foi extraída. A avaliação da citotoxicidade da gutiferona A, em células PC12 (linhagem da medula supra-renal de rato) e cultura primária de neurónios corticais de ratos, foi realizada. Houve efeito protetor da gutiferona A sobre as células com danos causados pelo sulfato de ferro, na pré-incubação (gutiferona A incubada antes com as células avaliadas e posteriormente sendo adicionado sulfato de ferro) e na co-incubação (gutiferona A e sulfato de ferro incubados juntos com as células avaliadas), sendo que a primeira forma de tratamento demonstrou ser mais efetiva nessa proteção. Neste mesmo trabalho também foi demonstrada a inibição da peroxidação lipídica na presença da gutiferona A. Outro efeito protetor encontrado foi na degradação oxidativa da 2-desorribose, onde a gutiferona A se mostrou mais efetiva que a droga específica, dimetilsulfóxido (DMSO) (FIGUEREDO *et al.*, 2011).

Symphonia globulifera ou “Oanani” é encontrada em Camarões e usada popularmente para problemas de estômago, de pele, laxante para mulheres grávidas e como tônico geral. Do extrato metanólico da casca da semente foram extraídos sete compostos, incluindo a gutiferona A. Foi avaliado o efeito antioxidante da gutiferona A, através da atividade sequestradora de radicais livres de DPPH, e sua atividade antiplasmodial contra *Plasmodium falciparum*. A gutiferona A demonstrou forte atividade antioxidante e moderada atividade antiplasmodial para *P. falciparum* (NGOUELA *et al.*, 2006).

Do extrato de hexano das frutas da *Garcinia brasiliensis* foram isoladas 3 substâncias, sendo umas delas a gutiferona A. Os frutos da *Garcinia brasiliensis* ou “Bacupari do Achado” foram colhidos de árvores do herbário da Universidade de Viçosa-MG, sendo essa planta usada popularmente no tratamento de feridas, úlceras estomacais, problemas urinários e tumores. Atividade contra promastigotos e amastigotos da *Leishmania amazonensis* foi avaliada e a citotoxicidade da gutiferona A em macrófagos de Murinos também foi testada. Foi observado uma

forte atividade dessa gutiferona A contra promastigotos e amastigotos da *L. amazonenses* e uma pequena citotoxicidade nos macrófagos de Murinos (PEREIRA *et al.*, 2010).

Do extrato dos frutos da *Garcinia brasiliensis* foram isolados duas naturais benzofenonas polipreniladas, incluindo a gutiferona A. A substância gutiferona A foi isolada do extrato etanólico das sementes dessa planta. A atividade antimicrobiana foi avaliada através da técnica de difusão adaptada descrita por Bauer *et al* (1966). Os resultados demonstraram que a gutiferona A possui efeitos bacteriostáticos, mas não bactericidas contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (NALDONI *et al.*, 2009).

Em mais outro estudo com frutos da *Garcinia aristata* realizado em Cuba, a gutiferona A também foi isolada. Sua atividade antimicrobiana foi observada para fungos (*Trichophyton rubrum* e *Candida albicans*), bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), parasitas (*Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonenses*) e também sua citotoxicidade em células MRC-5 (linhagem de células do pulmão). Uma moderada atividade antimicrobiana contra *S. aureus* foi observada, assim como contra *P. falciparum*. Citotoxicidade em células MCR-5 também foi reportada (MONZOTE *et al.*, 2011).

As gutiferonas E e O, juntamente com outros nove compostos, foram isolados do extrato de hexano dos frutos da *Garcinia afzelii*, uma árvore pequena encontrada em Camarões e Gana. As folhas e flores dessa árvore conhecida como “Kola amarga” são usadas popularmente como antibactericida e para higiene bucal. Atividade anti-vírus da influenza, inibição do vírus HIV (vírus da imunodeficiência humana) e citotoxicidade foram investigadas. As gutiferonas E e O se mostraram altamente citotóxicas, mas inativas em relação aos dois vírus (LANNANG *et al.*, 2010).

Na literatura são muito escassos os estudos investigando as atividades biológicas das gutiferonas e das plantas das quais são obtidas, no que diz respeito ao potencial genotóxico.

Marques *et al.* (2012), através dos teste do cometa e micronúcleo, avaliou respectivamente o potencial genotóxico e mutagênico do extrato da semente da *Garcinia achachairu* em células do sangue, medula, cérebro, fígado e testículos de camundongos. Nesse único estudo encontrado na literatura usando essas avaliações em plantas desse gênero, não foram encontrados efeitos genotóxicos, mutagênicos e citotóxicos para as células de camundongos avaliadas.

2. OBJETIVO

Frente ao fato de que o gênero *Garcinia*, e mais especificamente a espécie *Garcinia achachairu*, vem despertando no meio farmacêutico um crescente interesse em sua utilização, por possuírem princípios ativos com ação comprovada para várias doenças, e pelo fato da inexistência de qualquer estudo avaliando a toxicidade genética da gutiferona A, composto majoritário do extrato de sementes de *G. achachairu*, o presente estudo foi elaborado visando:

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial genotóxico e mutagênico da gutiferona A, em testes *in vivo*, realizado com diferentes células somáticas e germinativas de camundongos.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o potencial genotóxico da gutiferona A em células do sangue periférico, medula óssea, células hepáticas, células do cérebro e células do testículo de camundongos suíços albinos, *in vivo*, com a utilização do *Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)* ou Ensaio Cometa.

Avaliar o potencial mutagênico da gutiferona A em células da medula óssea de camundongos suíços albinos, *in vivo*, pelo Teste do Micronúcleo.

3. REFERÊNCIAS

ACUNA, U.M.; FIGUEROA, M.; KAVALIER, A.; JANCOVSKI, N.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Benzophenones and Biflavonoids from *Rheedia edulis*. **J.Nat.Prod**, v. 73, p. 1775-1779, 2010.

ACUNA, U.M.; JANCOVSKI, N.; KENNELLY, E.J. Polyisoprenylated Benzophenones from Clusiaceae: Potential Drugs and Lead Compounds. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v. 9, p. 1560-1580, 2009.

ALMEIDA, L.S.B.; MURATA, R.M.; YATSUDA R.; DOS SANTOS M.H.; NAGEM, T.J.; ALENCAR, S.M., KOOF H, ROSALEN P.L. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phymed**, v. 15, p. 886-891, 2008.

AZEBAZE, A.G.B.; OUAHOUE, B.M.W.; VARDAMIDES, J.C.; VALENTIN, A.; KUETE, V.; ACEBEY, L.; BENG, V.P.; NKENGFAK, A.E.; MEYER, M. antimicrobial and antileishmanial xanthenes from the stem bark of *Allanblackia gabonensis* (guttiferae). **Natural Prod. Research: Formerly Natural Product Letters**. v. 22, p. 333-341, 2012.

BAGGETT, S.; PROTIVA, P.; MAZZOLA, E. P.; YANG, H.; RESSLER, E. T.; BASILE, M. J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. Bioactive benzophenones from *Garcinia xanthochymus* fruits. **J.Nat.Prod**. v. 68, p. 354-360, 2005.

BARBOSA, W.; ARTIOLE, F.A. **A fruta achachairú**. 2007. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/achachairu/index.htm. Acesso em: 06/5/2012

BEERHUES, L.; LIU, B. Review: Biosynthesis of biphenyls and benzophenones – Evolution of benzoic acid-specific type III polyketide synthases in plants. **Phytochemistry**, v.70, p.1719-1727, 2009.

BENNET, G.T.; LEE, H.H. Xanthonenes from Guttiferae. **Phytochemistry**, v. 28, p. 4, p. 967-998, 1989.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazonica**. v.36, p. 357-364, 2006.

CAO, S.; BRODIE, P.J.; MILLER, J.S.; RATOVOSON, F.; BIRKINSHAW, C.; RANDRIANASOLO, S.; RAKOTOBE, E.; RASAMISON, V.E.; KINGSTON, D. G. I. Guttiferones K and L, Antiproliferative compounds of *Rheedia calcicola* from the Madagascar rain forest. **J.Nat.Prod.** v. 70, p. 686-688, 2007.

CARROLL, A.R.; SURAWEERA, L.; KING, G.; RALI, T.; QUINN, R.J. Guttiferones O and P, prenylated benzophenone MAPKAPK-2 inhibitors from *Garcinia salomonensis*. **J.Nat.Prod.** v. 72, p. 1699-1701, 2009.

CHOY, W.N. **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. Marcel Dekker, Inc, New York: 2001.

COLLINS A. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**. v.26, p.249-261, 2004.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E.I.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M.I.; FERNÁNDEZ, J.L.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; GOSÁLBEZ, A.; GOSÁLVEZ, J. New Application of the Comet Assay: Chromosome–Comet Assay. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v. 59, p. 655 – 660, 2011.

DAL-MOLIN, M.M.; SILVA, S.; ALVES, D.R.; QUINTÃO, N.L; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V.; NIERO, R. Phytochemical analysis and antinociceptive properties of the seeds of *Garcinia achachairu*. **Arch Pharm Res**. v. 35, p. 623-631, 2012.

DAL-MOLIN, M. M. D., **Isolamento, identificação e avaliação farmacologia de extratos, frações e compostos obtidos das partes aéreas da *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae)**, 2009, 81 fl. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2009.

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

DHAWAN, A.; BAIPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology and Toxicology**. v. 25, p. 5-32, 2008.

ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 23 – 46.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**. v. 600, p. 58–66, 2006.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**. v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; MORLEY, A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. **Cytobios**. v. 43, p. 233-46, 1985.

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

FERRARI, I. (1991). Teste do micronúcleo em cultura temporária de linfócitos. In: Rabello-Gay, M. N.; Rodrigues, M. A. R.; Monteleone-Neto. **R. Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: Revista Brasileira de Genética. p. 107-122.

FIGUEREDO, Y.N.; GARCIA-PUPO, L.; RUBIO, O.C.; HERNÁNDEZ, R.D.; NAAL, Z.; CURTI, C.; ANDREU, G.L.P. A Strong protective action of guttiferone A, a naturally occurring prenylated benzophenone, against iron-induced neuronal cell damage. **J.Pharmacol Sci**. v. 36, p. 36-46, 2011.

FRANCY-GUILFORD, J. PEZZUTO, J.M. Mechanisms of Cancer Chemopreventive Agents: A Perspective. **Planta Med**. v.74, p.1644-1650, 2008.

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, 2003. p. 247 – 271.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos Mutações, Câncer e Reprodução**. Editora da UNB. Brasília, 392p. 2005.

GUSTAFSON, K.R.; BLUNT, J.W.; MUNRO, H.G.M.; FULLER, R.W.; MCKEE, C.T.; CARDELLINA, J.H.; MCMAHON, J.B.; CRAGG, G.M.; BOYD, M.R. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia ovalifolia*, and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**. v. 48, p. 10093-10102, 1992.

GUYTON, K. Z.; KYLE, A. D.; AUBRECHT, J.; COGLIANO, V. J.; EASTMOND, D. A.; JACKSON, M.; KESHAVA, N.; SANDY, M. S.; SONAWANE, B.; ZHANG, L.; WATERS, M. D.; SMITH, M. T. Improving prediction of chemical carcinogenicity by considering multiple mechanisms and applying toxicogenomic approaches. **Mutation research**, v. 681, p. 230-40, 2009.

HAMED, W.; BRAJEUL, S.; MAHUTEAU-BETZER, F.; THOISON, O.; MONS, S.; DELPECH, B.; HUNG, N.V.; SE' VENET, T.; MARAZANO, C. Oblongifolins A-D, Polyprenylated Benzoylphloroglucinol Derivatives from *Garcinia oblongifolia*. **J.Nat.Prod.** v. 69, p. 774-777, 2006.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**. v. 18, p. 187–190, 1973.

HERATH, K.; JAYASURIYA, H.; ONDEYKA, J.G.; GUAN, Z.; BORRIS, R.P.; STIJFHOORN, E.; STEVENSON, D.; WANG, J.; SHARMA, N.; MACNAUL, K.; MENKE, J.G.; ALI, A.; SCHULMAN, M.J.; SINGH, S.B. Guttiferone I, a New Prenylated Benzophenone from *Garcinia humilis* as a Liver X Receptor Ligand **J.Nat.Prod.** v. 68, p. 617-619, 2005.

KIRKLAND, D.; AARDEMA, M.; BANDUHN, N.; CARMICHAEL, P.; FAUTZ, R.; MEUNIE, J.R.; PFUHLER, S. In vitro approaches to develop weight of evidence (WoE) and mode of action (MoA) discussions with positive in vitro genotoxicity results. **Mutagenesis.** v. 22, p. 161–175, 2007.

KIRKLAND, D.; AARDEMA, M.; MULLER, L.; MAKOTO, H. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens II. Further analysis of mammalian cell results, relative predictivity and tumour profiles. **Mutation Research.** v. 608, p. 29–42, 2006.

KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS, G.; ELHAJOUJI, A.; LUKAMOWICZ, M.; GONZALEZ, L.; LOOCK, K.V.; DECORDER, I. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Arch.Toxicol.** v. 85, p. 873-899, 2011.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research.** v. 363, p. 89-96, 1996.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun**, v. 3, p. 103-115, 1995.

KRISHNA, G.; URDA, G.; PAULISSEN, J. Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. **Mutation Research**. v. 453, p. 45-50, 2000.

LANNANG, A.M.; LOUH, G.N.; BILOA, B.M.; KOMGUEM, J.; MBAZOA, C.D.; SONDEGAM, B.L.; NAESESENS, L.; PANNECOUQUE, C.; CLERCQ, E.; ASHRY, E.S.H.E. Cytotoxicity of Natural Compounds Isolated from the Seeds of *Garcinia afzelii*. **Planta Med**. v. 76, p. 708-712, 2010.

LEWIN, B. (Ed) *Genes VII*. USA: Oxford University Press, 2000. In: NEGRAES, P. D. Mutagenicidade e Antimutagenicidade da Clorofilina – Uma avaliação do seu mecanismo de ação in vitro. **Dissertação de Mestrado**. UEL. Londrina: 2003.

LIU, X.; YU, T.; GAO, X.; ZHOU, Y.; QIAO, C.; PENG, Y.; CHEN, S.; LUO, K.Q.; XU, H. Apoptotic effects of polyprenylated benzoylphloroglucinol derivatives from the twigs of *Garcinia multiflora*. **J.Nat.Prod**. v. 73, p. 1355-1359, 2010.

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

MARQUES, E.J.; EL-BACHÁ, R. S.; CRUZ, F. G. Citotoxicidade de benzofenonas e triterpeno isolados de *C. criuva* contra células GL-15 de glioblastoma humano. 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009.

MARQUES, E.S.; SILVA, S.; NIERO, R.; ANDRADE, S.F.; ROSA, C.P.; PERAZZO, F.F.; MAISTRO, E.L. Genotoxicity assessment of *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) extract in mammalian cells *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 142, p. 362-366, 2012

MASULLO, M.; BASSARELLO, C.; BIFULCO, G.; PIACENTE, S. Polyisoprenylated benzophenone derivatives from the fruits of *Garcinia cambogia* and their absolute configuration by quantum chemical circular dichroism calculations. **Tetrahedron**. v. 66, p. 139-145, 2010.

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

McGREGOR, J.T.; CASCIANO, D.; MULLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutation Research**. v.455, p. 3-20, 2000.

MERZA, J.; MALLET, S.; LITAUDON, M.; DUMONTET, V.; SERAPHIN, D.; RICHOMME, P. New cytotoxic guttiferone analogues from *Garcinia virgata* from New Caledonia. **Planta Med**. v. 72, p. 87-89, 2006.

MITCHELL, R.N.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins Cotran: Fundamentos de Patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 94 p.

MONZOTE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; MATHEEUSSEN, A.; ASSCHE, T.V.; MAES, L.; COS, P. Antimicrobial evaluation of the polyisoprenylated benzophenones nemorosone and guttiferone A. **Phytotherapy Research**. v. 25, p. 458-462, 2011.

NALDONI, F. J.; CLAUDINO, A. L. R.; CRUZ-JR, J. W.; J.K. CHAVASCO, J. K.; P.M. Faria e SILVA, P. M. F.; VELOSO, M. P.; DOS SANTOS, M. H. Antimicrobial Activity of Benzophenones and Extracts from the Fruits of *Garcinia brasiliensis*. **J. Med. Food**. v. 12, p. 403–407, 2009.

NGOUELA, S.; LENTA, B. N.; NOUNGOUE, D. T.; NGOUPAYO, J.; BOYOM, F. F.; TSAMO, E.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; CONNOLLY, J. D. Antiplasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. **Phytochemistry**. v. 67, p. 302-306, 2006.

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

NUSSBAUM, R.L.; McINNES, R.R.; WILLARD, H.F. **Thompson & Thompson Genética Médica**. Ed. Guanabara Koogan, 6ª ed, 2006.

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

PACHECO ABF, KRÜGER WMV, FERREIRA LCS. **Apostila Mutagênese**. Universidade

Federal do Rio de Janeiro. 2009.

PAN, M. H.; CHANG, W. L.; LIN-SHIAU, S. Y.; HO, C. T.; LIN, J. K. Induction of apoptosis by garcinol and curcumin through cytochrome c release and activation of caspases in human leukemia HL-60 cells. **J. Agric. Food Chem.** v. 49, p. 1464-1474, 2010.

PARDO-ANDREU , G.L.; NUÑEZ-FIGUEREDO, Y.N.; TUDELLA, V.G.; CUESTA-RUBIO, O.; RODRIGUES, F.P.; PESTANA, C.R.; UYEMURA, S.A.; LEOPOLDINO, A.M.; ALBERICI, L.C.; CURTI, C. The anti-cancer agent guttiferone-A permeabilizes mitochondrial membrane: Ensuing energetic and oxidative stress implications. **Toxicology and Applied Pharmacology.** v. 253, p. 282–289, 2011.

PEREIRA, I.O.; MARQUES, M.J.; PAVAN, A.L.R.; CODONHO, B.S.; BARBIERI, C.L.; BEIJO, L.A.; DORIGUETTO, A.C.; D’MARTIN, E.C.; DOS SANTOS M.H. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine.** v. 17, p. 339–345, 2010.

PINTO, L.F.R.; FELZENSZWALB, I. Genética do câncer humano. In: **Mutagênese Ambiental.** Capítulo 2, Ed. Ulbra, Canoas, 2003.

PIPERAKIS, S. M. Comet assay: A brief history. **Cell Biol Toxicol,** v. 25, p. 1-3, 2009.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B.** v. 722, p. 225-254, 1999.

RYDBERG, B.; JOHANSON, K. J. Estimation of single strand break in single mammalian cells in: P. C. Hanawalt, E. C. Friedbers. **DNA Repair Mechanisms**. New York: C. F. Fox, 1978. p. 465.

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

SCHMID, W.; ARAKAKI, D.T.; BRESLAU, N.A.; CULBERTSON, J.C. Chemical mutagenesis. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system, I. Cytogenetic results on basic aspects of the methodology, obtained with alkylating agents. **Humangenetik**. v. 11, p. 103 – 118, 1971.

SINGH, N.P.; McCoy, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. v. 175, p. 184-191, 1988.

SPEIT, G.; HANELT, S.; HELBIG, R.; SEIDEL, A.; HARTMANN, A. detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicology Letters**. v. 88, p. 91 – 98, 1996.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, p. 206-21, 2000.

VALENTIN-SEVERIN, I.; HEGARAT, L.L.; LHUGUENOT, J.C.; BON, A.M.L.; CHAGNON, M.C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**. v.536, p.79-90, 2003.

WILLIAMS, R. B.; HOCH, J.; GLASS, T. E.; EVANS, R.; MILLER, J. S.; WISSE, J. H.; KINGSTON, D. G. A novel cytotoxic guttiferone analogue from *Garcinia macrophylla* from the Suriname rainforest. **Planta Med.** v. 69, p. 864-866, 2003.

WITTE, I.; PLAPPERT, U.; WALL, H.; HARTMANN, A. Genetic Toxicity Assessment: Employing the best science for human evaluation Part III: The Comet Assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicological Sciences**, v. 97, p. 21-26, 2007.

YANG, H.; FIGUEROA, M.; TO, S.; BAGGET, S.; JIANG, B.; BASILE, M.J.; WEINSTEIN, I.B.; KENNELLY, E.J. Benzophenones and Biflavonoids from *Garcinia livingstonei*. **J.Agric.Food.Chem.** v. 58, p. 4749-4755, 2010.

4. ARTIGO

Benzophenone guttiferone A from *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) presents genotoxic effects in different cells of mice.

Peterson Menezes Terrazas¹, Eduardo de Souza Marques¹, Luisa Nathália Bolda Mariano², Valdir Cechinel-Filho², Rivaldo Niero², Sergio Faloni de Andrade² and Edson Luis Maistro^{1*}.

¹Universidade Estadual Paulista – UNESP – Faculdade de Filosofia e Ciências, Departamento de Fonoaudiologia. Marília, SP, Brazil. 17525-900.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, Itajaí, Santa Catarina, Brazil.

***Correspondence to:** E. L. Maistro, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Filosofia e Ciências, Departamento de Fonoaudiologia. Av. Hygino Muzzi Filho, 737, Caixa Postal 181. Marília, SP, Brazil. 17525-900. E-mail address: edson.maistro@marilia.unesp.br
Tel: + 551434021324. Fax: + 551434021302.

Abstract

Benzophenones from natural sources and those of synthetic analogues present several reports of potent biological properties, and Guttiferone A represents a promising medicinal natural compound with analgesic and gastroprotective profiles. Considering that there are no reports that assess the genetic toxicity of Guttiferone A, the present study was undertaken to investigate the genotoxic potential of this benzophenone isolated from seeds of *Garcinia achachairu* in terms of DNA damage in different cells of mice using the comet assay, and its clastogenic/aneugenic effects in bone marrow cells *in vivo* by the micronucleus test. Cytotoxicity was assessed by scoring polychromatic (PCE) and normochromatic (NCE) erythrocytes ratio. Guttiferone A was administered by oral gavage at doses of 15, 30 and 60 mg/kg. The results showed that Guttiferone A produced genotoxic effects in leukocytes, liver, bone marrow, brain and testicle cells and clastogenic/aneugenic effects in bone marrow erythrocytes of mice. The PCE/NCE ratio indicated no cytotoxicity. Since guttiferone A is harmful to the genetic material we suggest caution in its use by humans.

Introduction

The genotoxic assessment of plants and its compounds with possible therapeutic properties is very important because DNA damage induced by mutagens can play a key role in the process of carcinogenesis and inherited genetic diseases.

Plants belonging to the Clusiaceae (or Guttiferae) family are distributed mainly in tropical regions. This family comprises about 40 genera and 1,200 species, the genus *Garcinia* (ex-Rheedia) being the most numerous, with about 400 species widely distributed in tropical Brazil, Polynesia, New Caledonia, Africa, and Asia [1]. *Garcinia achachairu* Rusby belongs to the genus *Garcinia*; which is widely distributed in the region of Santa Cruz, Bolivia and is well-adapted in Brazil, where it is easy to cultivate and harvest. This plant is used in Bolivian folk medicine for its healing, digestive, and laxative properties [2]. In Brazil, it is popularly known as “achachairu” and is used in folk medicine to treat rheumatism, inflammation, pain and gastric disorders [3,4].

Phytochemical characterization of seed extract of *G. achachairu* reveals the presence of benzophenones, xanthenes and bioflavonoids, such as guttiferone N, garcinol, isogarcinol, guttiferone M, camboginol, xanthochymol and guttiferone A, with benzophenone guttiferone A as the major compound [5,6]. Benzophenones are known to exhibit various biological activities, such as cytotoxic, antimicrobial, antiviral and antioxidant activities [7]. Niero et al. [8] reported that extracts obtained from *G. achachairu*, and its major compound guttiferone A, produce gastroprotective effects against induced gastric lesions in mice. The same research group reported that the seed extract of *G. achachairu* and the compound guttiferone A present antinociceptive effects [5].

Although benzophenones from natural sources and those of synthetic analogues present several reports of potent biological properties, and guttiferone A represents a promising

medicinal natural compound with analgesic and gastroprotective profiles, to the best of our knowledge, there are no reports that assess its genetic toxicity. Therefore, the present study was undertaken to investigate the genotoxic effects of the benzophenone guttiferone A in terms of DNA damage in peripheral blood, liver, bone marrow, brain and testicle cells of mice, and its clastogenic/aneugenic potential in bone marrow cells *in vivo*.

Materials and methods

Plant material

Different parts (leaves, seeds and branches) of *G. achachairu* were collected separately in the town of Camboriú, SC, Brazil in March 2007 and identified by Dr. Oscar B. Iza (University of Itajaí Valley). A voucher specimen was deposited at the Barbosa Rodrigues Herbarium (Itajaí, SC, Brazil) under number HBR 52637.

Extraction and isolation

Seeds (250g) of *G. achachairu*, air-dried and powdered, were extracted at room temperature with methanol (2x 1000mL) for seven days. The macerated seeds were filtered and concentrated under reduced pressure, yielding 9.01g (3.6%) of crude methanol seed extract. In view of the higher biological activity exhibited by the methanolic seed extract, this was chromatographed (5.0g) on a silica-gel column (0.063–0.20 mm, 84.0g, 2.5 x 50 cm, Merck, Darmstadt, Germany) and eluted with a solution of CHCl₃:MeOH (starting with 100% of CHCl₃ and ending with 100% of MeOH) yielding 240 fractions. Those fractions that behaved similarly in thin layer chromatography (TLC) were combined, yielding 660 mg of a yellow solid. The compound was identified as guttiferone A (Fig. 1) by TLC and nuclear magnetic resonance (NMR) spectral data in comparison with authentic samples and the literature data [9].

Reagents

The agent doxorubicin (DXR, Oncodox®, Meizler) was used as the DNA damaging agent in the comet assay and micronucleus test using Swiss mice. The other main chemicals were obtained from the following suppliers: normal melting point (NMP) agarose (Cat. No. 15510-019 - Invitrogen), low melting point (LMP) agarose (Cat. No. 15517-014 - Invitrogen), sodium salt *N*-lauroyl sarcosinate (L-5125 - Sigma) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA - Merck).

Animals and dosing

The experiments were carried out using 12-week-old male Swiss albino mice (*Mus musculus*), weighing 25-30 g. The animals were acquired from the Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo State, Brazil, and housed in polyethylene boxes in a climate-controlled environment ($25 \pm 4^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$ humidity) with a 12-h light/dark cycle (7:00 am to 7:00 pm). Food (Nuvilab CR1, Nuvital) and water were available *ad libitum*. The mice were divided into 5 experimental groups of 6 animals each. Guttiferone A was dissolved in 1% Tween 80 aqueous solution and administered in a single dose of 0.3 mL by gavage at concentrations of 15, 30 and 60 mg/kg body weight, chosen on the basis of its gastroprotective effects at 30 mg/Kg [8]. The negative control group received 1% Tween 80 aqueous solution by gavage, and the positive control group received an intraperitoneal injection of doxorubicin (DXR) at 80 mg/kg body weight. The animals used in this study were sacrificed by cervical dislocation without anesthesia to avoid possible alterations in the DNA damage analysis. The Animal Bioethics Committee of the Faculdade de Medicina de Marília (CEP/FAMEMA, Marília, São Paulo state, Brazil) approved the present study on 30 November 2012 (protocol number 1669/12), in accordance with the federal government legislation on animal care.

Comet Assay

The comet assay (SCGE) was carried out by the method described by Speit and Hartmann [10] and reviewed by Burlinson et al. [11]. Peripheral blood samples from the tail vein were obtained from six Swiss mice of each group, at 4 and 24 h after treatment and before euthanasia. After sacrificing the animals, liver cell samples were washed in saline solution, in an ice bath. A small portion (about 4 millimeters in diameter) was transferred to a Petri dish containing 1mL of Hank's solution (pH 7.5) and then homogenized gently with a small pair of tweezers and a syringe to remove any clumps of cells. An aliquot of 20 μ L was removed from the supernatant of each cell type to determine cell viability. Cell counting was performed using a hemocytometer. Cell viability was determined by trypan blue dye exclusion. The number of trypan blue-negative cells was considered as the number of viable cells, and was greater than 90%. Another equal aliquot of cells from each animal was mixed with 120 μ L of 0.5% low melting point agarose at 37°C, and rapidly spread onto two microscope slides per animal, pre-coated with 1.5% normal melting point agarose. The slides were coverslipped and allowed to gel at 4°C for 20 min. The coverslips were gently removed and the slides were then immersed in cold, freshly-prepared lysing solution consisting of 89 mL of a stock solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH set to 10.0 with ~8 g solid NaOH, 890 mL of distilled water and 1% sodium lauryl sarcosine), plus 1 mL of Triton X-100 (Merck) and 10 mL of dimethyl sulfoxide (Merck). The slides, which were protected from light, were allowed to stand at 4°C for 1 h and then placed in the gel box, positioned at the anode end, and left in a high pH (>13) electrophoresis buffer (300 mM NaOH-1 mM EDTA, prepared from a stock solution of 10 N NaOH and 200 mM, pH 10.0, EDTA) at 4°C for 20 min prior to electrophoresis, to allow DNA unwinding. The electrophoresis run was carried out in an ice bath (4°C) for 20 min at 300 mA and 25 V (0.722 V cm^{-1}). The slides were then submerged in a neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) for 15 min, dried at room temperature and fixed in 100% ethanol for 10 min. The

slides were dried and stored overnight or longer, before staining. For the staining process, the slides were briefly rinsed in distilled water, covered with 30 μ L of 1x ethidium bromide staining solution prepared from a 10x stock (200 μ g/ml) and coverslipped. The material was evaluated immediately at 400x magnification, using a fluorescence microscope (Olympus BX 50) with a 515-560 nm excitation filter and a 590 nm barrier filter. Only individual nucleoids were scored.

The extent and distribution of DNA damage indicated by the SCGE assay was evaluated by examining at least 100 randomly selected and non-overlapping cells (50 cells per coded slide) per animal in a blind analysis (six mice per group). These cells were scored visually, according to tail size, into the following four classes: class 0- no tail; class 1- tail shorter than the diameter of the head (nucleus); class 2- tail length 1 to 2 times the diameter of the head; and class 3- tail length more than twice the diameter of the head. Comets with no heads, with nearly all of the DNA in the tail, or with a very wide tail were excluded from the evaluation because they probably represented dead cells [12]. The total score for 100 comets, which ranged from 0 (all undamaged) to 300 (all maximally damaged), was obtained by multiplying the number of cells in each class by the damage class.

***In vivo* Micronucleus test**

The assay was carried out following standard protocols, as recommended by Schmid [13] and Krishna and Hayashi [14]. The same six male mice per group as those used in the comet assay were also used to this protocol. The bone marrow from one femur was flushed out using 2 mL of saline (0.9% NaCl) and centrifuged for 7 min. The supernatant was discarded and smears were made on slides. The slides were coded for a “blind” analysis, fixed with methanol and stained with Giemsa. For the analysis of the micronucleated cells, two thousand polychromatic erythrocytes (PCE) per animal were scored to determine the clastogenic/aneugenic property of the extract. To detect possible cytotoxic effects, the PCE-NCE (normochromatic erythrocytes)

ratio of 200 erythrocytes/animal was calculated [15]. The cells were blindly scored using a light microscope at 1000x magnification. The mean number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in individual mice was used as the experimental unit, with variability (standard deviation) based on differences among animals within the same group.

Results

Table 1 shows the DNA damage in peripheral blood cells, collected 4 and 24 h after the treatment, and liver, bone marrow, brain and testicle cells collected 24 h after guttiferone A treatment, as detected by the single cell gel (comet) assay. Trypan blue staining showed that the cell viability for all the cells was greater than 90 %, confirming the absence of cytotoxicity observed by the PCE-NCE ratio in the micronucleus (MN) test (Table 2), for the three tested doses of the test compound. No deaths, morbidity or distinctive clinical signs were observed in the treated animals following guttiferone A treatment. As expected, when the positive control was compared with the negative control group, we found that DXR induced a significant increase ($P < 0.001$ or greater) in comet assay DNA migration for all the cell types analyzed, indicating the validity of the species selected, and of the study design, to detect genotoxic effects. In all the analyzed cell types, significant increases in DNA damage ($P < 0.05$) were found between the negative control group and experimental groups treated with 15, 30 and 60 mg/Kg doses of guttiferone A. In the peripheral blood samples only, the lesser dose of the test compound did not produce a significant increase in DNA damage. The DNA damage observed did not show a direct dose-response of guttiferone A for the majority of the cell types studied. In the cells with significant DNA damage, most of the damage was minor (class 1), with only a few cells showing a large amount of damage (classes 2 and 3).

The frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) and PCE-NCE ratio in bone marrow cells of mice are presented in Table 2. The number of micronucleated cells increased significantly after treatment with 15, 30 and 60 mg/Kg b.w. of guttiferone A, demonstrating that the compound has effects on these mutagenic endpoints at the doses tested. Also, the MNPCE increase was not directly related to the tested doses. The administration of DXR resulted in a significant increase ($P < 0.001$) in micronucleated cells when compared with the negative control. The estimated ratio of PCE-NCE in 200 bone marrow erythrocytes/animal showed no statistically significant alterations in hematopoiesis as a result of guttiferone A or DXR treatment, indicating no cytotoxic effects (Table 2).

Discussion

Benzophenones are non-polar phenolic compounds, which show increased hydrophobicity as the number of attached prenyl functional groups increases. They are major intermediates in the biosynthetic pathway of xanthenes, and are rarely reported to occur outside the Clusiaceae family [16]. Their potent biological properties have been the subject of several studies [7], and to our knowledge, there are few toxicological studies on natural polyisoprenylated benzophenones. Therefore, the aim of this study was to investigate the possible genotoxicity of benzophenone guttiferone A assessed in acute treatment, using the comet assay and micronucleus test in mice.

The purposes of toxicological genetic are to assess the mutagenicity of chemicals, physical, and biological agents in order to protect the human gene pool, and to identify potential carcinogens. The genotoxicity of environmental factors in mammalian cells can be determined in different ways: by identification of gene mutations, DNA breaks, DNA damage, DNA repair, chromosome aberrations, chromosome breakage and chromosome loss [17]. The *in vivo* alkaline

version of the comet assay (single-cell gel electrophoresis) is increasingly being used in genotoxicity testing. Its advantages include its applicability to various tissues and/or cell types, detecting DNA damage such as strand breaks, alkali-labile sites, DNA-DNA and DNA-protein crosslinks [18]. In the present study, the results of our comet assay showed that the three tested doses of guttiferone A increased the DNA damage in leukocytes, liver, bone marrow, brain and testicle cells of mice, indicating a genotoxic effect of this compound.

The other mutagenicity assay performed in this study was the micronucleus (MN) test. The assay in bone marrow erythrocytes is one of the most widely-used *in vivo* cytogenetic assays in the field of genetic toxicology. MN are expressed in dividing cells that either contain chromosome breaks lacking centromeres (acentric fragments) and/or whole chromosomes that are unable to travel to the spindle poles during mitosis (aneugenic effect) [19,20]. This other endpoint evaluated in the present study showed that guttiferone A produced chromosome breaks and/or aneugenic effects in bone marrow erythrocytes of mice.

Similar results were obtained in the genetic toxicity evaluation of another benzophenone, garcinielliptone [21,22]. The authors observed that this compound produced nuclear fragmentation in breast cancer (MCF-7) cells. According to their findings, garcinielliptone generated reactive oxygen species, which caused the breakage of DNA and cell death. On the other hand, Almanza et al. [23] reported that the benzophenone acuminophenone A, and the xanthenes formoxanthone C and macluraxanthone isolated from *Rheedia acuminata* showed no mutagenicity on several *Salmonella typhimurium* strains. Additionally, the authors also observed that these compounds promoted a strong reduction of mutagenic effect induced by hydrogen peroxide.

Regarding the genetic toxicity assessment of plant extracts belonging to *Garcinia* or *Rheedia* genus, our literature review found only one study, developed by our own research group. The *in vivo* evaluation of a single oral administration of *Garcinia achachairu* seed extract

to mice showed that even high doses of the extract did not cause genotoxicity and clastogenicity in different cells of mice, by the comet and MN assays [6].

Considering that DNA-protective compounds that interact directly with mutagens are classified as desmutagens [24], we can hypothesize that possible chemical interaction processes between the components of this extract may be exerting some desmutagenic effect on guttiferone A, which explains the differences in the genotoxicity results observed between the crude extract and its isolated compound. This finding needs to be investigated in further studies.

In conclusion, the genotoxic assessment performed in the present study demonstrated, for the first time that, that a single oral administration of guttiferone A obtained from the seeds of *Garcinia achachairu* produces genotoxic effects in leukocytes, liver, bone marrow, brain and testicle cells and clastogenic/aneugenic effects in bone marrow erythrocytes of mice. Therefore, despite the fact that guttiferone A represents a promising medicinal natural compound with analgesic and gastroprotective profiles, based on the data obtained in our study, we recommend caution in the acute or chronic use of this compound.

Acknowledgments

This work was supported by FAPESP , Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Grant 2012/17241-8) and Universidade Estadual Paulista, UNESP. P.M. Terrazas thanks CAPES for a Master's scholarship. We thank Larissa Zochio de Souza for her technical assistance.

References

1. Ampofo SA, Waterman PG (1986) Xanthones and neoflavonoids from two Asian species of *Calophyllum*. *Phytochemistry* 25: 2617-2620.
2. Barbosa W, Artiole FA (2007) “A fruta achachairu.” Available at: http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/achachairu/index.htm (Accessed 18 April 2013).
3. Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EF, Zani CL (2000) Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 367-373.
4. Barbosa W, Chagas EA, Martins L, Pio R, Tucci ML, Artioli FA (2008) Germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de achachairu. *Rev Bras Frutic* 30: 263-266.
5. Molin MMD, Silva S, Alves DR, Quintao NLM, Monache FD, Cechinel-Filho V, Niero R (2012) Phytochemical analysis analysis and antinociceptive properties of *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) seeds. *Arch Pharmacol Res* 35: 623-631.
6. Marques ES, Silva S, Niero R, Andrade SF, Rosa PCP, Perazzo FF, Maistro EL (2012) Genotoxicity assessment of *Garciniaachachairu*Rusby (Clusiaceae) extract in mammalian cells *in vivo*. *J Ethnopharmacol* 142: 362-366.
7. Acuña UM, Jancovski N, Kennelly EJ (2009) Polyisoprenylated benzophenones from Clusiaceae: potential drugs and lead compounds. *Cur Top Med Chem* 9: 1560-1580.
8. Niero R, Dal Molin MM, Silva S, Damian NS, Maia LO, Deile Monache F, Cechinel Filho V, Andrade, SF (2012) Gastroprotective effects of extracts and guttiferone A isolated from *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) against experimentally induced gastric lesions in mice. *NaunynSchmiedebergs Arch Pharmacol* 385(11): 1103-1109.
9. Dal-Molin MM, Silva S, Alves DR, Quintão NLM, Delle Monache F, Cechinel-Filho V, Niero R (2012) Phytochemical analysis and antinociceptive properties of *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) seeds. *Arch Pharm Res* 35: 623-631.

10. Speit G, Hartmann A (1999) The comet assay (single-cell gel test), in: Henderson, D.S. (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 113, DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 203-212.
11. Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A (2007) Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the *in vivo* comet assay workgroup. *Mutat Res* 627: 31-35.
12. Hartmann A, Speit G (1997). The contribution of cytotoxicity to DNA - effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett* 90: 183-188.
13. Schmid, W., 1976. The micronucleus test. *Mutation Research* 31, 9-15.
14. Krishna G, Hayashi M (2000) *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res* 455: 155-166.
15. Gollapudi BB, McFadden LG (1995) Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutat Res* 347: 97-99.
16. Beerhues L (1996) Benzophenone synthase from cultured cells of *Centaureum erythraea*. *FEBS Lett* 383: 264-266.
17. ICH (1997) Genotoxicity, A standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals Guideline S2B. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
18. Smith CC, Adkins DJ, Martin EA, O'Donovan R (2008) Recommendations for design of the rat comet assay. *Mutagenesis* 23: 233-240.
19. MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, Margolin BH, Ramel C, Salamone MF, Tice RR, Wild D (1987) Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res* 189: 103-112.

20. Fenech M (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res* 455: 81-95.
21. Wu CC, Weng JR, Won SJ, Lin CN (2005) Constituents of the pericarp of *Garcinia subelliptica*. *J Nat Prod* 68: 1125-1127.
22. Wu CC, Lu YH, Wei BL, Yang SC, Won SJ, Lin CN (2008) Phloroglucinols with prooxidant activity from *Garcinia subelliptica*. *J Nat Prod* 71: 246-250.
23. Almanza GR, Quispe R, Mollinedo P, Rodrigo G, Fukushima O, Villagomez R, Akesson B, Sterner O (2011) Antioxidant and antimutagenic polyisoprenylated benzophenones and xanthenes from *Rheedia acuminata*. *Nat prod Commun* 6: 1269-1274.
24. Kada T, Ivbone T, Namiki N (1982) Environmental desmutagens and antimutagens. In *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, Klekowschi EJ (ed.), Praeger: New York; 137-151.

Fig. 1. Molecular structure of guttiferone A isolated from *G. achachairu* (DAL MOLIN *et al.*,2012)

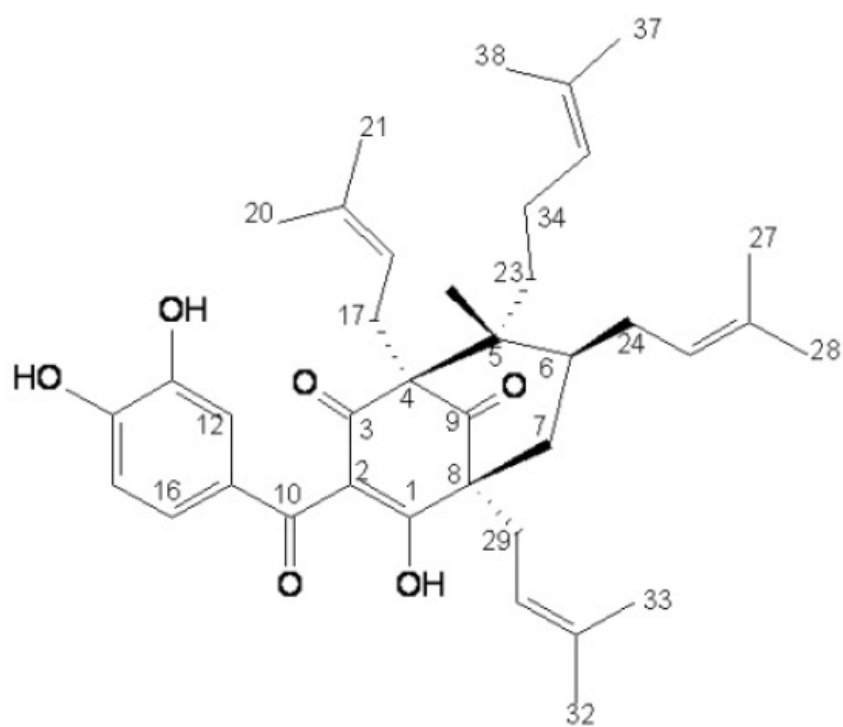


Table 1. DNA migration in the comet assay for assessing the genotoxicity of Guttiferone A (GA) in different cells of male Swiss mice *in vivo*. (Mean \pm SD).

Treatments and cells analyzed	Total ¹	Comet class				Scores
		0	1	2	3	
Peripheral blood (4h sample)						
Control	7.00 \pm 2.16	93.0 \pm 2.16	5.33 \pm 1.49	1.66 \pm 0.94	0.00 \pm 0.00	8.66 \pm 2.98
GA15 mg/kg	8.83 \pm 3.02	91.1 \pm 3.02	8.50 \pm 2.75	0.33 \pm 0.74	0.00 \pm 0.00	9.16 \pm 3.43
GA 30 mg/kg	37.0 \pm 5.88 ^c	63.0 \pm 5.88 ^c	34.0 \pm 6.11 ^c	3.00 \pm 1.82	0.00 \pm 0.00	40.0 \pm 6.21 ^c
GA60 mg/kg	29.3 \pm 4.06 ^c	70.6 \pm 4.06 ^c	26.6 \pm 3.34 ^c	2.66 \pm 1.49	0.00 \pm 0.00	32.0 \pm 5.13 ^c
Doxorubicin 80 mg/kg	35.3 \pm 5.76 ^c	63.0 \pm 4.00 ^c	29.6 \pm 4.92 ^c	5.33 \pm 2.89	0.33 \pm 0.47	41.3 \pm 8.05 ^c
Peripheral blood (24h sample)						
Control	9.33 \pm 1.97	90.6 \pm 1.97	6.66 \pm 1.49	2.66 \pm 0.74	0.00 \pm 0.00	12.0 \pm 2.58
GA15 mg/kg	13.0 \pm 3.26	87.0 \pm 3.26	10.6 \pm 2.80	2.33 \pm 1.24	0.00 \pm 0.00	15.3 \pm 4.06
GA 30 mg/kg	17.8 \pm 5.01 ^a	82.1 \pm 5.01 ^a	16.1 \pm 4.98 ^b	1.66 \pm 4.98	0.00 \pm 0.00	19.5 \pm 5.15
GA60 mg/kg	24.0 \pm 3.60 ^c	76.0 \pm 3.60 ^c	22.3 \pm 2.98 ^c	1.66 \pm 1.24	0.00 \pm 0.00	25.6 \pm 4.49 ^a
Doxorubicin 80 mg/kg	68.5 \pm 5.79 ^c	31.5 \pm 5.79 ^c	47.1 \pm 6.14 ^c	16.1 \pm 4.29 ^c	5.16 \pm 3.07 ^c	95.0 \pm 14.0 ^c
Liver						
Control	12.8 \pm 3.02	87.1 \pm 3.02	12.8 \pm 3.02	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	12.8 \pm 3.02
GA15 mg/kg	35.0 \pm 5.62 ^c	65.0 \pm 5.62 ^c	31.5 \pm 4.64 ^c	3.50 \pm 1.25 ^b	0.00 \pm 0.00	38.5 \pm 6.70 ^c
GA 30 mg/kg	35.6 \pm 4.88 ^c	64.3 \pm 4.88 ^c	31.6 \pm 3.49 ^c	4.00 \pm 1.63 ^c	0.00 \pm 0.00	39.6 \pm 6.39 ^c
GA60 mg/kg	45.8 \pm 3.18 ^c	54.1 \pm 3.18 ^c	40.8 \pm 2.03 ^c	5.00 \pm 1.52 ^c	0.00 \pm 0.00	50.8 \pm 4.56 ^c
Doxorubicin 80 mg/kg	39.6 \pm 4.71 ^c	60.3 \pm 4.71 ^c	35.5 \pm 4.07 ^c	4.16 \pm 1.46 ^c	0.00 \pm 0.00	43.8 \pm 5.66 ^c
Bone marrow						
Control	8.50 \pm 2.75	91.5 \pm 2.75	8.50 \pm 2.75	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	8.50 \pm 2.75
GA 15 mg/kg	30.8 \pm 5.14 ^c	69.1 \pm 5.14 ^c	26.8 \pm 5.98 ^c	4.00 \pm 1.29 ^a	0.00 \pm 0.00	34.8 \pm 4.52 ^c
GA 30 mg/kg	17.6 \pm 4.42 ^a	82.3 \pm 4.42 ^a	14.0 \pm 4.72	3.66 \pm 1.37 ^a	0.00 \pm 0.00	21.3 \pm 4.53 ^b
GA60 mg/kg	19.6 \pm 2.19 ^b	80.3 \pm 3.19 ^b	14.1 \pm 1.57	5.50 \pm 2.21 ^c	0.00 \pm 0.00	25.1 \pm 5.27 ^c
Doxorubicin 80 mg/kg	36.0 \pm 5.44 ^c	64.0 \pm 5.44 ^c	28.6 \pm 3.09 ^c	7.00 \pm 2.82 ^c	0.33 \pm 0.47	43.6 \pm 8.65 ^c
Brain						
Control	10.0 \pm 1.29	90.0 \pm 1.29	10.0 \pm 1.29	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	10.0 \pm 1.29
GA 15 mg/kg	37.0 \pm 3.26 ^c	63.0 \pm 3.26 ^c	34.3 \pm 3.54 ^c	2.66 \pm 0.94 ^b	0.00 \pm 0.00	39.6 \pm 3.24 ^c
GA 30 mg/kg	39.1 \pm 4.52 ^c	60.8 \pm 4.52 ^c	36.8 \pm 4.77 ^c	2.33 \pm 0.74 ^b	0.00 \pm 0.00	41.5 \pm 4.38 ^c
GA60 mg/kg	37.3 \pm 2.56 ^c	62.6 \pm 2.56 ^c	35.1 \pm 2.91 ^c	2.16 \pm 1.46 ^a	0.00 \pm 0.00	39.5 \pm 2.98 ^c
Doxorubicin 80 mg/kg	40.5 \pm 2.36 ^c	59.5 \pm 2.36 ^c	35.5 \pm 1.89 ^c	5.00 \pm 1.15 ^c	0.00 \pm 0.00	45.5 \pm 3.20 ^c
Testicle						
Control	8.33 \pm 2.74	91.6 \pm 2.74	8.33 \pm 2.74	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	8.33 \pm 2.74
GA 15 mg/kg	28.8 \pm 3.89 ^c	71.1 \pm 3.89 ^c	28.8 \pm 3.89 ^c	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	28.8 \pm 3.89 ^c
GA 30 mg/kg	30.8 \pm 3.53 ^c	69.1 \pm 3.53 ^c	30.8 \pm 3.53 ^c	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	30.8 \pm 3.53 ^c
GA60 mg/kg	33.8 \pm 3.43 ^c	66.1 \pm 3.43 ^c	33.8 \pm 3.43 ^c	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	33.8 \pm 3.43 ^c
Doxorubicin 80 mg/kg	45.3 \pm 2.92 ^c	54.6 \pm 2.92 ^c	40.6 \pm 2.49 ^c	4.66 \pm 1.24 ^c	0.00 \pm 0.00	50.0 \pm 3.74 ^c

^a Significantly different from the negative control (P < 0.05); ^b Significantly different from the negative control (P < 0.01); ^c Significantly different from the negative control (P < 0.001); ¹Total number of damaged cells (class 1+2+3).

Table 2. Number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) observed in the bone marrow cells of male Swiss mice (M_{1-6}) treated with Guttiferone A (GA), and respective controls. Two thousand cells were analyzed. SD = standard deviation from the mean.

Treatments	Number of MNPCE per Animal						MNPCE (Mean \pm SD)	PCE/NCE (Mean \pm SD)
	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5	M_6		
Control	3	1	2	3	2	2	2.16 \pm 0.68	1.15 \pm 0.04
GA (15 mg/kg)	4	4	5	6	6	5	5.00 \pm 0.81 ^a	1.19 \pm 0.06
GA (30 mg/kg)	6	6	5	4	5	5	5.16 \pm 0.68 ^a	1.25 \pm 0.08
GA (60 mg/kg)	7	5	6	5	6	5	5.66 \pm 0.74 ^a	1.23 \pm 0.03
Doxorubicin (DXR) (80 mg/kg)	10	11	11	12	10	11	10.83 \pm 0.68 ^a	1.18 \pm 0.02

^a Significantly different from the negative control ($P < 0.001$).

5. ANEXOS

Anexo 1.

Parecer do comitê de ética experimental da Faculdade de Medicina de Marília, SP



SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO,
CIÊNCIA E TECNOLOGIA

FACULDADE DE MEDICINA DE MARÍLIA
Comissão de Ética no Uso de Animais

Marília, 31 de Janeiro de 2013

Ilmo^(a) Sr.^(a)
Prof. Dr. Edson Luis Maistro
Marília/SP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Marília/CEUA-FAMEMA, recebeu o Protocolo de Estudo nº 1669/12, intitulado: "Estudo do Potencial Genotóxico e Antigenotóxico da Gutíferona A em Diferentes Células de Camundongos in vivo", foi considerado **APROVADO "Ad Referendum"** após responder as pendências apontadas em Reunião Ordinária – 30/11/2012, de acordo com a Resolução Normativa – Comissões de Ética no Uso de Animais/CEUAS nº 01 de 09/07/2010.

Sendo só para o momento, reiteramos protestos de consideração e apreço.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FAMEMA

Anexo 2.

Carta de submissão do artigo: **Benzophenone guttiferone A from *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) presents genotoxic effects in different cells of mice. PLOS ONE**

----- Mensagem encaminhada -----

De: "PLOS ONE" <plosone@plos.org>

Para: "Edson Maistro" <edson.maistro@marilia.unesp.br>

Enviadas: Terça-feira, 25 de Junho de 2013 6:35:27

Assunto: PLOS ONE: A manuscript number has been assigned to Benzophenone guttiferone A from *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) presents genotoxic effects in different cells of mice.

Dear Dr. Maistro,

On Jun 20 2013 07:40AM, we received your Research Article entitled "Benzophenone guttiferone A from *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) presents genotoxic effects in different cells of mice." by Peterson Menezes Terrazas; Eduardo Souza Marques; Luisa Nathalia Mariano; Valdir Cechinel-Filho; Rivaldo Niero; Sergio Faloni Andrade; Edson Maistro, Ph.D..

Your manuscript has been assigned the manuscript number: PONE-D-13-25679.

We will keep you informed about the progress of your manuscript or you can check the status by logging into your account.

Please be aware that you will NOT be required to complete the 'Open-Access Agreement' field until your manuscript is accepted for publication. You may also be asked to provide your article and figure files in a different format at this time (please see the 'Format Requirements' section of the Manuscript Guidelines for more information: <http://www.plosone.org/static/guidelines.action#format>)

Please visit everyONE (<http://blogs.plos.org/everyone>), the PLOS ONE community blog for authors who have published with us (as well as our readers), where you will be able to find out what the journal is thinking, changing and doing.

Thank you for submitting to PLOS ONE.

If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript, please contact plosone@plos.org.

Thank you for choosing PLOS ONE.

Best wishes,

PLOS ONE