



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

DANIELE AGUSTONI

**Avaliação da Capacidade de Quimioprevenção de *Eugenia*
jambolana em linhagem de hepatocarcinoma celular
(HepG2 e Hepa 1c1c7)**

ARARAQUARA-SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

DANIELE AGUSTONI

Avaliação da Capacidade de Quimioprevenção de *Eugenia jambolana* em linhagem de hepatocarcinoma celular (HepG2 e Hepa 1c1c7)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Universidade Estadual Paulista - UNESP, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Citologia Clínica de Biologia Celular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Christiane Pienna Soares

ARARAQUARA-SP

2012

Ficha Catalográfica

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

Agustoni, Daniele

A282a Avaliação da capacidade de quimioprevenção de *Eugenia jambolana* em linhagem de hepatocarcinoma celular (HepG2 Hepa1c1c7) / Daniele Agustoni. – Araraquara, 2012
116 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: Christiane Pienna Soares

1. *Eugenia jambolana*. 2. Quimioprevenção. 3. Genotoxicidade.
4. Mutagenicidade. 5. Antigenotoxicidade. 6. Antimutagenicidade.
7. Citotoxicidade. I. Soares, Christiane Pienna, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

TERMO DE APROVAÇÃO

NOME DA AUTORA: Daniele Agustoni

TÍTULO DO TRABALHO: “Avaliação da Capacidade de Quimioprevenção de *Eugenia jambolana* em linhagem de hepatocarcinoma celular (HepG2 e Hepa 1c1c7)”.

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

PRESIDENTE E ORIENTADORA: Dr^a. Christiane Pienna Soares

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Araraquara

SEGUNDO EXAMINADOR: Dr^a. Denise Crispim Tavares

INSTITUIÇÃO: Universidade de Franca

TERCEIRO EXAMINADOR: Dr^a. Dulce Helena Siqueira da Silva

INSTITUIÇÃO: Instituto de Química, UNESP - Araraquara

QUARTO EXAMINADOR: Dr^a Raquel Alves dos Santos

INSTITUIÇÃO: Universidade de Franca

QUINTO EXAMINADOR: Dr. André Gonzaga dos Santos

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP - Araraquara

Araraquara, 18 de Maio de 2012

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citologia Clínica e Biologia Celular do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara com auxílio de bolsa CAPES e FAPESP (financiamento do projeto, processo n° 09/52716-4).

Dedico este Trabalho

Aos meus pais Geraldo e Lúcia que me auxiliaram com dedicação para a realização dessa pesquisa, por toda compreensão, apoio, incentivo e paciência, por terem lutado para eu chegar à universidade e por estarem sempre comigo... Agradeço por esta mais nova conquista!

À minha irmã e verdadeira amiga Ana Cláudia, pelo carinho e companhia em todas as etapas desta caminhada.

Ao meu namorado e amigo Mauricio, por todo amor, ajuda, paciência, compreensão e respeito...

Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Agradecimentos

Meu sincero reconhecimento:

À Deus, primeiramente, pela vida, pelas bênçãos e proteção.

À Prof^a Dra. Christiane Pienna Soares pela confiança durante a realização deste trabalho e ainda, pelo seu apoio e ensinamento.

Ao Instituto de Química - UNESP e a professora Dra. Dulce Helena Siqueira Silva, e sua aluna Alessandra C. Dametto, pela contribuição direta e essencial para o desenvolvimento desse estudo.

Agradeço aos professores membros da banca de qualificação e defesa Dra. Denise Crispim Tavares, Dra. Raquel Alves dos Santos, Dra. Ticiane S. de Oliveira Capote, Dra. Dulce Helena Siqueira Silva e Dr. André Gonzaga dos Santos, que gentilmente aceitaram o convite de ler este manuscrito, pela contribuição e tempo desprendido...

Ao Laboratório de Citologia Clínica e Biologia Celular, agradeço pela amizade e companheirismo à Elaine, Thais, Tarsia, Juliana, Letícia, Leda, Felipe, Rochane, Bárbara, Flávio, Mauro, Aline e Maria Isabel. À nova geração da Citologia com a Prof^a Dra. Valéria, Rodolfo, Bruna e Luis...

À Belzinha, Gabrielle e Eloísa, pela amizade, compreensão...

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.

Enfim, agradeço a todos da minha família, todos os amigos, que contribuíram, acreditaram e participaram desse trabalho, seja diretamente ou indiretamente.

Muito Obrigada!

Sumário

Capítulo I.....	17
Introdução	18
1.1. Produtos naturais e quimioprevenção.....	21
1.2. <i>Eugenia jambolana</i> (Myrtaceae).....	25
1.3. Genotoxicidade/Antigenotoxicidade e Mutagenicidade/Antimutagenicidade.....	28
1.3.1. Ensaio cometa ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE).....	30
1.3.2. Ensaio do micronúcleo.....	31
2. Objetivos.....	34
2.1. Objetivo Geral.....	35
2.2. Objetivos Específicos.....	35
3. Materiais e Métodos	36
3.1. Estudo químico de <i>Eugenia jambolana</i>	37
3.2. Manutenção das linhagens.....	39
3.3. Ensaio da quinona-redutase.....	41
3.3.1. Reagentes.....	41
3.3.2. Quantificação da atividade da quinona-redutase.....	41
3.4. Ensaio de citotoxicidade (Sulforrodamina B).....	42
3.4.1. Avaliação da citotoxicidade.....	42
3.5. Ensaio do Cometa.....	44
3.5.1. Soluções para o ensaio do Cometa.....	44
3.5.2. Avaliação de Genotoxicidade.....	45
3.5.3. Avaliação de Antigenotoxicidade.....	47
3.6. Teste do Micronúcleo.....	30
3.6.1. Soluções para o teste do Micronúcleo.....	30
3.6.2. Avaliação da Mutagenicidade.....	49
3.6.3. Avaliação da Antimutagenicidade.....	51
3.7. Análise Estatística.....	52
4. Resultados	53
4.1. Atividade da Quinona-redutase.....	54
4.2. Avaliação da Citotoxicidade.....	60
4.3. Avaliação da Genotoxicidade.....	61
4.4. Avaliação da Antigenotoxicidade.....	65
4.5. Avaliação da Mutagenicidade.....	69
4.6. Avaliação da Antimutagenicidade.....	72
5. Discussão	77
6. Conclusão	92
7. Referências bibliográficas.....	94
Capítulo II.....	103
Artigo Científico.....	104

Lista de Tabelas

Tabela 1: Atividade da enzima quinona-redutase através de frações das folhas e dos frutos de <i>Eugenia jambolana</i> em linhagem de células Hepa1c1c7.....	59
Tabela 2: Determinação da viabilidade celular dos extratos e frações das folhas e dos frutos de <i>E. jambolana</i> , em linhagem de células HepG2, por meio da técnica de SRB.....	61
Tabela 3. Avaliação da genotoxicidade do extrato bruto das folhas de <i>Eugenia jambolana</i>	63
Tabela 4. Avaliação da genotoxicidade da fração n-butanólica das folhas de <i>Eugenia jambolana</i>	63
Tabela 5. Avaliação da genotoxicidade do extrato bruto dos frutos de <i>Eugenia jambolana</i>	64
Tabela 6. Avaliação da genotoxicidade da fração hidroalcoólica dos frutos de <i>Eugenia jambolana</i>	65
Tabela 7. Avaliação da antígenotoxicidade do extrato bruto das folhas de <i>Eugenia jambolana</i>	66
Tabela 8. Avaliação da antígenotoxicidade da fração n-butanólica das folhas de <i>Eugenia jambolana</i>	67
Tabela 9. Avaliação da antígenotoxicidade do extrato bruto dos frutos de <i>Eugenia jambolana</i>	68
Tabela 10. Avaliação da antígenotoxicidade da fração hidroalcoólica dos frutos de <i>Eugenia jambolana</i>	68
Tabela 11. Avaliação da mutagenicidade do extrato bruto das folhas de <i>Eugenia jambolana</i>	69
Tabela 12. Avaliação da mutagenicidade da fração n-butanólica das folhas de <i>Eugenia jambolana</i>	70
Tabela 13. Avaliação da mutagenicidade do extrato bruto dos frutos de <i>Eugenia jambolana</i>	71
Tabela 14. Avaliação da mutagenicidade da fração hidroalcoólica dos frutos de <i>Eugenia jambolana</i>	71
Tabela 15. Avaliação da antimutagenicidade do extrato bruto das folhas de <i>Eugenia jambolana</i>	73

Tabela 16. Avaliação da antimutagenicidade da fração n-butanólica das folhas de <i>Eugenia jambolana</i>	74
Tabela 17. Avaliação da antimutagenicidade do extrato bruto dos frutos de <i>Eugenia jambolana</i>	75
Tabela 18. Avaliação da antimutagenicidade da fração hidroalcoólica dos frutos de <i>Eugenia jambolana</i>	76

Lista de Figura

Figura 1. Estágios da carcinogênese.....	22
Figura 2. Ativação do elemento de resposta antioxidante pela via Keap1-Nrf2	23
Figura 3. Princípio do ensaio da quinona-redutase	24
Figura 4. Árvore, folhas e frutos de <i>Eugenia jambolana</i>	27
Figura 5. Estrutura de uma antocianina.....	28
Figura 6. Imagens representativas do ensaio do cometa. Controle positivo (A), controle negativo (B), pré-tratamento com extrato bruto isolado do fruto de <i>E. jambolana</i> , (C) e pós-tratamento com extrato bruto isolado do fruto de <i>E. jambolana</i> (D).....	49
Figura 7. Indução da enzima quinona-redutase através do Extrato bruto da folha.	55
Figura 8. Indução da enzima quinona-redutase através do Extrato bruto do fruto.....	56
Figura 9. Indução da enzima quinona-redutase através da Fração n-butanólica da folha ...	57
Figura 10. Indução da enzima quinona-redutase através da Fração hidroalcoólica do fruto.	58

Lista de Fluxograma

Fluxograma 1: Metodologia de partição líquido-líquido para o extrato dos frutos de <i>E. jambolana</i>	38
Fluxograma 2: Metodologia de partição líquido-líquido para o extrato das folhas de <i>E. jambolana</i>	39

Lista de Abreviaturas e Siglas

- % - Por Cento
- °C – Graus Celsius
- µg – Micrograma
- µL – Microlitro
- µM – Micromolar
- AC-Fo – Fração Acetato da Folha
- AC-Fr – Fração Acetato do Fruto
- AhR – Receptor de Aril-hidrocarbonetos
- ANOVA – Análise de Variância
- ARE – Elemento de Resposta Antoxidante
- ATCC – American Type Culture Collection
- ATV – Associação de Tripsina e Versene
- BNF – Beta-Naftoflavona
- BU-Fo – Fração n-Butanólica da Folha
- BU-Fr – Fração n-Butanólica do Fruto
- CI₂₀– Concentração Inibitória para 20% de células
- CN – Controle Negativo
- CP – Controle Positivo
- DMEM – Dulbecco's Modification of Eagle Medium
- DMSO – Dimetilsufóxido
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- EB-Fo – Extrato Bruto da Folha
- EB-Fr – Extrato Bruto do Fruto
- EP – Erro Padrão
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- FMN – Frequência de Micronúcleo
- g – Grama
- G6PDH – Enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase
- HA-Fo – Fração Hidroalcoólica da Folha
- HA-Fr – Fração Hidroalcoólica do Fruto
- HEX-Fo – Fração Hexânica da Folha
- HIV – Human Immunodeficiency Virus

HPA – Hidrocarboneto Poliaromático
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
IDN – Índice de Divisão Nuclear
L – Litro
LMP – Low Melting Point
M – Molar
mg - Miligrama
mL – Mililitros
mm – Milímetros
mM – Milimolar
MN – Micronúcleo
MTT – Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-defeniltetrazólio
NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido Oxidase
nm – Nanômetro
OECD – Organization for Economic Co-Operation and Development
PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato
pH – Potencial Hidrogeniônico
QR – Quinona-Redutase
rpm – Rotações por minuto
SCGE – Single Cell Gel Electrophoresis
SFB – Soro Fetal Bovino
SRB – Sulforrodamina B
TCA – Ácido Tricloroacético
U – Unidade
VC – Violeta Cristal
 α – Alfa
 α -MEM – Alfa Modification of Eagle Medium
 β – Beta

RESUMO

A variabilidade das regiões geográficas brasileiras favorece o desenvolvimento de diferentes espécies vegetais, o que estimula o estudo na busca de novos agentes bioativos. A quimioprevenção envolve o uso de substâncias naturais ou sintéticas a fim de prevenir, retardar ou reverter o desenvolvimento do câncer e a espécie escolhida para investigação de seu possível efeito quimiopreventivo é a *Eugenia jambolana* pertencente à família Myrtaceae, seu perfil químico revela a presença de antocianinas e substâncias fenólicas com potencial efeito antioxidante, antiinflamatório e analgésico. O presente estudo tem por objetivo realizar o rastreamento bioguiado para atividade de quimioprevenção em extratos e frações das folhas e dos frutos de *Eugenia jambolana* como parte da bioprospecção de produtos naturais. Até o momento não existem estudos sobre a capacidade de quimioprevenção dessa espécie vegetal. No presente estudo foi avaliada a indução da enzima quinona-redutase em células de hepatocarcinoma murino selvagem (Hepa 1c1c7) e mutantes (TAOr1BPr1 e BPr1), a citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) competentes para metabolização de xenobióticos. Experimentos esses realizados através do ensaio da Quinona-redutase, coloração por sulforrodamina B, ensaio do cometa e teste do micronúcleo. Os resultados demonstraram que o extrato bruto e a fração n-butanólica das folhas, e o extrato bruto e a fração hidroalcoólica dos frutos de *E. jambolana* são capazes de promover significativamente a indução da enzima quinona-redutase em diferentes concentrações, de 1,25 a 40 µg/mL. Porém nessas condições esses extratos e frações foram potencialmente genotóxico. Em menores concentrações esses extratos e frações não foram genotóxicos nem mutagênicos. Os ensaios de antigenotoxicidade e antimutagenicidade foram realizados a partir de concentrações não genotóxicas estabelecidas no ensaio do cometa, através do protocolo de genotoxicidade. Os resultados de antigenotoxicidade demonstraram que no pós-tratamento os extratos e frações foram capazes de atenuar o dano induzido pelo mutágeno, peróxido de hidrogênio. Sendo que os extratos e frações dos frutos foram capazes de reduzir de maneira mais acentuada o dano induzido pelo mutágeno. Na avaliação da antimutagenicidade, os extratos e frações foram capazes de reduzir significativamente a frequência de micronúcleos em relação ao controle positivo, tanto no pré-tratamento quanto no pós- tratamento. Os extratos e frações de *E. jambolana* demonstraram-se promissores, uma vez que em concentrações não genotóxicas, são capazes reverter danos induzidos ao DNA, balanço esse essencial para sua aplicabilidade com agente quimiopreventivo.

Palavras-chave: *Eugenia jambolana*, quimioprevenção, genotoxicidade, mutagenicidade, antigenotoxicidade, antimutagenicidade, citotoxicidade.

ABSTRACT

The variability of geographical regions favors the development of different plant species, which encourages the study in the search for new bioactive agents. The chemoprevention involves the use of natural or synthetic substances to prevent, retard or reverse the developing cancer and the species chosen for investigation of their possible chemopreventive effect was *Eugenia jambolana* belonging to the Myrtaceae family, chemical profile reveals the presence of anthocyanins and phenolic compounds with potential antioxidant, anti-inflammatory and analgesic effect. This study aims to perform a screening chemoprevention activity in extracts and fractions from leaves and fruits of *Eugenia jambolana* as part of bioprospecting of natural products. So far there are no studies on the ability of chemoprevention of plant species. The present study evaluated the induction of quinone-reductase in wild murine hepatoma cell line (Hepa 1c1c7) and mutant murine hepatoma cell line (TAOr1BPr1 and BPr1), cytotoxicity, genotoxicity, antigenotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity in human hepatoma cell line (HepG2) responsible for metabolizing xenobiotics. The experiments were performed by quinone-reductase assay, staining sulforodamina B, comet assay and micronucleus test. The results showed that the crude extract and the n-butanol fraction from the leaves, and the crude extract and hydroalcoholic fraction from the fruits of *E. jambolana* were able to significantly promote the induction of quinone-reductase in different concentrations from 1.25 to 40 µg/ mL. But under these conditions these compounds were potentially genotoxic. In lower concentrations these compounds were not genotoxic or mutagenic. The antigenotoxicity and antimutagenicity assays were performed from non-genotoxic concentrations established in the comet assay, using the protocol for genotoxicity. The antigenotoxicity results showed that the post-treatment of the extracts and fractions were able to mitigate the damage induced by mutagen, hydrogen peroxide. The compounds from fruits were able to reduce the more strongly the damage induced by mutagenic. In assessing the antimutagenicity, extracts and fractions were able to significantly reduce the frequency of micronucleus in relation to the positive control in both pre-treatment and post-treatment. The extracts and fractions of *E. jambolana* showed to be promising, since in non-genotoxic concentrations, they were able to reverse induced damage to DNA, an essential balance for its applicability as chemoprevention agent.

Keywords: *Eugenia jambolana*, chemoprevention, genotoxicity, mutagenicity, antigenotoxicity, antimutagenicity, cytotoxicity.

CAPÍTULO I

1. Introdução

O Brasil possui uma exuberante vegetação, considerada a mais rica e estimada em cerca de 20% da biodiversidade do mundo. Essa grande biodiversidade se distribui em diferentes regiões como a Mata Atlântica, a Amazônia, e o Cerrado. O Cerrado compreende 25% do território brasileiro sendo típico de regiões tropicais, apresenta duas estações climáticas bem marcadas (inverno seco e verão chuvoso), possui solo de savana tropical que se caracteriza pela baixa fertilidade, que condicionam o desenvolvimento de um tipo peculiar de vegetação (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997). A diversidade de espécies presentes nesse ecossistema permite a realização de estudos especializados na procura de novas drogas para diferentes doenças.

Uma das mais antigas formas de prática medicinal é a utilização de plantas com fins medicinais, para a prevenção ou tratamento de doenças. A Organização Mundial de Saúde (OMS), no início da década de 1990, divulgou que 65-80% da população de países em desenvolvimento utilizavam plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; SILVA *et al.*, 2008).

Porém no Brasil, as plantas medicinais são consumidas com pouco ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e existem evidências que relatam que determinadas plantas medicinais apresentam substâncias potencialmente perigosas. Além disso, os efeitos adversos, as possíveis adulterações e toxicidade dos fitomedicamentos ocorrem comumente. (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Diante dessa realidade os estudos toxicológicos e farmacológicos tornaram-se indispensáveis para comprovar cientificamente a eficácia terapêutica desses produtos, associado à proteção da saúde da população.

Considerando a biodiversidade brasileira e a pequena quantidade de plantas que são avaliadas em relação ao seu potencial toxicológico, farmacológico e fitoquímico, o

reino vegetal apresenta um enorme reservatório de substâncias farmacologicamente ativas a serem descobertas (HAMBURGUER; MARSTON; HOSTETTMANN, 1991; POTTERAT *et al.*, 1995; NOGUEIRA; CERQUEIRA; SOARES, 2010).

1.1. Produtos naturais e quimioprevenção

A quimioprevenção do câncer pode ser definida como a utilização de compostos naturais ou sintéticos, com a finalidade de prevenir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese (WATTENBERG, 1985; MORSE; STONER, 1993; KELLOFF *et al.*, 1994; SPORN; SUH, 2000; PEZZUTO *et al.*, 2005).

A carcinogênese ou processo de formação do tumor envolve três diferentes estágios. O primeiro estágio ou estágio de iniciação é caracterizado pela exposição das células a agentes cancerígenos, promovendo alterações em alguns de seus genes, porém ainda não há a formação do tumor. No segundo estágio ou estágio de promoção as células geneticamente alteradas, sofrem o efeito dos agentes cancerígenos (oncopromotores), nesse momento a célula é transformada de uma forma lenta e gradual em uma célula maligna. Mas essa transformação só ocorre a partir de um contato contínuo com o agente promotor, caso ocorra à suspensão do contato é possível interromper o processo nesse estágio. E o terceiro estágio ou estágio de progressão é um processo irreversível, caracterizado pela elevada capacidade proliferativa e em algumas situações pode ser, respectivamente, invasiva e potencialmente metastática das células modificadas (INCA, 2011).

Os avanços recentes das pesquisas sobre câncer definiram os eventos celulares e moleculares associados com a carcinogênese como evidências crescentes de dados experimentais, epidemiológicos e clínicos que fornecem as bases para estratégias relativamente novas de prevenção do câncer, especialmente a supressão de vias metabólicas de ativação de carcinógenos ou o bloqueio de sua formação (CUENDET *et al.*, 2006). De maneira geral, essa prevenção ocorre a partir de agentes quimiopreventivos que atuam de acordo com determinado estágio da carcinogênese, sendo classificados em agentes supressores ou bloqueadores. Os agentes bloqueadores

atuam prevenindo a fase inicial por meio de alguns mecanismos, tais como a indução de enzimas de destoxificação, ou a inibição da iniciação carcinogênica. Os agentes supressores atuam através de mecanismos de inibição do metabolismo do ácido araquidônico, indução da diferenciação celular, entre outros, nos estágios de promoção e progressão durante a carcinogênese (figura 1) (WATTEENBERG, 1985; MORSE; STONER, 1993; SPORN; SUH, 2000).

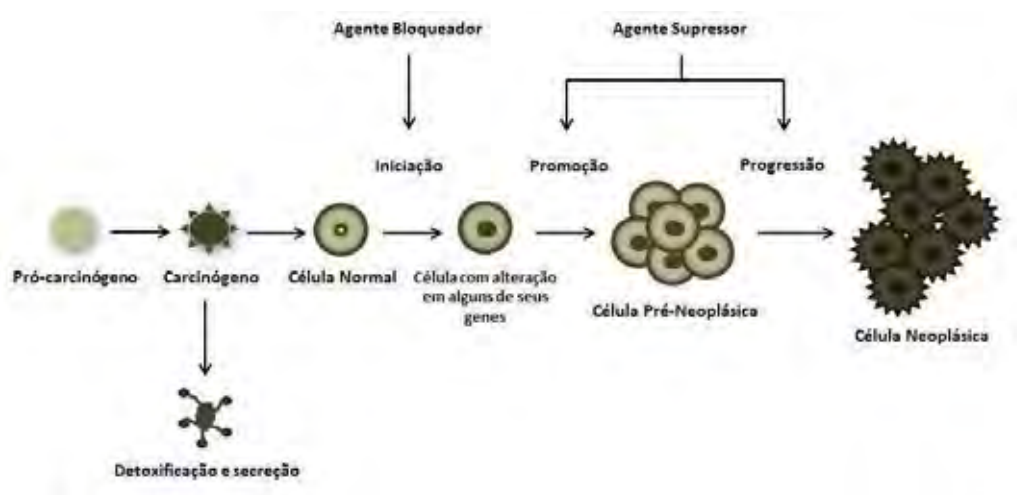


Figura 1. Estágios da carcinogênese, com os tipos de agentes quimiopreventivos do câncer, esquematicamente representado. Modificado de Duvoix *et al.*, (2005).

Muitos produtos naturais são capazes de alterar o metabolismo de carcinógenos através da indução de enzimas microsossomais envolvidas na destoxificação do organismo. A carcinogênese, portanto, pode ser evitada por uma série de compostos de diferentes classes tais como flavonóides, cumarinas, tiocarbamatos, fenólicos e isotiocianatos. A propriedade comum entre esses compostos é elevar a atividade enzimática por um aumento na sua síntese e na diminuição da degradação da mesma (CUENDET *et al.*, 2006).

Uma das estratégias para a proteção de células dos eventos iniciais da formação de tumores, utilizando produtos naturais, incluem a diminuição de enzimas metabólicas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio que atuam principalmente na

ativação de carcinógenos, as chamadas enzimas de fase 1, ao passo que enzimas de fase 2, que participam do processo de destoxificação do organismo frente a carcinógenos, são estimuladas, promovendo a desativação de radicais e eletrófilos envolvidos nos processos celulares normais. Os agentes responsáveis por este acontecimento são denominados indutores bifuncionais, onde os carcinógenos poderiam induzir a uma proteção contra seu próprio efeito tóxico, ou seja, são responsáveis por induzir tanto enzimas de fase 1 quanto enzimas de fase 2, como é o caso de Hidrocarbonetos Poliaromáticos (HPA) que se ligam ao Receptor de Aril-hidrocarbonetos (AhR) com grande afinidade (PROCHASKA *et al.*, 1992; CUENDET *et al.*, 2006).

Além destes, existem também os indutores monofuncionais, que induzem seletivamente enzimas de fase 2, ativando o elemento de resposta antioxidante (ARE) pela via Keap1-Nrf2 (DINKOVA-KOSTOVA *et al.*, 2002) (Figura 2). A redução de quinonas eletrofilicas pela quinona-redutase (QR) é uma via importante de destoxificação e o seu grau de atividade pode ser inferido através da indução em células da linhagem de hepatocarcinoma murino (Hepa 1c1c7) (TALALAY *et al.*, 1988; PROCHASKA *et al.*, 1992; GERHÄUSER *et al.*, 1997).

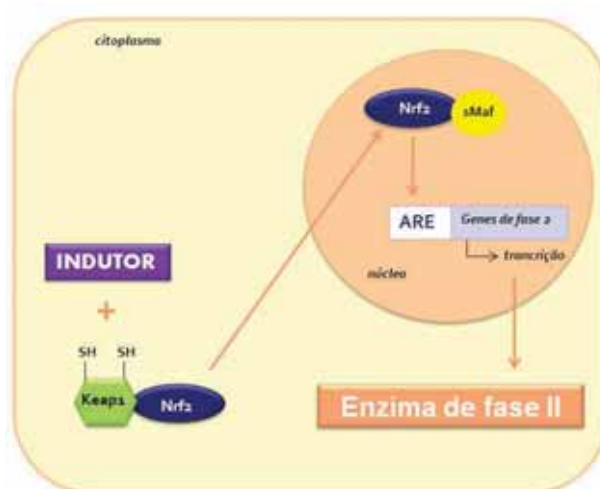


Figura 2. Ativação do elemento de resposta antioxidante (ARE) pela via Keap1-Nrf2. Modificado de Dinkova-Kostova *et al.*, (2002).

O tratamento com produtos naturais pode induzir a quinona-redutase. O ensaio da quinona redutase (QR) constitui um método simples, para uma rápida detecção e avaliação de indução dessa enzima, que destoxifica carcinógenos (enzima de fase 2), baseando-se na medida direta da atividade da QR em células de hepatocarcinoma murino (Hepa 1c1c7) cultivadas em placas com 96 poços (PROCHASKA *et al.*, 1992). A quinona-redutase catalisa a redução da menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) a menadiol mediada por NADPH como doador de elétrons. O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é então reduzido não enzimaticamente pelo menadiol, resultando na formação de um sal precipitado com cor azul (azul de formazana) que pode ser quantificado em leitor de absorbância de microplacas (Figura 3) (PROCHASKA *et al.*, 1988; FAHEY *et al.*, 2004).

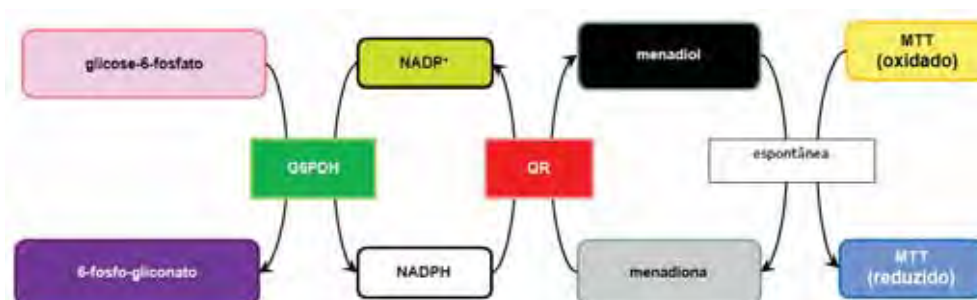


Figura 3. Princípio do ensaio da quinona-redutase: glicose-6-fosfato e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) geram NADPH continuamente. Este NADPH é usado pela QR para transferir elétrons a menadiona. O menadiol então formado reduz espontaneamente o MTT ao azul de formazana que pode ser medido em um amplo alcance de comprimentos de onda (490 a 640 nm). Ambos NADPH e menadiona são regenerados, o que evita problemas de depleção dos substratos (FAHEY *et al.*, 2004).

A linhagem celular derivada de hepatocarcinoma murino (Hepa 1c1c7) contém quantidades de QR induzíveis facilmente mensuráveis que fornece um confiável sistema de detecção de indutores de enzimas de fase 2 (PROCHASKA; SANTAMARIA 1988; FAHEY *et al.*, 2004; CUENDET *et al.*, 2006).

Para determinar se um composto é considerado monofuncional ou bifuncional, pode-se comparar a capacidade de indução de uma substância na linhagem selvagem Hepalclc7 com o perfil da indução em duas linhagens mutantes (TAOc1BPrcl e BPrcl). A linhagem TAOc1BPrcl é defeituosa no receptor AhR, enquanto a linhagem BPrcl é incapaz de translocar o complexo ligante-receptor para o núcleo (GERHÄUSER *et al.*, 1997). Portanto, os compostos que possuem o mesmo padrão de indução tanto na linhagem selvagem, quanto nas linhagens mutantes, são considerados indutores monofuncionais (CUENDET *et al.*, 2006). Assim, o presente estudo propõe avaliar a atividade quimiopreventiva, através do ensaio da quinona-redutase, utilizando extratos e frações de *Eugenia jambolana*.

1.2. *Eugenia jambolana* (Myrtaceae)

A família Myrtaceae apresenta ampla distribuição, ocorrendo em regiões tropicais e subtropicais, principalmente na América do Sul e Sudeste da Ásia e Austrália, compreende cerca de 75 gêneros e 3000 espécies. Na medicina, as plantas desta família são muito usadas por serem ricas em óleos voláteis. Dentro da família Myrtaceae existe uma subfamília, chamada de Myrtoide, que possui plantas com grande potencial econômico. Nessa subfamília encontram-se as espécies *Myrciaria* (jabuticaba), *Myrtus* (murta), *Syzygium* (cravo-da-Índia), *Eugenia* (pitanga), *Psidium* (goiaba), *Plinia* (cambucá) e *Luma*. (MAHMOUD *et al.*, 2001; KUSKOSKI *et al.*, 2003; REYNERTSON *et al.*, 2008).

A espécie *Eugenia* pertencente à subfamília Myrtoide, assim como algumas outras espécies desta subfamília, são utilizados como antiinflamatório, analgésico, antipirético, antifúngico e no tratamento de úlceras peptídicas. (MAHMOUD *et al.*, 2001; KUSKOSKI *et al.*, 2003).

Eugenia jambolana (Lamb.) é também conhecida como *Myrtus cumini* (L.), *Syzygium jambolanum* (Lamb.), *Syzygium cumini* (L.), *Eugenia cumini* Druce e são árvores da família Myrtaceae oriunda da Índia oriental. Essas espécies são bastante conhecidas na medicina popular indiana, chegando até 30 m de altura, com copa ampla e ramificada. Multiplica-se por sementes, desenvolve-se bem em qualquer tipo de solo, porém permeáveis e profundos. Prefere climas quentes e úmidos, principalmente de regiões litorâneas. Suas flores são de coloração creme ou branca, com pétalas arredondadas, possuem bastante néctar. No Brasil essa espécie frutifica o ano todo, seus frutos possuem uma semente única e grande, os frutos maduros são empregados para fazer conservas, sucos e geléias enquanto o suco da fruta verde é usado para preparar um vinagre que é considerado um medicamento estomacal e diurético (BANERJEE; DASGUPTA; DE, 2005).

No Brasil, a *Eugenia jambolana* é conhecida como jambolão, jamelão, jambol ou jalão (Figura 4). Os frutos da espécie contêm vitamina C, ácido gálico, taninos e antocianinas, sendo amplamente utilizados como adstringente, diurético, antidiabético e estomáquico. As folhas de *E. jambolana* contêm uma mistura de polifenóis, especialmente flavonóides glicosilados, ácidos fenólicos e são ricos em taninos e saponinas e seu chá é comumente utilizado por pacientes diabéticos (MAHMOUD *et al.*, 2001, LOGUERCIO *et al.*, 2005). As sementes e os frutos do jambolão podem reduzir a glicemia e a glicosúria, promover atividade antioxidante, e restaurar parcialmente o fígado alterado e glicogênio contido na estrutura muscular, bem como, nos níveis de glucoquinase, hexoquinase, glicose-6-fosfato e fosfofrutoquinase em ratos diabéticos (PEPATO *et al.*, 2005).



Figura 4. Árvore, folhas e frutos de *Eugenia jambolana*.

<http://seboriobrancoacaonatalverde.blogspot.com/2011/02/jambolao-em-acao-natal-verde-contra-o.html>).

As propriedades adstringentes da casca são utilizadas, na medicina popular, contra diarréias crônicas, disenteria e menorragia. A decocção da casca é um eficaz enxaguante bucal no tratamento de aftas, estomatites, afecções da garganta e outras doenças das vias orais. Dentre os inúmeros usos da planta, destaca-se o seu efeito antiinflamatório, anti-hiperglicêmico, anti HIV e antimicrobiano (MURUGANANDAN *et al.*, 2001; LOGUERCIO *et al.*, 2005).

Os frutos de *E. jambolana* são comestíveis e seus extratos apresentam forte atividade antioxidante devido a presença de vitamina C, ácido gálico, taninos e antocianinas (BANERJEE *et al.*, 2005; VEIGA *et al.*, 2007). As antocianinas são compostos flavonoídicos responsáveis pela cor vermelha, roxa e azul evidenciada em algumas frutas, vegetais, cereais e flores. Estão presentes em varias famílias de plantas, especialmente na família em questão (Myrtaceae), na forma de compostos glicosilados e possuem carga positiva no anel central da estrutura, a pH menor que 3, o que lhes

contribui, a coloração junto com o número e posição de grupos hidroxilas presentes (figura 5) (HOU *et al.*, 2004; MALACRIDA; MOTTA, 2006; PLAZA, 2007).

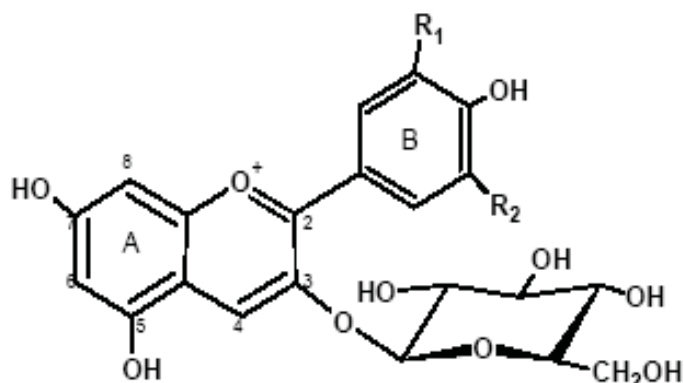


Figura 5. Estrutura de uma antocianina. (DAMETTO, 2010).

Sendo assim relatado na literatura, a atividade antioxidante, antiinflamatória, anti-hiperglicêmica e antimicrobiana de *E. jambolana*, estudos adicionais são estimulados para verificar sua possível atividade quimiopreventiva. Entretanto, deve-se avaliar seu potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico para garantir o possível uso seguro dos extratos e frações.

1.3. Genotoxicidade/Antigenotoxicidade e Mutagenicidade/Antimutagenicidade

As mutações podem ser causadas por erros durante o processo de duplicação da molécula de DNA, por mutagênicos endógenos, tais como espécies reativas de oxigênio, ou induzidas por agentes externos que são divididos em: agentes físicos, como luz ultravioleta e radiações ionizantes; agentes biológicos como é o caso de alguns vírus, que se integram ao genoma celular interrompendo seqüências gênicas ou promovendo rearranjos gênicos; e agentes químicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e as nitrosaminas. Há muitos anos sabe-se que a maioria dos agentes mutagênicos mais potentes, como por exemplo, radiações ionizantes, luz

ultravioleta e produtos químicos são considerados, indutores de câncer, ou seja, são indutores da carcinogênese (GARDNER; SNUSTAD, 1986; ESTELLER; HERMAN, 2002,).

O acúmulo de mutações está relacionado com o desenvolvimento da maioria dos tumores malignos e desordens degenerativas (CUZZOCREA *et al.*, 2001; MIGLIORE; COPPEDÈ, 2002). Kundu e Surh (2005) relataram que 7 a 31% dos tumores malignos podem ser reduzidos com dietas ricas em frutas e vegetais. Desde então estudos vêm sendo conduzidos, a fim, de identificar compostos que possam apresentar atividade antimutagênica e antigenotóxica (CARIÑO-CORTÉS *et al.*, 2007). Alimentos ricos em antioxidantes reduzem a incidência e a mortalidade causada por alguns tipos de câncer. As frutas que contêm altos níveis de substâncias antioxidantes como polifenóis, ácidos fenólicos, carotenóides, flavonóides e antocianinas podem reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio nos organismos dos mamíferos e assim, evitar danos ao DNA e impedir as mutações que iniciam a progressão tumoral (ZHANG *et al.*, 2008; HOGAN *et al.*, 2010).

Para a avaliação do potencial genotóxico, mutagênico, antigenotóxico e antimutagênico dos extratos e frações de *E. jabolana*, cujo mecanismo de ação ainda é desconhecido foi utilizado o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo em linhagem celular de hepatocarcinoma humano – HepG2.

Atualmente os ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade (no caso teste do micronúcleo e ensaio do cometa, respectivamente) estão sendo amplamente utilizados para a identificação de agentes quimiopreventivos, pois são ensaios sensíveis, de fácil execução que podem ser realizados com diversas linhagens celulares, incluindo a linhagem celular HepG2, que são células de fácil manuseio e contêm várias enzimas responsáveis pela ativação de diversos xenobióticos por possuir uma ação

metabolizadora. A diferença entre os dois ensaios é basicamente devido as variações entre os tipos de alterações no DNA, o teste do micronúcleo detecta lesões irreparáveis que se manifestam como aberrações cromossômicas ou efeitos aneugênicos, enquanto o ensaio cometa detecta lesões primárias no DNA, ou seja danos passíveis de reparo (SALVADORI *et al.*, 1993; SCOLASTICI *et al.*, 2008).

A combinação dessas duas metodologias é recomendada para determinar os efeitos que substâncias podem exercer sobre o DNA. Principalmente porque ambas possuem como característica a capacidade de avaliar danos no DNA em estágios específicos do ciclo celular (CAVALCANTI *et al.*, 2006; RIVA *et al.*, 2007). Para a avaliação de genotoxicidade é recomendável o ensaio do Cometa.

1.3.1. Ensaio cometa ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)

De acordo com Collins (2004), o ensaio cometa ou gel de eletroforese de células mononucleadas tem sido um dos melhores métodos para identificar dano de DNA, com aplicações em testes genotóxicos, biomonitoramento humano, epidemiologia molecular e ecogenotoxicologia. De acordo com literatura, este ensaio foi desenvolvido empiricamente através de dois protocolos básicos, Singh *et al.*, em 1988 e Olive em 1989. O primeiro protocolo foi desenvolvido para mensurar pequenos níveis de quebras de DNA com alta sensibilidade, enquanto o segundo foi otimizado para detectar uma subpopulação celular com sensibilidade variável a determinadas drogas ou radiação (FAIRBAIRN *et al.*, 1995).

O ensaio cometa é capaz de detectar danos de DNA que podem futuramente originar mutações. A versão alcalina deste ensaio detecta um amplo espectro de lesões ao DNA, incluindo quebras de fita simples ou duplas, sítios álcali-lábeis e ligações cruzadas e as vantagens incluem: sua aplicabilidade a vários tecidos e/ou tipos celulares, a grande sensibilidade em detectar pequenos níveis de danos recentes no DNA, sua fácil

execução, o curto tempo necessário para completar um experimento e obter resultados, e o seu relativo baixo custo (TICE *et al.*, 2000). O ensaio consiste na migração do DNA, pois este contém quebras que podem sofrer arraste, e esses danos aumentam frente à exposição a agentes genotóxicos. Quando comparado a testes como o do micronúcleo ou de aberrações cromossômicas, o ensaio cometa mostra-se capaz de detectar danos mais recentes e passíveis de reparos (MOLLER, 2005).

A avaliação do potencial genotóxico, bem como do potencial antigenotóxico de produtos naturais vem sendo bastante explorada nos últimos tempos, tornando-se uma ferramenta interessante para avaliar a possível atividade quimiopreventiva dos diversos extratos e frações incluindo os de *E. jambolana*, complementando assim os resultados do micronúcleo que foram obtidos.

1.3.2. Ensaio do micronúcleo

Na toxicologia genética, os estudos de danos ao DNA induzido por substâncias de origem natural ou sintética tornaram-se essenciais, uma vez que mutação em cromossomos é um evento importante na carcinogênese e, compostos antitumorais clássicos, como por exemplo, a ciclofosfamida, são agentes altamente genotóxicos (FENECH, 2005).

Dentre os testes, que analisam mutações cromossômicas, destaca-se o teste do micronúcleo, que é o ensaio amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), sendo internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial. Os micronúcleos são originados de fragmentos acêntricos de cromossomos ou danos

cromossômicos os quais são ocasionados por: perda mitótica de fragmento acêntrico; ação mecânica ocasionando quebra cromossômica; danos cromossômicos ocasionados por falha no filamento mitótico durante a anáfase ou na indução de apoptose (HEDDLE *et al.*, 1991). Este teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos, mas também foi incorporado às orientações da OECD (*Organization for Economic Co-Operation and Development*) como um ensaio mutagênico *in vitro*, (projeto da OECD em junho de 2004) podendo ser realizado em cultura de células (HEDDLE, 1973; KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2003; SEVERIN *et al.*, 2005).

O micronúcleo é literalmente um núcleo pequeno, considerado um produto de quebra do DNA genômico de células eucarióticas. Durante a divisão celular, o material genético é duplicado e igualmente distribuído entre as duas células filhas. Radiações e substâncias químicas podem ocasionar quebra ou dano cromossômico, afetando assim a distribuição do material genético entre as células filhas. Como resultante desse dano, partes ou pedaços dos cromossomos, podem ser distribuídos a qualquer uma das células filhas, não sendo incorporados no novo núcleo e, por esse motivo, os pedaços se apresentam sob a forma de micronúcleo claramente observável à microscopia óptica comum (AZEVEDO *et al.*, 2003).

Durante a identificação da frequência de micronúcleos, alguns critérios devem ser seguidos: os micronúcleos são morfologicamente idênticos, porém menor do que o núcleo principal da célula e com refração similar; devem apresentar diâmetro entre 1/3 a 1/6 do tamanho do núcleo principal e na forma ovalada ou arredondada; os micronúcleos não são refringentes; eles não são ligados ou conectados ao núcleo principal e não se sobrepõem ao núcleo principal, ainda, possuem a mesma intensidade de coloração nuclear (FENECH *et al.*, 2003).

O teste de micronúcleo é considerado um dos bioensaios mais utilizados para o rastreamento de efeitos mutagênicos, devido a sua simplicidade, confiabilidade e sensibilidade, e recentemente esse ensaio também vem sendo usado para detecção de efeitos antimutagênicos (FLORES *et al.*, 2003).

O termo antimutagênico tem sido usado para designar vários agentes inibidores de mutação, e incluem tanto os desmutagênicos quanto os bioantimutagênicos. Os agentes desmutagênicos, que em sua maioria atuam a nível extracelular, agem sobre os mutágenos por meio de reações químicas, enzimáticas e adsorção, e inibem as ativações metabólicas e reações químicas que geram mutágenos (KADA *et al.*, 1986; VERHAGEN *et al.*, 1997). Já os agentes bioantimutagênicos, atuam principalmente a nível intracelular, podem promover o aumento da atividade de enzimas de detoxificação, reagindo com compostos eletrofilicos ou ainda capturando radicais livres, atuam também como promotores do sistema de reparo do DNA, impedindo a fixação do dano no DNA (KADA *et al.*, 1982; WATERS *et al.*, 1990).

A existência de inúmeros mecanismos de antimutagenicidade vem sendo citados, como por exemplo: prevenir a formação de metabólitos mutagênicos, inativar agentes mutagênicos através de enzimas ou componentes celulares, modular mecanismos que aumentam a inativação metabólica de compostos mutagênicos (ANTUNES, 1997). Entretanto mais estudos devem ser realizados a fim de proporcionar um melhor entendimento sobre os mecanismos de ação dos inibidores, tanto a nível molecular quanto fisiológico, bem selecionar agentes para quimioprevenção do câncer e de outras doenças relacionadas a eventos mutagênicos (SUGUI, 2006).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo rastrear a atividade de quimioprevenção dos extratos e frações das folhas e dos frutos de *E. jambolana*, um estudo bioguiado, em linhagem de hepatocarcinoma celular murino selvagem (Hepa 1c1c7) e linhagem mutante (TAOc1BPr1 e BPr1), bem como caracterizar o potencial genotóxico e mutagênico, em linhagem de hepatocarcinoma celular humano (HepG2).

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar quantitativamente a atividade da enzima quinona-redutase, utilizando o ensaio da Quinona-Redutase, em linhagem de hepatocarcinoma murino selvagem (Hepa 1c1c7) e mutante (TAOc1BPr1 e BPr1), em diferentes concentrações a partir dos extratos e frações de *E. jambolana*;
- Avaliar a viabilidade celular, concomitantemente com o ensaio da quinona-redutase em células de hepatocarcinoma murino (Hepa 1c1c7) e mutante (TAOc1BPr1 e BPr1), utilizando a coloração com Violeta cristal (VC);
- Avaliar a citotoxicidade celular, utilizando o método de Sulforrodamina B em linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2) tratada com extratos e frações de *E. jambolana*;
- Caracterizar o potencial genotóxico com diferentes concentrações dos extratos e frações de *E. jambolana*, utilizando o Ensaio do Cometa;
- Caracterizar o potencial mutagênico com diferentes concentrações dos extratos e frações de *E. jambolana*, utilizando o Teste do Micronúcleo;
- Avaliar o potencial antigenotóxico e antimutagênico a partir de concentrações não genotóxicas dos extratos e frações de *E. jambolana*, utilizando, respectivamente, o Ensaio do Cometa e o Teste do Micronúcleo.

3. Materiais e Métodos

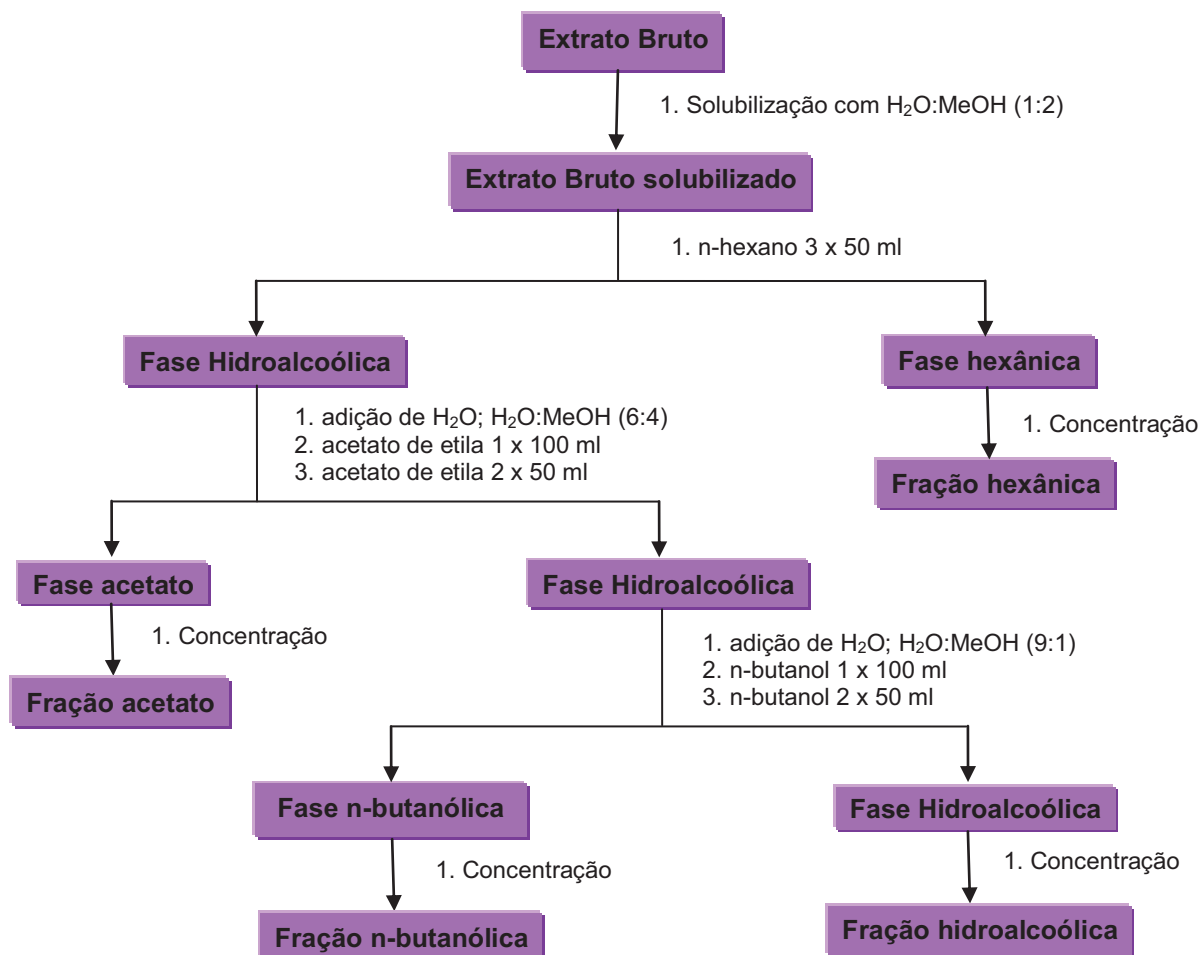
3.1. Estudo químico de *Eugenia jambolana*

Os processos de coleta, extração e purificação do material botânico foram realizados pelo o NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese, e Ecofisiologia de Produtos Naturais) com a colaboração da Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira da Silva e da mestre Alessandra Cristina Dametto do Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UNESP- Araraquara.

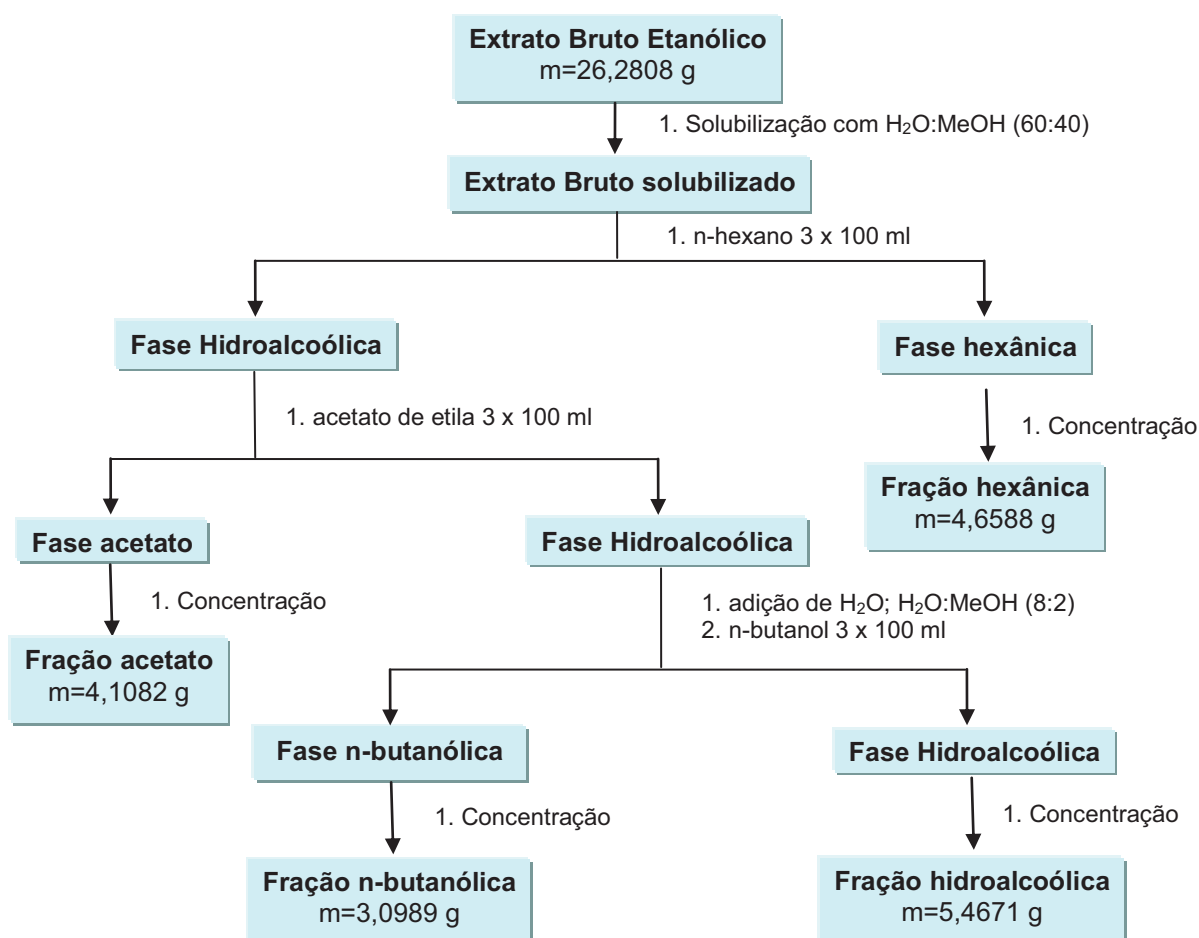
Os frutos maduros e folhas de *Eugenia jambolana* foram coletados na cidade de Araraquara, Estado de São Paulo e as exsiccatas foram depositadas no IBot-SP (Instituto Botânico- SP). Após a coleta do fruto, as polpas e as cascas que foram trituradas com metanol (1% HCl) em um liquidificador por alguns minutos. Após a trituração, para separar a parte solúvel da parte insolúvel, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 4° C. O extrato bruto do fruto foi obtido após a concentração do sobrenadante ser submetida a uma pressão reduzida e a uma temperatura de aproximadamente 35°C. Em relação às folhas, após a coleta, elas foram secas e trituradas em um moinho elétrico, posteriormente as folhas moídas foram submetidas ao processo de extração exaustiva com etanol, e após a concentração do solvente a pressão reduzida, foi obtido o extrato etanólico bruto das folhas. O extrato bruto das folhas e dos frutos foram então submetidos partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades e após as concentrações das fases foram obtidas as respectivas frações das folhas e dos frutos (fluxograma 1 e 2) (DAMETTO, 2010).

A purificação das substâncias presentes no extrato bruto do fruto foi realizada por diferentes técnicas cromatográficas úteis no isolamento e na caracterização de metabólitos secundários. Para a elucidação estrutural das substâncias isoladas foram empregadas técnicas espectrométricas como: ressonância magnética nuclear uni e bidimensional, espectrometria de massas, infravermelho e ultravioleta. Entretanto no

presente estudo não foi possível avaliar a substância pura de *E. jambolana* por apresentar excessiva instabilidade molecular. Todos os procedimentos descritos anteriormente foram realizados pela mestre Alessandra Cristina Dametto.



Fluxograma 1: Metodologia de partição líquido-líquido para o extrato dos frutos de *E. jambolana* (DAMETTO, 2010).



Fluxograma 2: Metodologia de partição líquido-líquido para o extrato das folhas de *E. jambolana* (DAMETTO, 2010).

Após a partição química, os extratos e frações foram solubilizados em água destilada e então utilizados nos ensaios biológicos.

3.2. Manutenção das linhagens

A atividade de quimioprevenção, a partir do ensaio de quinona-redutase, foi avaliada na linhagem ATCC (*American Type Culture Collection*) de hepatocarcinoma murino (Hepa 1c1c7 ATCC: CRL-2026) que foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. John M. Pezzuto do “*College of Pharmacy, University of Hawaii at Hilo*”. A linhagem ATCC de hepatocarcinoma humano (HepG2; ATCC n. HB-8065), que foi utilizada nos

ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade e antimutagenicidade foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Dayse Maria Favero Salvadori do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina – UNESP, Campus Botucatu. Posteriormente, as células HepG2 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, para garantir a preservação das características genótípicas e fenotípicas da linhagem.

As células de linhagem Hepa 1c1c7 foram cultivadas em meio de cultura α -MEM (Alfa Modification of Eagle Medium - Sigma) sem ribonucleosídeos ou desoxirribonucleosídeos, acrescido de estreptomicina 0,1mg/mL e penicilina 100U/mL, bicarbonato de sódio, kanamicina (Sigma), ao pH 7,2 e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil). As células da linhagem HepG2 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Sigma), acrescido de penicilina 100U/mL e estreptomicina 0,1mg/mL bicarbonato de sódio, kanamicina (Sigma), ao pH 7,2 e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil).

As células foram cultivadas em garrafas, mantidas a 5 % de CO₂ e a temperatura de 37°C até que a monocamada celular estivesse confluenta. Posteriormente, as células foram lavadas com 5 mL de solução de Hanks (0,4 g de KCl, 0,06g de KH₂PO₄, 0,04g de Na₂HPO₄, 0,35 g de NaHCO₃, 1 g de glicose, H₂O q.s.p. 1000 mL) e tripsinizadas, acrescentado-se 1 mL de solução ATV (Associação de Tripsina (0,2 %) e Versene (0,02 %) – Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, Brasil). Após o desprendimento do tapete celular, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio de cultura acrescido de 10 % de soro fetal bovino. A suspensão celular obtida em uma garrafa foi transferida para outras garrafas, esse procedimento foi repetido até que houvesse quantidade de células suficientes para os experimentos e seu estoque no nitrogênio líquido.

3.3. Ensaio da quinona-redutase

3.3.1. Reagentes

Para realizar a quantificação de indução enzimática com o ensaio de quinona-redutase (QR) foi necessário preparar os seguintes reagentes. Solução de lise com 0,8 % de digitonina e 2 mM de EDTA, pH 7,8. Solução de ensaio feita de 25 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM de glicose-6-fosfato, 50 μ M de menadiona, 30 μ M de NADPH, 5 μ M de FAD, 0,07% (m/v) de soro-albumina bovina, 0,03% (m/v) de MTT, 0,01% (v/v) de Tween-20 e 2 unidades/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase. Como controle positivo foi utilizado o indutor β -naftoflavona (BNF) na concentração de 0,1 μ M (SONG et al., 1999). Reagentes obtidos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.

3.3.2. Quantificação da atividade da quinona-redutase

As células Hepa1c1c7, TAO_r1BPr_c1 e BPr_c1 foram cultivadas em meio α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino em placas de 96 cavidades por 24 horas, com cerca de 1×10^4 células/mL em cada poço. Em seguida foram expostas a diferentes concentrações, seguindo uma diluição seriada de 1:2 a partir da concentração de 40 μ g/mL, além de uma concentração isolada de 30 μ g/mL, dos extratos e frações dos frutos e folhas de *Eugenia jambolana*, sendo solubilizados em meio de cultura por 48 horas para que ocorresse a possível indução enzimática. Depois do tratamento, o meio de cultura foi descartado e adicionou-se 50 μ L de solução de lise. A placa foi então incubada por 10 minutos a 37 °C. Para facilitar a lise das células, as placas foram agitadas manualmente por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a lise, avaliou-se a atividade da QR com a adição de 200 μ L da solução de ensaio. A placa foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz e realizou-se a leitura. A absorbância foi medida usando um leitor de iMark Microplate Reader (Bio-Rad

Laboratories, Hercules, CA, EUA) a 595 nm (PROCHASKA *et al.*,1988; GROSS *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2004).

Os dados foram normalizados subtraindo da média de absorvância obtida de cada concentração d a média de absorvância do controle de reagente branco. O desvio padrão da média de cada tratamento é geralmente menor que 10%. A viabilidade celular foi determinada em uma placa feita paralelamente, corada com violeta cristal, a fim de verificar o comportamento celular, durante o experimento. Então, após 48h, os tratamentos foram removidos, e as células foram coradas utilizando 100 µL de solução 0,2% violeta cristal em 2% etanol. O corante foi desprezado e a placa foi lavada em água corrente e seca naturalmente. Para leitura espectrofotométrica, o violeta cristal foi solubilizado em 200 µL de 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS) em 50% etanol e mantida a temperatura ambiente no *shaker* para solubilizar o corante completamente, a leitura foi realizada também com absorvância a 595 nm, utilizando leitor de placas iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) (PROCHASKA *et al.*, 1992).

A potência de indução enzimática da QR é expressa em unidades por g (U/g). Uma unidade de atividade indutora de QR é definida com a quantidade de produto natural necessário para duplicar a atividade específica da QR em relação a células não tratadas (CD) (PROCHASKA *et al.*,1988; GROSS *et al.*, 2000). Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram comparados com controle positivo (β - Naftoflavona).

3.4. Ensaio de citotoxicidade (Sulforrodamina B)

Considerando que o ensaio de citotoxicidade em células HepG2, utilizando o sal de MTT apresentou interação com os extratos e frações, promovendo um resultado falso

positivo (resultados não demonstrados), foi utilizado então no presente estudo o ensaio de citotoxicidade por sulforrodamina B.

A avaliação da citotoxicidade baseia-se na coloração de proteínas pelo corante sulforrodamina B, que constitui-se em um método simples, sensível, reprodutível e rápido. O princípio desse ensaio consiste na habilidade que a sulforrodamina B tem de se ligar a componentes protéicos das células fixadas pelo ácido tricloroacético. O corante utilizado nesse ensaio é uma aminoxantina de cor rosa brilhante e com dois grupos sulfônicos, que são capazes de se ligar as porções terminais dos aminoácidos das células que foram fixadas pelo ácido tricloroacético (SKEHAN *et al.*, 1990).

3.4.1. Avaliação da citotoxicidade

Para o ensaio de citotoxicidade pela Sulforrodamina B (SRB), foi utilizada uma suspensão de $1,5 \times 10^4$ células/poço da linhagem HepG2. As células foram cultivadas em placas de 96 cavidades, e após 24 horas de cultivo, foram tratadas com os extratos e frações das folhas e dos frutos de *E. jambolana*, seguindo uma diluição seriada 1:2 a partir da concentração de 40 µg/mL, a fim de comparar os resultados obtidos no ensaio do violeta cristal, (realizado em células Hepa 1c1c7), pois nos testes de genotoxicidade, mutagenicidade, antigenotoxicidade e antimutagenicidade foram utilizadas as células HepG2. Após 24 horas do tratamento, foi adicionado 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% gelado e as placas foram incubadas por 1 hora a 4°C, posteriormente a solução de TCA foi removida e as placas foram lavadas, com água corrente de 3 a 4 vezes. Adicionou-se então 50 µL da solução de SRB a 0,4% (diluída em ácido acético) e as placas foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a remoção da SRB, as placas foram lavadas de 3 a 4 vezes com ácido acético a 1%, secas e o corante dissolvido com Tris Base 10 mM (Sigma). Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, as leituras espectrofotométricas da absorbância, foi realizada em

comprimento de onda de 570nm, no leitor de placas iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Os testes foram realizados em três experimentos independentes e a porcentagem de células vivas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por ZHANG *et al.*, 2004:

$$\text{Células vivas (\%)} = \text{Absorbância do Teste} \times 100 / \text{Absorbância do Controle Negativo}$$

Assim após a avaliação das concentrações, foram realizados o ensaio do Cometa e o Teste do micronúcleo.

3.5. Ensaio do Cometa

3.5.1. Soluções para o ensaio do Cometa

Para a realização do ensaio do cometa foi necessário preparar as seguintes soluções. Solução de lise estoque com 2,5M de NaCl, 100mM de EDTA e 10 mM de Tris, pH 10. Solução de lise preparada no momento do uso com 1% de Triton X-100, 10% DMSO e acrescido de solução lise estoque. Solução de EDTA com 3,72g em 50 mL de água destilada e solução de NaOH com 100g em 250 mL de água destilada, o tampão de eletroforese foi preparado no momento do uso com 10 mL de EDTA e 60 mL de NaOH em 2 L de água destilada a 4°C, pH 13. Solução de neutralização com Tris a 0,4M, a 4°C, pH 7,5. Solução de PBS concentrado 20 vezes com 180g de NaCl anidro, 27,3g de Na₂HPO₄ anidro, 4,85g de Na₂H₂PO₄.H₂O e água destilada, q.s.p. 1L, pH entre 7,2 e 7,6. Para o ensaio foram utilizadas agarose ponto de fusão normal (Sigma) (1,2g diluído em 80mL de PBS 1x, a 37°C) e agarose de baixo ponto de fusão ou *Low melting point LMP* (Sigma) (0,05g diluído em 10 mL de PBS 1x, a 37°C) para 50 lâminas.

3.5.2. Avaliação de Genotoxicidade

O ensaio de Cometa foi introduzido no laboratório desde 2005, através da colaboração da Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi, do laboratório de Genética da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Desde então, o ensaio do Cometa vem sendo amplamente utilizado em nosso laboratório para verificação de genotoxicidade/antigenotoxicidade de produtos naturais. O ensaio do cometa para avaliar a genotoxicidade, foi realizado em células HepG2 e segundo protocolo estabelecido por Singh e colaboradores (1988).

A suspensão celular de $2,5 \times 10^5$ células/poço foi cultivada em placas de 24 cavidades e com um volume final de 500 μL /poço, após 24 horas de cultivo, as células foram tratadas com os extratos e frações de *E. jabolana*, que apresentaram indução da enzima quinona-redutase associado a não citotoxicidade celular, ou seja, primeiramente, foram estabelecidas as concentrações exatas que apresentaram atividade da enzima quinona-redutase e mais duas concentrações adicionais, ou seja, uma concentração abaixo e outra acima da concentração que apresentou atividade quimiopreventiva (com extrato bruto das folhas e dos frutos, EB-Fo e EB-Fr respectivamente; fração hidroalcoólica dos frutos, HA-Fr e fração n-butanólica das folhas, BU-Fr). As concentrações que apresentaram potencial genotóxico decidiu-se testar concentrações mais baixas, a fim de encontrar concentrações não genotóxicas para dar continuidade aos demais testes. Inicialmente as células foram tratadas com as seguintes concentrações, 2,5, 5, 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$ do extrato bruto das folhas; 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g/mL}$ da fração n-butanólica das folhas; 20, 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$ do extrato bruto dos frutos; e 10, 20 e 30 $\mu\text{g/mL}$ da fração hidroalcoólica dos frutos, diluídas em meio de cultura. Como controle negativo foi utilizado apenas meio de

cultura e como controle positivo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 0,1M por 5 minutos. Os tratamentos foram realizados em duplicata e por 24 horas.

Posteriormente os tratamentos foram removidos, as células foram lavadas com solução de Hanks, tripsinizadas, reservadas em *ependorfs* e centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi então descartado e adicionou-se 100 μ L de solução de Hanks, para eliminar todo excesso do meio de cultura que pudesse interferir na agarose LMP, diminuindo sua adesão à lâmina e a suspensão celular foi centrifugada novamente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspendidas em 200 μ L de agarose LMP a 37°C. Em seguida, o volume de cada *ependorf* foi transferido para 2 lâminas, ou seja, foi transferido cuidadosamente 100 μ L da mistura para lâminas previamente tratadas com agarose ponto de fusão normal. Cada lâmina foi recoberta com uma lamínula grande (24x 60mm) e colocada na geladeira ao abrigo da luz por 5 minutos. Então as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram submetidas à solução de lise recém prepara a 4°C por um período mínimo de 12 horas sob refrigeração e ao abrigo da luz.

As lâminas foram retiradas da solução de lise e colocadas na cuba de eletroforese, sendo demarcado o lado da lâmina que foi deixado para o pólo negativo, a fim de que os cometas (fragmentos de DNA) não fossem perdidos no tampão durante a corrida eletroforética. Os eventuais espaços excedentes na cuba foram preenchidos por lâminas limpas e a solução tampão de eletroforese (4°C), foi colocada na cuba de eletroforese até cobrir as lâminas, que permaneceram durante 20 minutos em repouso para que houvesse o relaxamento das fitas de DNA. Em seguida, a fonte de eletroforese foi ajustada para 25 Volts, a miliamperagem e potência foram reguladas de acordo com a quantidade de solução colocada na cuba, e a corrida eletroforética foi realizada por 20 minutos. Após a eletroforese alcalina, as lâminas foram retiradas cuidadosamente da

cuba e mergulhadas em solução de neutralização a 4 °C por 15 minutos. As lâminas então foram fixadas em etanol 100% e reservadas a temperatura ambiente.

Para coloração das lâminas, foi utilizado 20 µl de solução de brometo de etídio por lâmina e, posteriormente, a lâmina foi coberta com uma lamínula (24 x 60 mm). A leitura das lâminas foi realizada imediatamente após a coloração em um microscópio de fluorescência com filtro de 516-560 nm, barreira de filtro de 590 nm e aumento total de 400 vezes. Esse aumento permitiu a observação de imagens microscópicas com contorno circular, indicando que não houve danos ao DNA ou núcleo celular fragmentado em forma de “cometa” o que significa possíveis danos ao DNA. Foram capturadas imagens de 100 nucleóides por alíquota de células e analisadas pelo software TriTek *CometScore*™ versão 1.5. O parâmetro adotado no presente estudo foi a porcentagem (%) de DNA na cauda que nos permite analisar a quantidade de DNA fragmentado (MOLLER, 2005).

3.5.3. Avaliação de Antigenotoxicidade

Para avaliação da antigenotoxicidade dos extratos e frações isoladas das folhas e dos frutos de *E. jabolana* foi utilizado como agente indutor de dano o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células HepG2. Foram empregados os protocolos de pré-tratamento e pós-tratamento, segundo proposto por Scolastici e colaboradores (2008). Esses dois protocolos de tratamento permitiram a identificação do mecanismo de ação antigenotóxica das diferentes concentrações dos extratos e frações da espécie vegetal proposta para estudo. O ensaio de antigenotoxicidade foi realizado a partir de concentrações não genotóxicas obtidas através do ensaio de genotoxicidade. A figura 6 demonstra imagens ilustrativas de diferentes tipos de danos encontrados no ensaio do cometa.

As células HepG2 foram cultivadas em placas de 24 poços (2,5x10⁵ células/poço), após 24 horas de cultivo, o tratamento foi realizado da seguinte forma:

No pré-tratamento as células foram submetidas a diferentes concentrações não genotóxicas dos extratos e frações de *E. jambolana*, seguindo uma diluição seriada de 1:2 (EB-Fo: 1,25, 0,62 e 0,31 µg/mL; BU-Fo: 0,62, 0,312 e 0,15 µg/mL; EB-Fr: 0,62, 0,31 e 0,15 µg/mL; HA-Fr: 0,62, 0,31 e 0,15 µg/mL), resultando em um volume final de 500µL/poço, após 24 horas o meio de cultura com os tratamentos foi removido e foi adicionado 500 µL do indutor de dano, H₂O₂ diluído em meio de cultura, a 0,1M por 5 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com solução de Hanks, tripsinizadas, centrifugadas e o protocolo foi realizado como descrito anteriormente;

No pós-tratamento as células foram submetidas primeiramente ao indutor de dano, H₂O₂ diluído em meio de cultura, a 0,1M por 5 minutos, em seguida o H₂O₂ foi removido e as células foram expostas a diferentes concentrações não genotóxicas dos tratamentos. Após 24 horas o meio foi removido, as células foram lavadas com solução de Hanks, tripsinizadas, centrifugadas e o protocolo foi realizado como descrito anteriormente.

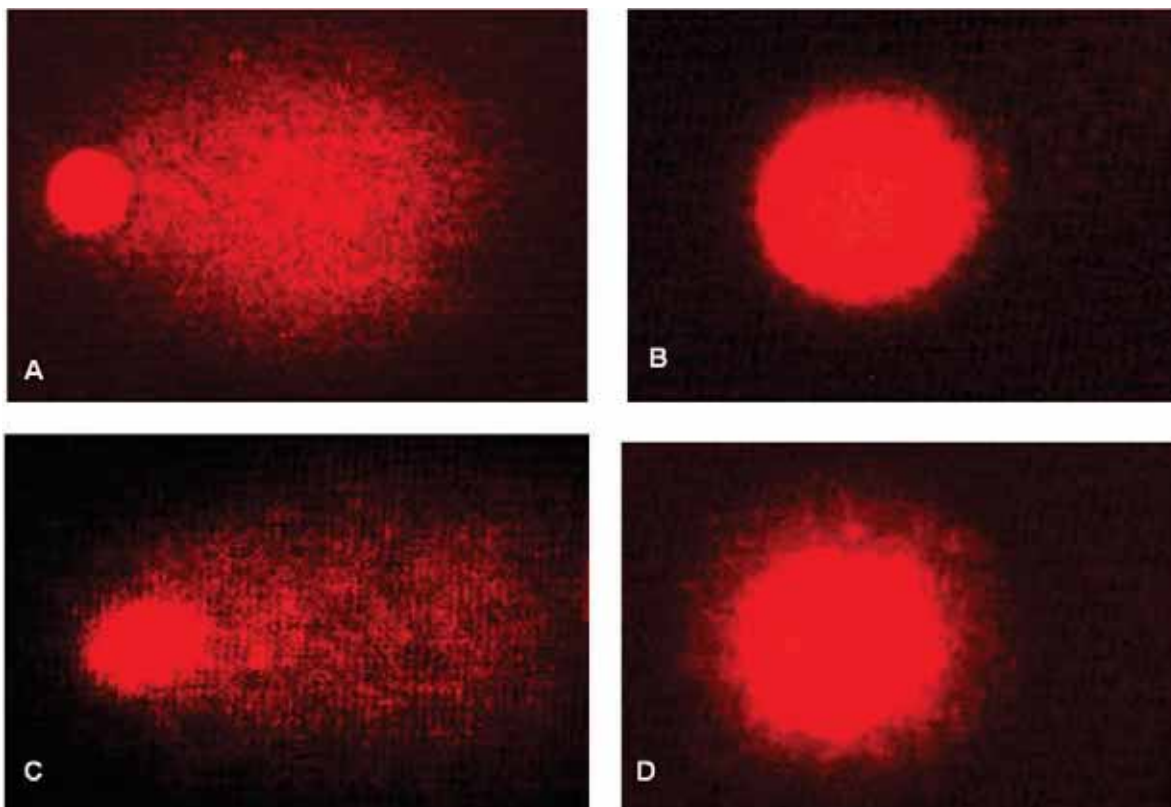


Figura 6. Imagens ilustrativas dos diferentes tipos de danos encontrados no ensaio do cometa, antigenotoxicidade. Controle positivo (A), controle negativo (B), pré-tratamento com extrato bruto do fruto de *E. jambolana* a 0,156 µg/mL (C) e pós-tratamento com extrato bruto do fruto de *E. jambolana* a 0,156

3.6. Teste do Micronúcleo

3.6.1. Soluções para o teste do Micronúcleo

Para a realização do teste do micronúcleo foi necessário preparar uma solução de KCl a 0,075M. Solução de metanol e ácido acético na relação de 3:1 respectivamente. Citocalasina B a 2,4 µg/mL. Corante Giemsa com tampão fosfato (pH 6,8) na relação de 20:1.

3.6.2. Avaliação da Mutagenicidade

O micronúcleo (MN) representa a perda da cromatina devido a dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico, sendo caracterizado como uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo

principal (FENECH, 1997). Para a avaliação do potencial mutagênico dos extratos e frações de *E. jambolana*, foi realizado o teste do micronúcleo de acordo com o protocolo proposto por Fenech (2000).

As células HepG2 foram cultivadas em placas de 100x20mm (1×10^6 células/placa), e após 24 horas de cultivo, as células foram tratadas com os extratos e frações de *E. jambolana* seguindo uma diluição seriada de 1:2 (EB-Fo: 1,25, 0,62 e 0,31 $\mu\text{g/mL}$; BU-Fo: 0,62, 0,312 e 0,15 $\mu\text{g/mL}$; EB-Fr: 0,62, 0,31 e 0,15 $\mu\text{g/mL}$; HA-Fr: 0,62, 0,31 e 0,15 $\mu\text{g/mL}$), resultando em um volume final de 5mL/poço. Após 24 horas o meio de cultura com os tratamentos foi removido, e um novo meio de cultura, contendo citocalasina B na concentração de 2,4 $\mu\text{g/mL}$ foi adicionado, por 48 horas e ao abrigo da luz.

Após 48 horas o meio de cultura contendo citocalasina B foi removido, as células foram lavadas com solução de Hanks, tripsinizadas e centrifugadas a 1200 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas, vagarosamente em 4 mL de solução de KCl gelada (solução hipotônica) e 1 mL do fixador (solução de metanol e ácido acético), foram então centrifugadas a 800 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e 4 mL da solução de metanol e ácido acético foi cuidadosamente adicionado, foi acrescentado também duas gotas de formaldeído, as células foram centrifugadas a 800 rpm por 6 minutos. Em seguida, 3 mL do sobrenadante foi removido, as células foram ressuspensas nos 2 mL restantes e espalhadas em várias lâminas. Quando as lâminas já estavam secas, as mesmas foram coradas com Giemsa por 4 minutos, posteriormente, foram lavadas duas vezes em um fio de água corrente e permaneceram em condição ambiente até o momento da análise.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum em magnitude de 400x e 1000 células binucleadas, com citoplasma íntegro e núcleos

principais nitidamente delimitados foram contados e analisadas a frequência de micronúcleos.

Em seguida, foi realizado também a contagem para a determinação do índice de divisão nuclear (IDN), em que foi considerado a frequência de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos em 1000 células analisadas. O IDN foi dado pela fórmula abaixo, onde M1 a M4 representam o número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos e o N representa o total de células, de acordo com Eastmond e Tucker (1989). A frequência de micronúcleos e os IDNs foram calculados a partir de três experimentos independentes.

$$\text{IDN} = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N$$

3.6.3. Avaliação da Antimutagenicidade

A avaliação do potencial antimutagênico dos extratos e frações de *E. jambolana*, foi realizada através do teste do micronúcleo de acordo com o protocolo proposto por Fenech (2000), sendo utilizado como agente indutor de dano o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), foram realizados os protocolos de pré e pós-tratamento.

As células HepG2 foram cultivadas em placas de 100x20mm (1x10⁶ células/placa), após 24 horas de cultivo o tratamento foi realizado da seguinte forma:

No pré-tratamento as células foram submetidas a diferentes concentrações não genotóxicas dos extratos e frações de *E.jambolana*, seguindo uma diluição seriada de 1:2, resultando em um volume final de 5 mL/placa, após 24 horas o meio de cultura com os tratamentos foi removido e foi adicionado 5 mL do indutor de dano, H₂O₂ a 0,1M, diluído em meio de cultura, por 5 minutos. Em seguida o H₂O₂ foi removido e o meio de cultura, contendo citocalasina B (para interromper a citocinese) na concentração de 2,4 µg/mL foi adicionado, por 48 horas e ao abrigo da luz.

No pós-tratamento as células foram submetidas primeiramente ao indutor de dano, H₂O₂ a 0,1M diluído em meio de cultura, por 5 minutos, em seguida o H₂O₂ foi

removido e as células foram expostas a diferentes concentrações não genotóxicas dos tratamentos. Após 24 horas o meio de cultura com os tratamentos foi removido, e um novo meio de cultura, contendo citocalasina B na concentração de 2,4 µg/mL foi adicionado, por 48 horas e ao abrigo da luz.

Após 48 horas o meio de cultura contendo citocalasina B foi removido, as células foram lavadas com solução de Hanks, tripsinizadas, centrifugadas e o protocolo foi realizado como descrito anteriormente.

3.7. Análise Estatística

Para comparação dos resultados de citotoxicidade e do potencial de indução de quinona-redutase a partir do tratamento com *E. jabolana* foi utilizado a análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Os resultados quantitativos de genotoxicidade e antigenotoxicidade do tratamento com *E. jabolana* comparados com o controle negativo e controle positivo respectivamente, foi aplicado o teste de *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. As análises foram realizadas com *software GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA)*. Para a frequência de micronúcleos comparada com o controle negativo e positivo (mutagenicidade e antimutagenicidade, respectivamente) foi utilizado análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Dunnet e para IDNs o teste aplicado foi a análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Tukey, com o auxílio do *software BioEstat 5.0*. Para a aplicação das análises de variância *One-way* ANOVA foram primeiramente avaliados se os dados possuíam distribuição normal. Em todos os testes estatísticos foi considerado o nível de significância de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Atividade da Quinona-redutase

Após tratamento da linhagem celular Hepa 1c1c7 com extratos e frações das folhas e dos frutos de *Eugenia jambolana*, pôde-se observar um potencial efeito quimiopreventivo a partir de dois extratos brutos e duas frações analisadas dentro do rastreamento bioguiado. Foram realizados três experimentos independentes para avaliar a capacidade de indução da atividade da enzima quinona-redutase e a viabilidade celular pelo ensaio do violeta cristal em linhagem celular Hepa 1c1c7, levando em consideração a indução do controle positivo (β -naftoflavona) que possui uma taxa de indução igual ou superior a duas vezes em relação ao controle negativo. Considerando assim um indutor da atividade da enzima quinona-redutase, as concentrações que apresentaram uma taxa de indução igual ou superior a duas vezes.

O extrato bruto das folhas (EB-Fo) e o extrato bruto dos frutos (EB-Fr) de *E. jambolana* apresentaram indução da atividade da enzima quinona-redutase nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 $\mu\text{g/mL}$ (EB-Fo) e 30 $\mu\text{g/mL}$ (EB-Fr). O índice de indução da enzima mostra que durante o tratamento de 48 horas das células com 5, 10, 20 e 30 $\mu\text{g/mL}$ do EB-Fo houve o aumento na atividade da enzima em $2,0 \pm 0,3$; $2,1 \pm 0,3$; $2,5 \pm 0,3$ e $2,3 \pm 0,2$ vezes, respectivamente. Em relação ao comportamento celular durante o ensaio, a porcentagem de células vivas, nessas concentrações foi de $90,9 \pm 4,5$; $89,3 \pm 5,5$; $74,7 \pm 13,1$ e $71 \pm 16,9\%$. As concentrações 1,25; 2,5; 5; 10 e 40 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram diferenças significativas em relação ao controle positivo (βNF) para a indução da enzima QR. Na análise da viabilidade celular não houve significância estatística em nenhuma das concentrações em relação ao controle negativo. (Figura 7). Durante o tratamento de 48 horas das células com 30 $\mu\text{g/mL}$ do EB-Fr, houve um aumento da indução da enzima em $2,0 \pm 0,1$ vezes e $88,4 \pm 5,7\%$ de células vivas. As concentrações 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 30 e 40 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram diferenças

significativas em relação ao controle positivo (β NF) para a indução da enzima QR. Na análise da viabilidade celular as concentrações não apresentaram significância estatística em relação ao controle negativo (Figura 8).

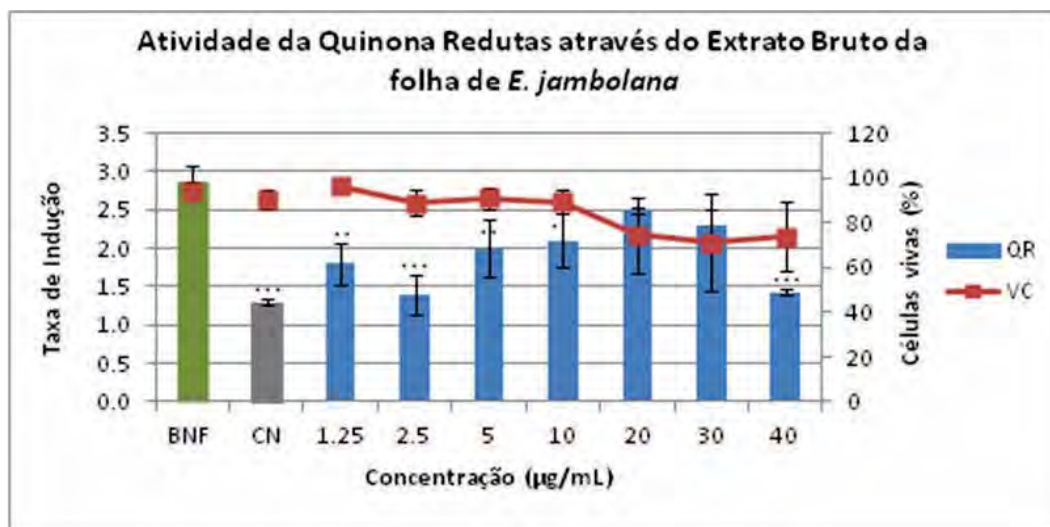


Figura 7. Indução da enzima quinona-redutase (QR) (média \pm erro padrão) em células Hepal1c7 através do EB-Fo (tratamento / controle) (■) e relação com viabilidade celular (%) pelo ensaio de violeta cristal (VC) (●) tratadas por 48h e comparadas com controle positivo β -naftoflavona (◆) a 0,1 μM , a atividade da enzima e com o controle negativo a viabilidade. Análise de variância *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

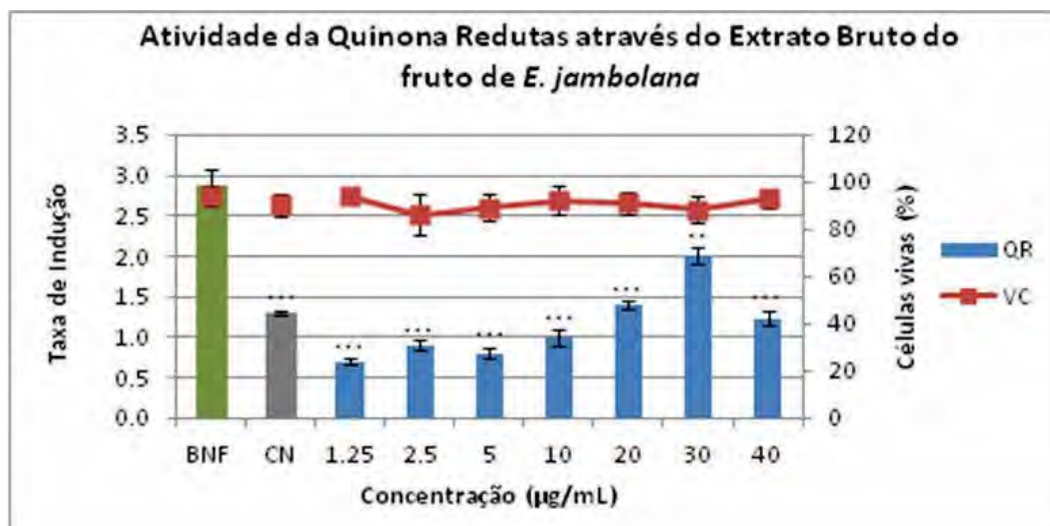


Figura 8. Indução da enzima quinona-redutase (QR) (média \pm erro padrão) em células Hepal1c7 através do EB-Fr (tratamento / controle) (■) e relação com viabilidade celular (%) pelo ensaio de violeta cristal (VC) (●) tratadas por 48h e comparadas com controle positivo β -naftoflavona (◆) a 0,1 μ M, a atividade da enzima e com o controle negativo a viabilidade. Análise de variância *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$

O tratamento da linhagem celular Hepa 1c1c7 com a fração n-butanólica da folha (BU-Fo) de *E. jambolana* (Figura 9), apresentou indução da atividade da enzima quinona-redutase nas concentrações de 2,5, 20, 30 e 40 μ g/mL. O índice de indução da enzima mostra que durante o tratamento de 48 horas das células com as concentrações da fração escolhida foram capazes de aumentar a atividade da enzima em $2,1 \pm 0,3$; $2,0 \pm 0,3$; $2,6 \pm 0,3$; $2,8 \pm 0,3$ vezes respectivamente, nenhuma das concentrações apresentou diferença significativa quando comparadas com o controle positivo (β NF). Em relação à viabilidade celular observou-se $95,1 \pm 3,1$; $96,8 \pm 2,4$; $52,4 \pm 13,8$ e $46,3 \pm 3,7\%$ de células vivas, não houve significância estatística em nenhuma das concentrações em relação ao controle negativo, exceto na concentração de 40 μ g/mL ($p < 0,05$).

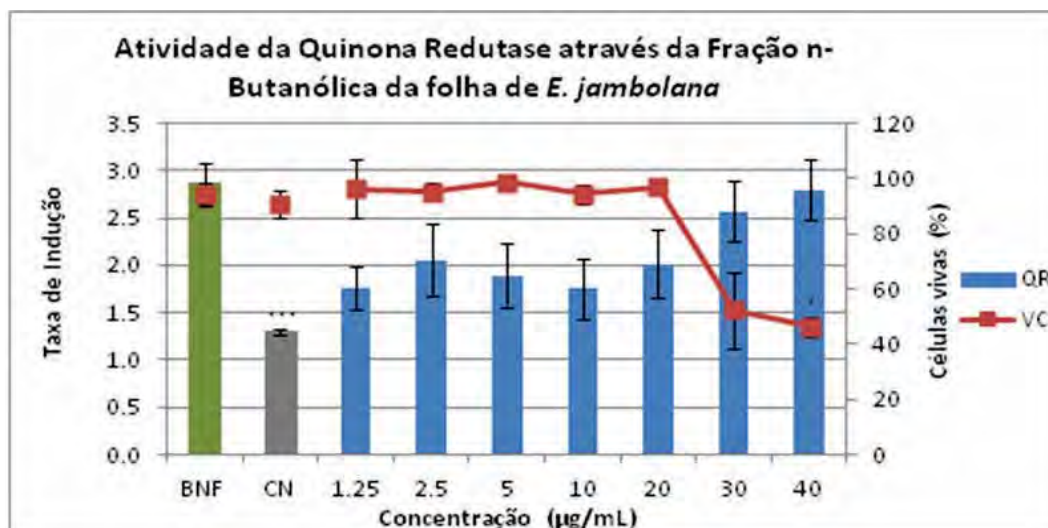


Figura 9. Indução da enzima quinona-redutase (QR) (média \pm erro padrão) em células Hepal1c7 através do BU-Fo (tratamento / controle) (■) e relação com viabilidade celular (%) pelo ensaio de violeta cristal (VC) (●) tratadas por 48h e comparadas com controle positivo β -naftoflavona (◆) a 0,1 μ M, a atividade da enzima e com o controle negativo a viabilidade. Análise de variância *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,001$.

A fração hidroalcoólica do fruto (HA-Fr) de *E. jambolana* (Figura 10) mostrou induzir a atividade da enzima quinona-redutase somente na concentração de 20 μ g/mL. O índice de indução da enzima mostra que durante o tratamento de 48 horas das células com 20 μ g/mL da fração foi capaz de aumentar a atividade da enzima em $2,5 \pm 0,06$ vezes e $93,3 \pm 3,6\%$ de células vivas. Pode-se observar que nas concentrações 1,25; 2,5; 5; 10; 30 e 40 μ g/mL não houve indução de quinona-redutase por apresentaram diferenças significativas em relação ao controle positivo (β NF) para a indução da enzima QR. Na análise da viabilidade celular nenhuma das concentrações apresentou significância estatística em relação ao controle negativo.

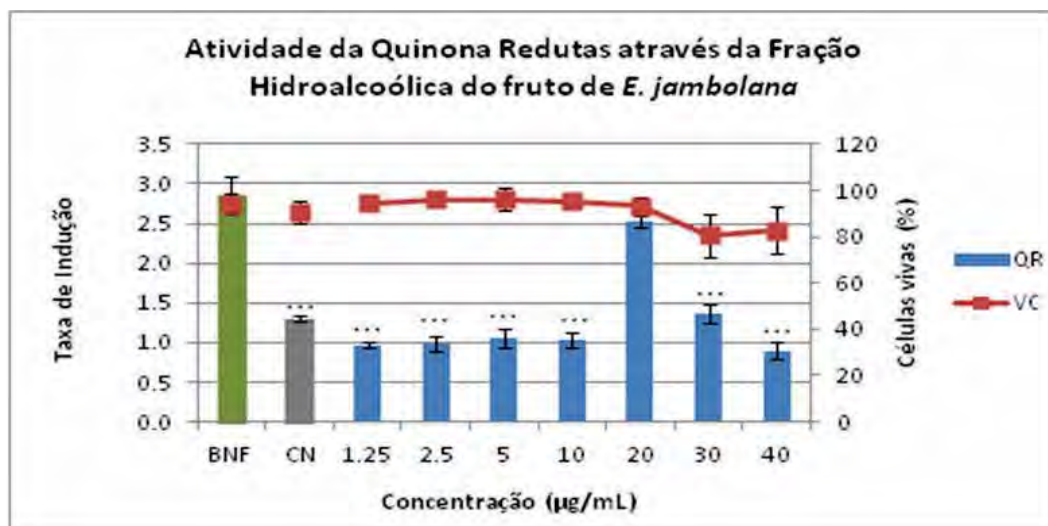


Figura 10. Indução da enzima quinona-redutase (QR) (média \pm erro padrão) em células Hepal1c7 através do BU-Fo (tratamento / controle) (■) e relação com viabilidade celular (%) pelo ensaio de violeta cristal (VC) (●) tratadas por 48h e comparadas com controle positivo β -naftoflavona (◆) a 0,1 μ M, a atividade da enzima e com o controle negativo a viabilidade. Análise de variância *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$.

Por se tratar de um estudo bioguiado, outras frações também foram testadas, a fim de verificar a possível indução da enzima quinona-redutase. Porém quando as células foram tratadas por 48 horas com as frações acetato de etila (AC-Fo), hidroalcoólica (HA-Fo) e hexânica (HEX-Fo) das folhas e frações acetato de etila (AC-Fr) e n-butanólica (BU-Fr) dos frutos de *E. jambolana* não foi observada indução significativa de QR nas concentrações testadas, de 1,25 a 20 μ g/mL ($p < 0,001$). Na tabela 2, pode-se observar o baixo índice de indução da enzima e a viabilidade celular das frações das folhas e dos frutos de *E. jambolana* na maior concentração testada (20 μ g/mL).

Somente os extratos e frações que apresentaram indução da atividade da enzima quinona-redutase foram testados nos experimentos posteriores.

Tabela 1: Atividade da enzima quinona-redutase através de frações das folhas e dos frutos de *Eugenia jambolana* em linhagem de células Hepa1c1c7.

Frações de <i>E. jambolana</i>	IR (tratamento/controle)	Viabilidade celular (%)
AC-Fo	1,1 ± 0,2 ^{***}	94,3 ± 2,9
HA-Fo	0,8 ± 0,03 ^{***}	93,3 ± 4,6
HEX-Fo	0,4 ± 0,05 ^{***}	96 ± 6,5
AC-Fr	0,6 ± 0,04 ^{***}	95,3 ± 8,9
BU-Fr	0,7 ± 0,05 ^{***}	96,8 ± 2,2
β-naftoflavona	2,9 ± 0,2	94,5 ± 4,2
CN	1,3 ± 0,03 ^{***}	90,5 ± 4,7

IR, taxa de indução de QR, relação entre a atividade específica da QR em células tratadas com composto e controle negativo. Viabilidade celular: porcentagem de células vivas na maior concentração testada (20 µg/mL). β-naftoflavona foi adotada como controle positivo. CN: controle negativo. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão de três experimentos independentes. IR comparado βNF e viabilidade com CN. Análise de variância *One-way* ANOVA com pós-teste de Tuckey. (***) $p < 0,001$.

Para caracterizar se uma substância é um indutor monofuncional ou bifuncional, foi realizado o mesmo ensaio, com extratos e frações que apresentaram indução da enzima na linhagem selvagem Hepa 1c1c7, na linhagem mutante TAOc1BP^rc1 e BP^rc1 (CUENDET *et al.*, 2006). Dessa maneira pode-se comparar a capacidade de indução enzimática de uma substância em linhagem selvagem (Hepa1c1c7) com o perfil da indução em linhagens mutantes (TAOc1BP^rc1 e BP^rc1). Porém nenhum dos extratos e frações foram capazes de induzir a enzima quinona-redutase nas linhagens mutantes. Dessa forma os dois extratos (EB-Fo e EB-Fr) e as duas frações (HA-Fr e BU-Fo) que apresentaram atividade da enzima quinona-redutase apenas na linhagem selvagem, podem ser considerados indutores bifuncionais.

4.2. Avaliação da citotoxicidade

Os resultados de citotoxicidade estão demonstrados na tabela 2. O EB-Fo e a fração BU-Fo das folhas, o EB-Fr e a fração HA-Fr dos frutos de *E. jabolana*, foram testados na concentração de 0,6 a 40 µg/mL, por meio do ensaio de citotoxicidade, baseado na coloração por SRB, obtendo-se o resultado em porcentagem da viabilidade celular em relação ao controle negativo.

Os tratamentos com *E. jabolana* foram avaliados em células HepG2, células que posteriormente foram utilizadas nos ensaios do cometa e micronúcleo. Na maior concentração, 40 µg/mL, todos os extratos e frações apresentaram entre 55 e 65% de células vivas e na menor concentração, 0,62 µg/mL, a viabilidade variou de 65 a 85%. Os extratos e frações de *E. jabolana* apresentaram um perfil semelhante em relação a viabilidade celular, porém os extratos e frações dos frutos (EB-Fr e HA-Fr) demonstraram uma maior porcentagem de células vivas, sendo que a partir da concentração de 1,25 µg/mL não houve diferença estatística significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), onde o EB-Fr apresentou uma viabilidade de $75,8 \pm 4,1\%$ e a HA-Fr de $82,3 \pm 2,1\%$. Entretanto alguns compostos apresentaram viabilidade celular abaixo do IC20.

Tabela 2: Determinação da viabilidade celular dos extratos e frações das folhas e dos frutos de *E. jambolana*, em linhagem de células HepG2, por meio da técnica de SRB.

Viabilidade Celular (%) ± EP					
	CP	9,2 ± 3			
	CN	94 ± 2,5			
Concentração (µg/mL)	EB-Fo	BU-Fo	EB-Fr	HA-Fr	
0,62	66,9 ± 1,6 ^{***}	73,5 ± 2,9 ^{***}	80,0 ± 3,6	83,3 ± 2,5	
1,25	67,0 ± 2,9 ^{***}	72,8 ± 3,4 ^{***}	75,8 ± 4,1	82,3 ± 2,1	
2,5	66,1 ± 1,8 ^{***}	72,3 ± 4,6 ^{***}	74,7 ± 4,9 [*]	73,2 ± 2,8 [*]	
5	60,3 ± 2,6 ^{***}	67,4 ± 2,6 ^{***}	67,4 ± 4,6 ^{**}	73,3 ± 4,2 ^{**}	
10	59,4 ± 1,7 ^{***}	66,5 ± 2,1 ^{***}	70,8 ± 4,8 [*]	71,9 ± 3,4 [*]	
20	60,1 ± 2,1 ^{***}	65,5 ± 2,7 ^{***}	72,3 ± 2,7 [*]	75,3 ± 3,5 [*]	
40	58,7 ± 3,6 ^{***}	60,3 ± 2,6 ^{***}	64,6 ± 3,5 ^{**}	62,9 ± 3,0 ^{**}	

Viabilidade celular é dada em porcentagem, a partir de 3 experimentos independentes (média ± erro padrão-EP). CP: controle positivo, H₂O₂ A 0,1 M. CN: controle negativo. Análise de variância *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. (*) p<0,05; (**) p<0,01; (***) p<0,001.

4.3. Avaliação da Genotoxicidade

Para caracterizar o potencial genotóxico dos extratos e frações, que apresentaram atividade quimiopreventiva a partir do ensaio da quinona-redutase, foi realizado o ensaio do cometa segundo protocolo estabelecido por Singh e colaboradores (1988). A avaliação da genotoxicidade foi realizada em linhagem HepG2 pela sua característica de linhagem celular metabolizadora. As concentrações utilizadas no ensaio foram pré-estabelecidas de acordo com o ensaio da quinona-redutase, ou seja, foram avaliadas inicialmente as concentrações que apresentaram indução da enzima quinona-redutase. Ainda, foi levado em consideração a viabilidade celular frente aos tratamentos com *E. jambolana*, que nessas concentrações, utilizando o ensaio de violeta cristal, foi de

aproximadamente 85%. Posteriormente, foram estabelecidas concentrações não genotóxicas para dar continuidade aos demais experimentos (antigenotoxicidade e antimutagenicidade). O parâmetro adotado no presente estudo foi a porcentagem de DNA na cauda. Infelizmente, as concentrações que se apresentaram positivas para o ensaio de quinona-redutase foram genotóxicas e somente nas menores concentrações, onde não se observa genotoxicidade também não houve estímulo de quinona-redutase.

O tratamento da linhagem celular HepG2 com extrato EB-Fo (tabela 3) e com a fração BU-Fo (tabela 4) de *E. jambolana* demonstrou que nas maiores concentrações, esses extratos e frações foram altamente genotóxicos. O EB-Fo demonstrou genotoxicidade da concentração de 5 µg/mL ($13,3 \pm 1,2\%$) $p < 0,05$ até a concentração de 40 µg/mL ($23,7 \pm 2,4\%$) $p < 0,001$, apresentando-se assim estatisticamente diferente do controle negativo. As concentrações de 0,62, 1,25 e 2,5 µg/mL ($6,6 \pm 1,1$; $6,7 \pm 0,9$; $7,2 \pm 1,3\%$, respectivamente) não apresentaram genotoxicidade, não apresentando diferença estatística quando comparadas com o controle negativo. A fração BU-Fo apresentou potencial genotóxico na concentração de 5 µg/mL ($13,4 \pm 1,3\%$) até 50 µg/mL ($28,2 \pm 1,1\%$), sendo diferente estatisticamente do controle negativo ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Entretanto, as concentrações de 0,31 ($6,3 \pm 1,9\%$), 0,62 ($7,6 \pm 1,1\%$), 1,25 ($9,8 \pm 1,3\%$) e 2,5 µg/mL ($10 \pm 1,1\%$) não apresentaram significância em relação ao controle negativo e, portanto não foram genotóxicas.

Tabela 3. Avaliação da genotoxicidade do extrato bruto das folhas de *Eugenia jambolana*.

	% DNA ± EP
CN	6,4 ± 1,6
CP	27,4 ± 1,4 ^{***}
EB-Fo de <i>E. jambolana</i> (µg/mL)	
0,62	6,6 ± 1,1
1,25	6,7 ± 0,9
2,5	7,2 ± 1,3
5	13,3 ± 1,2 [*]
10	14,1 ± 1,3 ^{***}
20	15,7 ± 1,6 ^{***}
30	19,4 ± 1,2 ^{***}
40	23,7 ± 2,4 ^{***}

CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da porcentagem de DNA ± erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (*) p<0,05 e (***) p<0,001.

Tabela 4. Avaliação da genotoxicidade da fração n-butanólica das folhas de *Eugenia jambolana*.

	% DNA ± EP
CN	5,8 ± 1,5
CP	29,5 ± 1,4 ^{***}
BU-Fo de <i>E. jambolana</i> (µg/mL)	
0,31	6,3 ± 1,9
0,62	7,6 ± 1,1
1,25	9,8 ± 1,3
2,5	10 ± 1,1
5	13,4 ± 1,3 ^{**}
10	16,3 ± 1,2 ^{***}
20	18,8 ± 1,4 ^{***}
30	24,1 ± 1,7 ^{***}
40	22,4 ± 1,9 ^{***}
50	28,2 ± 1,1 ^{***}

CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da porcentagem de DNA ± erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (**) p<0,01 e (***) p<0,001.

Os extratos e frações dos frutos, extrato EB-Fr e fração HA-Fr, apresentam perfil genotóxico semelhante aos extratos e frações das folhas, nas maiores concentrações. O EB-Fr (tabela 5) apresentou potencial genotóxico, ou seja, capacidade de causar dano ao DNA celular de 5 (11,8 ± 1,1%) até 40 µg/mL (25,6 ± 1,2%), p<0,01 e p<0,001, respectivamente. Em concentrações menores como 0,31 (6,2 ± 1,2%), 0,62 (6,9 ± 1,1%), 1,25 (9,4 ± 1,1%) e 2,5 µg/mL (10,1 ± 1,8%), respectivamente, esses extratos e frações não são capazes de causar dano ao DNA, não apresentando assim diferença estatística do controle negativo.

Tabela 5. Avaliação da genotoxicidade do extrato bruto dos frutos de *Eugenia jambolana*.

	%DNA ± EP
CN	5,8 ± 1,5
CP	29,5 ± 1,4 ^{***}
EB-Fr de <i>E. jambolana</i> (µg/mL)	
0,31	6,2 ± 1,2
0,62	6,9 ± 1,1
1,25	9,4 ± 1,1
2,5	10,1 ± 1,8
5	11,8 ± 1,1 ^{**}
10	13,5 ± 1,4 ^{***}
20	20 ± 1,3 ^{***}
30	25,9 ± 1,5 ^{***}
40	25,6 ± 1,2 ^{***}

CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da porcentagem de DNA ± erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (**) p<0,01 e (***) p<0,001.

A fração HA-Fr (tabela 6) causou dano significativo no DNA das células nas concentrações de 5 (12,3 ± 1,2%) até 30 µg/mL (20,8 ± 1,7%) p<0,001. Nas menores concentrações, 0,31 (6,1 ± 0,7%), 0,62 (7,7 ± 1,0%), 1,25 (10,9 ± 1,2%) e 2,5 µg/mL (9,5 ± 1,8%), não houve a presença de genotoxicidade, não apresentando diferença estatística significativa em relação ao controle negativo.

Tabela 6. Avaliação da genotoxicidade da fração hidroalcoólica dos frutos de *Eugenia jambolana*.

	%DNA ± EP
CN	6,4 ± 1,6
CP	27,4 ± 1,4 ^{***}
HA-Fr de <i>E. jambolana</i> (µg/mL)	
0,31	6,1 ± 0,7
0,62	7,7 ± 1,0
1,25	10,9 ± 1,2
2,5	9,5 ± 1,8
5	12,3 ± 1,2 ^{***}
10	13,1 ± 1,6 ^{***}
20	12 ± 1,0 ^{***}
30	20,8 ± 1,8 ^{***}

CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da porcentagem de DNA ± erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (***) p<0,001.

4.4. Avaliação da Antigenotoxicidade

Para caracterização do potencial antigenotóxico dos extratos e frações de *E. jambolana*, foi realizado o ensaio do cometa onde se empregou os protocolos de pré e pós-tratamento, proposto por Scolastici e colaboradores (2008). A avaliação da antigenotoxicidade foi realizada em linhagem HepG2 e os tratamentos foram realizados a partir de concentrações não genotóxicas, obtidas no ensaio do cometa através do protocolo de genotoxicidade (descrito acima).

O extrato EB-Fo (tabela 7) foi avaliado quanto ao seu perfil antigenotóxico nas concentrações de 0,31, 0,62 e 1,25 µg/mL, pôde-se observar que no pré-tratamento o presente extrato provocou um aumento no dano do DNA, causado pelo mutágeno (H₂O₂), obtendo-se 65,5 ± 1,3, 62,4 ± 1,5, 62,9 ± 1,4%, respectivamente, apresentando diferença estatística significativa em relação ao controle positivo p<0,001, ultrapassando o resultado obtido nesse controle (24,7 ± 1,6%). Por outro lado o pós-tratamento com EB-Fo demonstrou um efeito bioantimutagênico frente ao dano causado pelo H₂O₂ após um tempo de recuperação de 24 horas, nas concentrações de 0,62 (10,2

$\pm 1,0\%$) e $1,25 \mu\text{g/mL}$ ($11,4 \pm 1,2\%$), apresentando diferença estatística em relação ao controle positivo $p < 0,01$. A concentração de $0,31 \mu\text{g/mL}$ ($15 \pm 1,1\%$) não apresentou significância estatística em relação ao controle positivo, ressaltando que esses resultados do pós-tratamento são menores que o controle positivo.

Tabela 7. Avaliação da antigenotoxicidade do extrato bruto das folhas de *Eugenia jambolana*.

		% DNA \pm EP	
		Pré	Pós
	CN	$7,4 \pm 1,3^{***}$	$5,8 \pm 1,2^{***}$
	CP	$24,7 \pm 1,6$	$22,3 \pm 1,8$
	EB-Fo ($\mu\text{g/mL}$)		
	0,31	$65,5 \pm 1,3^{***}$	$15 \pm 1,1$
	0,62	$62,4 \pm 1,5^{***}$	$10,2 \pm 1^{**}$
	1,25	$62,9 \pm 1,4^{***}$	$11,4 \pm 1,2^{**}$

CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da porcentagem de DNA na cauda \pm erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

A fração BU-Fr (tabela 8) foi avaliada nas concentrações de $0,15$, $0,31$ e $0,62 \mu\text{g/mL}$. No pré-tratamento com essa fração, foi observada também potencial dano no DNA celular, em que as concentrações de $0,15$, $0,31$ e $0,62 \mu\text{g/mL}$ apresentaram fragmentação do DNA de $63,5 \pm 1,3$, $56,7 \pm 1,4$, $53,1 \pm 1,7\%$, respectivamente, apresentando diferença estatística em relação ao controle positivo ($p < 0,001$), (valores ultrapassam o controle). O pós-tratamento demonstrou redução do dano nas concentrações de $0,31$ ($11,2 \pm 1,3\%$) e $0,62 \mu\text{g/mL}$ ($9,6 \pm 1,0$), apresentando diferença estatística em relação ao controle positivo ($p < 0,01$ e $p < 0,001$), respectivamente, (valores menores que o controle). Entretanto, a concentração de $0,15 \mu\text{g/mL}$ não

apresentou diferença estatística em relação ao controle positivo, não sendo considerada antigenotóxica.

Tabela 8. Avaliação da antigenotoxicidade da fração n-butanólica das folhas de *Eugenia jambolana*.

	% DNA \pm EP	
	Pré	Pós
CN	7,4 \pm 1,3 ^{***}	5,8 \pm 1,2 ^{***}
CP	24,7 \pm 1,6	22,3 \pm 1,8
BU-Fo ($\mu\text{g/mL}$)		
0,15	63,5 \pm 1,3 ^{***}	16,2 \pm 1
0,31	56,7 \pm 1,4 ^{***}	11,2 \pm 1,3 ^{**}
0,62	53,1 \pm 1,7 ^{***}	9,6 \pm 1 ^{***}

CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da porcentagem de DNA na cauda \pm erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (***) $p < 0,001$; (***) $p < 0,001$.

Os extratos e frações dos frutos de *E. jambolana* apresentaram o mesmo perfil de potencial dano ao DNA no pré-tratamento e ação bioantimutagênica no pós-tratamento. O extrato EB-Fr e a fração HA-Fr foram testadas nas concentrações de 0,15, 0,31 e 0,62 $\mu\text{g/mL}$. No pré-tratamento, o EB-Fr apresentou, nessas concentrações, 63,9 \pm 1,8, 68,5 \pm 1,4 e 72,9 \pm 1,3% de DNA na cauda, com diferença estatística em relação ao controle positivo $p < 0,001$ (valores ultrapassam o controle). Na fração HA-Fr, nas mesmas concentrações de 0,15, 0,31 e 0,62 $\mu\text{g/mL}$, apresentou 55,6 \pm 1,3, 58,6 \pm 1,6 e 59,5 \pm 1,5% de DNA na cauda, respectivamente, com significância estatística ($p < 0,001$) em relação ao controle positivo (valores também ultrapassam o controle).

No pós-tratamento, as três concentrações tanto do extrato EB-Fr (tabelas 9) quanto da fração HA-Fr (tabela 10) apresentaram diferença estatística em relação ao controle positivo, demonstrando ser capaz de reduzir o dano causado pelo H_2O_2 após um

tempo de recuperação. O extrato EB-Fr apresentou $7,7 \pm 1,1$ ($0,15 \mu\text{g/mL}$), $9,8 \pm 1,4$ ($0,31 \mu\text{g/mL}$) e $10,3 \pm 1,9\%$ ($0,62 \mu\text{g/mL}$) de DNA na cauda, $p < 0,001$. E a fração HA-Fr $9,5 \pm 1,2$ ($0,15 \mu\text{g/mL}$), $11,6 \pm 1,3$ ($0,31 \mu\text{g/mL}$) e $10,5 \pm 1,5\%$ ($0,62 \mu\text{g/mL}$) $p < 0,001$.

Tabela 9. Avaliação da antigenotoxicidade do extrato bruto dos frutos de *Eugenia jambolana*.

	% DNA \pm EP	
	Pré	Pós
CN	$6,3 \pm 1,5^{***}$	$7,1 \pm 1,7^{***}$
CP	$26,4 \pm 1,7$	$24,2 \pm 1,9$
EB-Fr ($\mu\text{g/mL}$)		
0,15	$63,9 \pm 1,8^{***}$	$7,7 \pm 1,1^{***}$
0,31	$68,5 \pm 1,4^{***}$	$9,8 \pm 1,4^{***}$
0,62	$72,9 \pm 1,3^{***}$	$10,3 \pm 1,9^{***}$

CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da porcentagem de DNA na cauda \pm erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (***) $p < 0,001$.

Tabela 10. Avaliação da antigenotoxicidade da fração hidroalcoólica dos frutos de *Eugenia jambolana*.

	% DNA \pm EP	
	Pré	Pós
CN	$6,3 \pm 1,5^{***}$	$7,1 \pm 1,7^{***}$
CP	$26,4 \pm 1,7$	$24,2 \pm 1,9$
HA-Fr ($\mu\text{g/mL}$)		
0,15	$55,6 \pm 1,3^{***}$	$9,5 \pm 1,2^{***}$
0,31	$58,6 \pm 1,6^{***}$	$11,6 \pm 1,3^{***}$
0,62	$59,5 \pm 1,5^{***}$	$10,5 \pm 1,5^{***}$

CN: controle negativo. CP: controle positivo. Resultados estão expressos como média da porcentagem de DNA na cauda \pm erro padrão. Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn. (***) $p < 0,001$.

4.5. Avaliação da Mutagenicidade

Para caracterização do potencial mutagênico dos extratos e frações de *E. jambolana*, foi realizado o teste do micronúcleo, segundo o protocolo de Fenech (2000) com algumas modificações. A avaliação da mutagenicidade foi realizada em linhagem HepG2 e os tratamentos foram os mesmos empregados na avaliação da antigenotoxicidade e antimutagenicidade, ou seja, concentrações não genotóxicas.

Um número elevado na FMN foi observado no controle positivo, o que era esperado, e foi estatisticamente diferente do controle negativo em todas as condições.

O tratamento da linhagem celular HepG2 com extrato EB-Fo (tabela 11) de *E. jambolana* demonstrou que em todas as concentrações testadas (0,31, 0,62 e 1,25 µg/mL) não houve aumento significativo na FMN, neste caso essas concentrações não apresentaram diferença significativa do controle negativo. O mesmo foi observado após análise do IDN, que apresentou diferença estatística significativa do controle negativo somente em relação ao controle positivo $p < 0,001$, indicando uma falta de uniformidade na divisão nuclear do controle positivo.

Tabela 11. Avaliação da mutagenicidade do extrato bruto da folha de *Eugenia jambolana*

Extrato Bruto da folha de <i>E. jambolana</i>		
Concentração (µg/mL)	FMN (por 1000 células binucleadas)	IDN
CP	155,7 ± 5,8 ^{***}	1,4 ± 0,006 ^{***}
CN	26,3 ± 4,1	1,6 ± 0,01
0,31	40 ± 4,2	1,5 ± 0,003
0,62	39 ± 3,1	1,6 ± 0,003
1,25	43,7 ± 3,2	1,6 ± 0,003

CP: controle positivo. CN: controle negativo. FMN: Frequência de micronúcleos em 1000 células binucleadas. IDN: índice de divisão nuclear. Resultados estão expressos como média ± erro padrão (M ± EP). (***) $p < 0,001$ em relação ao CN. Análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Dunnet para FMN. Análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Tukey para IDNs.

A fração BU-Fo (tabela 12) apresentou um aumento na FMN nas concentrações testadas, 0,15 $\mu\text{g/mL}$ ($48,3 \pm 2,6$), 0,31 $\mu\text{g/mL}$ ($48 \pm 3,1$) e 0,62 $\mu\text{g/mL}$ ($46 \pm 1,6$), quando comparadas com o controle negativo. Para esta fração o IDN dos tratamentos não apresentou diferença estatística do controle negativo, sugerindo assim uniformidade na divisão nuclear.

Tabela 12: Avaliação da mutagenicidade da fração n-butanólica da folha de *Eugenia jambolana*

Fração n-Butanólica da folha de *E. jambolana*

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	FMN (por 1000 células binucleadas)	IDN
CP	$155,7 \pm 5,8^{***}$	$1,4 \pm 0,006^{***}$
CN	$26,3 \pm 4,1$	$1,6 \pm 0,01$
0,15	$48,3 \pm 2,6^{**}$	$1,5 \pm 0,012$
0,31	$48 \pm 3,1^{**}$	$1,6 \pm 0,003$
0,62	$46 \pm 1,6^{**}$	$1,5 \pm 0,003$

CP: controle positivo. CN: controle negativo. FMN: Frequência de micronúcleos em 1000 células binucleadas. IDN: índice de divisão nuclear. Resultados estão expressos como média \pm erro padrão ($M \pm EP$). (***) $p < 0,001$, (**) $p < 0,01$ em relação ao CN. Análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Dunnet para FMN. Análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Tukey para IDNs.

As tabelas 13 e 14 demonstram os tratamentos com os extratos e frações dos frutos de *E. jambolana*, EB-Fr e HA-Fr. O extrato EB-Fr assim como a fração HA-Fr não apresentaram aumento significativo na FMN nas concentrações testadas de 0,15 a 0,62 $\mu\text{g/mL}$, não apresentando diferença estatística do controle negativo e portanto não apresentando efeito mutagênico. Em relação ao IDN pôde-se observar que ambos os extratos e frações apresentaram uniformidade durante a divisão nuclear em todas as concentrações (0,15, 0,31 e 0,62 $\mu\text{g/mL}$), sendo novamente iguais estatisticamente ao controle negativo, somente o controle positivo apresentou perda da uniformidade na divisão nuclear sendo assim diferente estatisticamente do controle negativo.

Tabela 13: Avaliação da mutagenicidade do extrato bruto do fruto de *Eugenia jambolana***Extrato Bruto do fruto de *E. jambolana***

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	FMN (por 1000 células binucleadas)	IDN
CP	155,7 \pm 5,8 ^{***}	1,4 \pm 0,006 ^{***}
CN	26,3 \pm 4,1	1,6 \pm 0,01
0,15	31,7 \pm 3,2	1,5 \pm 0,003
0,31	26,7 \pm 2,3	1,5 \pm 0,003
0,62	29 \pm 2,1	1,5 \pm 0,003

CP: controle positivo. CN: controle negativo. FMN: Frequência de micronúcleos em 1000 células binucleadas. IDN: índice de divisão nuclear. Resultados estão expressos como média \pm erro padrão (M \pm EP). (***) $p < 0.001$ em relação ao CN. Análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Dunnet para FMN. Análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Tukey para IDNs.

Tabela 14: Avaliação da mutagenicidade da fração hidroalcoólica do fruto de *Eugenia jambolana***Fração Hidroalcoólica do fruto de *E. jambolana***

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	FMN (por 1000 células binucleadas)	IDN
CP	155,7 \pm 5,8 ^{***}	1,4 \pm 0,006 ^{***}
CN	26,3 \pm 4,1	1,6 \pm 0,01
0,15	24 \pm 3,2	1,5 \pm 0,003
0,31	26,3 \pm 2,6	1,5 \pm 0,003
0,62	34 \pm 4,6	1,5 \pm 0,006

CP: controle positivo. CN: controle negativo. FMN: Frequência de micronúcleos em 1000 células binucleadas. IDN: índice de divisão nuclear. Resultados estão expressos como média \pm erro padrão (M \pm EP). (***) $p < 0.001$ em relação ao CN. Análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Dunnet para FMN. Análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Tukey para IDNs.

4.6. Avaliação da Antimutagenicidade

Para caracterização do potencial antimutagênico dos extratos e frações de *E. jambolana*, foi realizado o teste do micronúcleo, segundo o protocolo de Fenech (2000) com algumas modificações, a partir dos dados de pré e pós-tratamento da antigenotoxicidade. A avaliação da antimutagenicidade foi realizada em linhagem HepG2 e os tratamentos foram os mesmos empregados na avaliação da antigenotoxicidade, ou seja, concentrações não genotóxicas.

Em ambos os tratamentos (pré e pós) e em todos os extratos e frações testados, observou-se um padrão concentração-resposta em relação à frequência de micronúcleos, uma vez que as maiores concentrações houve uma atenuação contra o dano induzido pelo H₂O₂, reduzindo a frequência de micronúcleos, demonstrando assim que os extratos e frações de *E. jambolana* podem atuar através da maquinaria celular como possíveis agentes antimutagênicos.

Um número elevado na frequência de micronúcleos (FMN) foi observado somente no controle positivo, o que era esperado e foi estatisticamente diferente do controle negativo em todas as condições.

No pré-tratamento com o extrato EB-Fo (tabela 15) de *E. jambolana*, houve uma redução significativa na FMN quando comparado com o controle positivo ($184 \pm 10,4$) nas concentrações testadas, 0,31 ($98,6 \pm 7,5$), 0,62 ($47 \pm 8,3$) e 1,25 $\mu\text{g/mL}$ ($42,6 \pm 2,3$) $p < 0,001$. O Índice de Divisão Nuclear (IDN) também foi calculado, a fim de analisar se divisão celular ocorreu de maneira uniforme em todos os tratamentos. Para o EB-Fo o IDN no pré-tratamento não apresentou diferença estatística significativa das concentrações em relação ao controle negativo de 0,62 e 1,25 $\mu\text{g/mL}$. No pós-tratamento ocorreu uma redução mais acentuada na FMN quando comparado com o pré-tratamento e com controle positivo para as concentrações testadas 0,31 ($59 \pm 6,4$), 0,62

(61,6 ± 7,5) e 1,25 µg/mL (34 ± 4,3), apresentando significância em relação ao controle positivo (p<0,001). O IDN demonstrou discreta diferença estatística do controle negativo somente nas concentrações de 0,62 e 1,25 µg/mL.

Tabela 15. Avaliação da antimutagenicidade do extrato bruto das folhas de *Eugenia jambolana*

Extrato Bruto da Folha de *E. jambolana*

Concentração (µg/mL)	Pré-tratamento (M ± EP)		Pós-tratamento (M ± EP)	
	FMN (por 1000 células binucleadas)	IDN	FMN (por 1000 células binucleadas)	IDN
CP	184 ± 10,4	1,6 ± ,003	206 ± 4,9	1,7 ± 0,01
CN	19,33 ± 2,6 ^{***}	1,6±0,003	24 ± 3,6 ^{***}	1,7±0,007
0,31	98,6 ± 7,5 ^{***}	1,5±0,004	59 ± 6,4 ^{***}	1,6±0,004
0,62	47 ± 8,3 ^{***}	1,5±0,004	61,6 ± 7,5 ^{***}	1,4±0,004 ^{**}
1,25	42,66 ± 2,3 ^{***}	1,5±0,003	34 ± 4,3 ^{***}	1,5±0,003 [*]

CP: controle positivo. CN: controle negativo. FMN: Frequência de micronúcleos em 1000 células binucleadas. IDN: índice de divisão nuclear. Resultados estão expressos como média ± erro padrão (M ± EP). em relação ao CP, p<0,001. Análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Dunnet para FMN. Análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Tukey para IDNs em relação ao CN. (*) p<0.05, (**) p<0.01

O pré-tratamento com a fração BU-Fo de *E. jambolana* (tabela 16), nas concentrações de 0,15 (57,6 ± 5,5), 0,31 (34,3 ± 4,3) e 0,62 µg/mL (24 ± 2,8) demonstrou uma redução significativa na frequência de micronúcleos em relação ao controle positivo (184 ± 10,4) p<0,001. Pode-se constatar que no pré-tratamento houve uma relação concentração-resposta e claro efeito antimutagênico. O IDN apresentou discreta diferença estatística nas concentrações de 0,15 e 0,31 µg/mL em relação ao controle negativo (p<0,001). No pós-tratamento ocorreu uma redução menos acentuada na FMN quando comparado com o pré-tratamento. Mesmo assim as concentrações testadas 0,15 (81,3 ± 8,4), 0,31 (71 ± 6,2) e 0,62 µg/mL (77,3 ± 5,2) apresentaram

significância em relação ao controle positivo ($206 \pm 4,9$) $p < 0,001$. A diferença do IDN demonstrou-se discreta, com significância estatística apenas na concentração de 0,31 em relação ao controle negativo.

Tabela 16. Avaliação da antimutagenicidade da fração n-butanólica das folhas de *Eugenia jambolana*

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Pré-tratamento (M \pm EP)		Pós-tratamento (M \pm EP)	
	FMN (por 1000 células binucleadas)	IDN	FMN (por 1000 células binucleadas)	IDN
CP	$184 \pm 10,4$	$1,6 \pm 0,003$	$206 \pm 4,9$	$1,7 \pm 0,01$
CN	$19,3 \pm 2,6^{***}$	$1,6 \pm 0,003$	$24 \pm 3,6^{***}$	$1,7 \pm 0,007$
0,15	$57,6 \pm 5,5^{***}$	$1,3 \pm 0,003^{***}$	$81,3 \pm 8,4^{***}$	$1,6 \pm 0,003$
0,31	$34,3 \pm 4,3^{***}$	$1,3 \pm 0,003^{***}$	$71 \pm 6,2^{***}$	$1,5 \pm 0,004^*$
0,62	$24 \pm 2,8^{***}$	$1,5 \pm 0,004$	$77,3 \pm 5,2^{***}$	$1,6 \pm 0,004$

CP: controle positivo. CN: controle negativo. FMN: Frequência de micronúcleos em 1000 células binucleadas. IDN: índice de divisão nuclear. Resultados estão expressos como média \pm erro padrão (M \pm EP). em relação ao CP, $p < 0,001$. Análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Dunnet para FMN. Análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Tukey para IDNs em relação ao CN. (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,001$

A avaliação da antimutagenicidade dos extratos e frações dos frutos demonstrou que no pré-tratamento com o extrato EB-Fr (tabela 17) ocorreu uma redução significativa da frequência de micronúcleos, nas concentrações testadas 0,15 ($53,6 \pm 6,7$), 0,31 (45 ± 5) e 0,62 $\mu\text{g/mL}$ ($47,3 \pm 2,7$), em relação ao controle positivo $p < 0,001$ e o IDN não apresentou diferença estatística entre os tratamentos e controle negativo. As concentrações testadas no pós-tratamento foram 0,15 ($42,3 \pm 3,7$), 0,31 ($31,6 \pm 4$) e 0,62 $\mu\text{g/mL}$ ($23,6 \pm 3,1$) e apresentaram uma redução significativa na frequência de micronúcleos em relação ao controle positivo. No IDN ocorreu discreta falta de

uniformidade na divisão nuclear, com diferença estatística significativa das três concentrações em relação ao controle negativo $p < 0,001$.

Tabela 17. Avaliação da antimutagenicidade do extrato bruto dos frutos de *Eugenia jambolana*

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Pré-tratamento (M \pm EP)		Pós-tratamento (M \pm EP)	
	FMN (por 1000 células binucleadas)	IDN	FMN (por 1000 células binucleadas)	IDN
CP	184 \pm 10,4	1,6 \pm 0,003	206 \pm 4,9	1,7 \pm 0,01
CN	19,3 \pm 2,6 ^{***}	1,6 \pm 0,003	24 \pm 3,6 ^{***}	1,7 \pm 0,007
0,15	53,6 \pm 6,7 ^{***}	1,6 \pm 0,003	42,3 \pm 3,7 ^{***}	1,4 \pm 0,003 ^{***}
0,31	45 \pm 5 ^{***}	1,6 \pm 0,003	31,6 \pm 4 ^{***}	1,3 \pm 0,008 ^{***}
0,62	47,3 \pm 2,7 ^{***}	1,6 \pm 0,003	23,6 \pm 3,1 ^{***}	1,4 \pm 0,006 ^{***}

CP: controle positivo. CN: controle negativo. FMN: Frequência de micronúcleos em 1000 células binucleadas. IDN: índice de divisão nuclear. Resultados estão expressos como média \pm erro padrão (M \pm EP), em relação ao CP, $p < 0,001$. Análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Dunnet para FMN. Análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Tukey para IDNs em relação ao CN. (***) $p < 0,001$

Na tabela 18 pode-se observar que o pré-tratamento com a fração HA-Fr, nas concentrações de 0,15 (46,5 \pm 7,3), 0,31 (47 \pm 6,4) e 0,62 $\mu\text{g/mL}$ (44,6 \pm 5,7), foi capaz de reduzir significativamente a frequência de micronúcleos em relação ao controle positivo $p < 0,001$. O IDN apresentou discreta perda de uniformidade de divisão nuclear, com diferença estatística significativa somente na concentração de 0,15 em relação ao controle negativo $p < 0,001$. No pós-tratamento o mesmo perfil foi observado nas concentrações avaliadas, 0,15 (63,3 \pm 3,48), 0,31 (46,6 \pm 4,32) e 0,62 $\mu\text{g/mL}$ (32,3 \pm 3,1) $p < 0,001$. Em relação ao IDN não houve perda de uniformidade na divisão nuclear.

Tabela 18. Avaliação da antimutagenicidade da fração hidroalcoólica dos frutos de *Eugenia jambolana*

Fração Hidroalcoólica do Fruto de *E. jambolana*

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Pré-tratamento (M \pm EP)		Pós-tratamento (M \pm EP)	
	FMN (por 1000 células binucleadas)	IDN	FMN (por 1000 células binucleadas)	IDN
CP	184 \pm 10,4	1,6 \pm 0,003	206 \pm 4,9	1,7 \pm 0,01
CN	19,3 \pm 2,6 ^{***}	1,6 \pm 0,003	24 \pm 3,6 ^{***}	1,7 \pm 0,007
0,15	46,5 \pm 7,3 ^{***}	1,4 \pm 0,005 ^{***}	63,3 \pm 3,4 ^{***}	1,6 \pm 0,004
0,31	47 \pm 6,4 ^{***}	1,5 \pm 0,003	46,6 \pm 4,3 ^{***}	1,6 \pm 0,004
0,62	44,6 \pm 5,7 ^{***}	1,6 \pm 0,003	32,3 \pm 3,1 ^{***}	1,6 \pm 0,004

CP: controle positivo. CN: controle negativo. FMN: Frequência de micronúcleos em 1000 células binucleadas. IDN: índice de divisão nuclear. Resultados estão expressos como média \pm erro padrão (M \pm EP). em relação ao CP, $p < 0,001$. Análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Dunnet para FMN. Análise de variância *One-way* (ANOVA) com pós-teste de Tukey para IDNs em relação ao CN. (***) $p < 0,001$

5. Discussão

5.1. Avaliação da atividade quimiopreventiva

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade como agentes analgésicos, tranqüilizantes, diuréticos, laxativos, antibióticos, entre outros, desde tempos imemoriais que se iniciou a partir da prática da medicina popular. Além disso, muitas drogas utilizadas atualmente na quimioterapia foram isoladas de espécies de plantas ou derivadas de um protótipo natural (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2005). Portanto, o uso de produtos naturais representa uma das estratégias mais bem sucedidas para a descoberta de novos medicamentos para diferentes terapias (BEZERRA *et al.*, 2008).

A flora brasileira é considerada a mais diversificada do mundo, com cerca de 120 mil espécies vegetais de aplicação terapêutica, sendo então considerado um local importante para a prospecção de novas substâncias devido à diversidade de espécies associada à riqueza química (YOUNES *et al.*, 2007).

Recentemente uma maior atenção vem sendo direcionada à prevenção do câncer, visando reduzir a sua incidência e mortalidade. De acordo com dados epidemiológicos e experimentais, que demonstram a associação entre dieta e risco de câncer, certos componentes presentes na alimentação possuem função quimiopreventiva, como por exemplo, alguns alimentos funcionais (KUCUK, 2002; GREENWALD, 2002). Deste modo, estratégias preventivas, como a quimioprevenção, que surge como uma opção terapêutica preventiva, objetivando prevenir, interromper ou reverter o processo de carcinogênese (WATTENBERG, 1985), é considerada promissora em especial com a associação aos produtos naturais.

No presente estudo, avaliou-se a atividade quimiopreventiva dos extratos e frações de *E. jabolana*, um estudo bioguiado, por meio do ensaio da quinona-redutase.

De acordo com Mahmoud *et al.* (2001) e Loguercio *et al.* (2005), as folhas de *E. jabolana* contêm uma mistura de polifenóis, especialmente flavonóides glicosilados,

ácidos fenólicos e são ricos em taninos e saponinas, já os frutos contêm vitamina C, ácido gálico, taninos e antocianinas. Um estudo conduzido por Plaza (2007) demonstrou que os extratos e frações de *E. jabolana* possuem uma clara atividade antioxidante. Frente a esses resultados, esses extratos e frações podem ser usados como potenciais agentes quimiopreventivos para doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, assim como, tratar inflamações e envelhecimento cutâneo, uma vez que essas substâncias antioxidantes combatem os radicais livres (PLAZA, 2007).

Na literatura, pouco se conhece a respeito dos extratos e frações de *E. jabolana* quanto à atividade quimiopreventiva. No presente estudo, houve indução da atividade da enzima quinona-redutase em dois extratos e duas frações de *E. jabolana*, em que a taxa de indução foi igual ou superior a duas vezes quando comparada ao controle negativo. Esse aumento da taxa de indução é uma evidência da atividade de quimioprevenção dos extratos e frações testados. O presente estudo demonstrou que o extrato bruto e a fração n-butanólica das folhas (EB-Fo e BU-Fo, respectivamente), e o extrato bruto e a fração hidroalcoólica dos frutos (EB-Fr e HA-Fr, respectivamente) induzem a duplicação da atividade da enzima quinona-redutase em diferentes concentrações, concomitantemente, por meio do ensaio do violeta cristal, esses extratos e frações também não demonstraram citotoxicidade na linhagem Hepa1c1c7 (Figuras 6, 7, 8 e 9), linhagem essa que contém quantidades de quinona-redutase induzíveis facilmente mensuráveis (PROCHASKA; SANTAMARIA, 1988).

O ensaio da quinona-redutase é considerado um rápido e quantitativo bioensaio que vem sendo amplamente utilizado para caracterizar a atividade indutora de uma variedade de compostos naturais ou sintéticos, bem como de extratos brutos de plantas (PROCHASKA; SANTAMARIA, 1988).

Um estudo realizado com extratos de uvas, que são frutas populares e cultivadas em todo o mundo, ricas em compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos, flavonóides e taninos condensados, demonstrou que os fitoquímicos presentes nas uvas, que também estão presentes em várias outras frutas e vegetais, são capazes de induzir potencialmente a atividade da enzima quinona-redutase em células Hepa 1c1c7 (YANG; LIU, 2009).

Os presentes resultados são relevantes no estudo de prevenção de câncer, uma vez que essa atividade proveniente de produtos naturais pode contribuir para o tratamento e prevenção do câncer (YANG; LIU, 2009). Além disso, os resultados corroboram com o trabalho publicado por Kang & Pezzuto (2004) em que os flavonóides (flavonas, antocianinas, isoflavonas) possuem múltiplos mecanismos, dentre eles a indução de enzimas destoxicantes.

Os agentes indutores de enzimas de destoxificação são classificados como monofuncionais e bifuncionais, respectivamente, pela sua capacidade de induzir seletivamente as enzimas da fase 2, ou de induzir ambas as enzimas de fases 1 e 2 (CUENDET *et al.*, 2006). A indução de enzimas da fase 2 pode proteger os sistemas biológicos contra espécies químicas tóxicas e reativas, e estudos recentes demonstram que a elevação dessas enzimas, como a NADPH: quinona-redutase e GST (Glutathione *S*-transferase) estão correlacionadas com a proteção celular nos estágios iniciais e intermediários contra a carcinogênese induzida por agentes químicos em modelos animais (WATTENBERG, 1985; SONG *et al.*, 1999; CUENDET *et al.*, 2006).

A fim de determinar a característica da indução enzimática, o presente estudo avaliou a capacidade de indução das enzimas de fase 1 ou fase 2 dos extratos e frações de *E. jambolana* nas linhagens mutantes, TAOc1BPr1 que é defeituosa no receptor AhR, e BPr1 que é incapaz de translocar o complexo ligante-receptor para o núcleo

(GERHÄUSER *et al.*, 1997). Dessa forma, foi possível observar que os extratos e frações tanto das folhas como dos frutos de *E. jambolana* não foram capazes de induzir a atividade da enzima quinona-redutase nas linhagens mutantes, caracterizando assim os compostos como indutores bifuncionais. Talalay *et al.* (1988) listou os flavonóides, que ocorrem em abundância na natureza em diversas plantas comestíveis como típicos indutores bifuncionais. No entanto, um outro estudo conduzido por Yannai *et al.* (1998) concluiu que os flavonóides podem ser classificados tanto como indutores mono ou bifuncionais.

5.2. Avaliação da citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade podem ser desenvolvidos em várias metodologias, tais como contagem celular, ensaios de sobrevivência clonogênica, medida de incorporação de nucleotídeos radiativos ou métodos colorimétricos (HENRIKSSON *et al.*, 2006). No caso dos métodos colorimétricos, a taxa de crescimento e multiplicação é medida indiretamente por algum indicador de crescimento, por meio do aparecimento de coloração e a intensidade de cor, que é diretamente proporcional ao número de células presentes (HOUGHTON *et al.*, 2007).

Dentre os diferentes tipos de ensaio colorimétricos, no presente estudo utilizou inicialmente a coloração por violeta cristal, cuja função é detectar as células vivas (HENRIKSSON *et al.*, 2006), ensaio este realizado paralelamente com a quantificação da atividade da enzima quinona-redutase em células Hepa 1c1c7, a fim de avaliar o comportamento celular, em relação a citotoxicidade, durante a quantificação da atividade da enzima (PROCHASKA *et al.*, 1992).

Na maioria dos resultados obtidos no ensaio do violeta cristal (Figuras 6, 7, 8 e 9; tabela 1), foi possível observar que tanto para os extratos como para as frações de *E.*

jambolana não houve diferença estatística significativa para viabilidade celular na comparação das concentrações testadas com o controle negativo, sugerindo que os extratos e as frações do produto natural em questão não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas. Dados esses que corroboram com a teoria demonstrada por Yang; Liu (2009), que extratos ou compostos com capacidade de induzir a atividade da enzima quinona-redutase a partir baixas concentrações e atingir concentrações inibitórias de 50% a partir de altas concentrações, podem ser considerados indutores promissores, devido à baixa concentração necessária para duplicar a atividade da enzima quinona-redutase associado à baixa citotoxicidade em células Hepa1c1c7.

Posteriormente, foi realizado também o ensaio da sulforrodamina B, em células HepG2, cujo princípio é a coloração das proteínas de membrana celular (SKEHAN *et al.*, 1990).

De acordo com os resultados obtidos e exemplificados na tabela 2, o ensaio da SRB demonstrou maior especificidade quando comparado com o violeta cristal. Pois no método de sulforrodamina B, o corante utilizado é uma aminoxantina de cor rosa brilhante e com dois grupos sulfônicos que são capazes de se ligar às porções terminais dos aminoácidos das células que foram fixadas com o ácido tricloroacético (SKEHAN *et al.*, 1990).

Os resultados do ensaio da SRB demonstraram que até a menor concentração testada (0,62 µg/mL) para os extratos e frações da folha, EB-Fo e BU-Fo, foi observado $66,9 \pm 1,6\%$ e $73,5 \pm 2,9\%$ de células vivas, respectivamente, demonstrando diferença estatística do controle negativo. No entanto, através do ensaio do violeta cristal esse perfil de citotoxicidade foi observado somente para o composto BU-Fo em concentrações superiores de 30 e 40 µg/mL. Os extratos e frações dos frutos EB-Fr e HA-Fr, nas concentrações de 0,62 e 1,25 µg/mL (pelo ensaio da SRB), são iguais

estatisticamente ao controle negativo e em maiores concentrações, esses extratos e frações demonstraram citotoxicidade. No entanto, para o ensaio do violeta cristal, o EB-Fr e a HA-Fr, em todas as concentrações testadas (de 1,25 até 40 µg/mL) apresentaram aproximadamente 80 a 95% de células vivas, não demonstrando assim diferença estatística do controle negativo.

Podemos sugerir que a diferença de resultados obtidos em ambos os ensaios pode ter ocorrido provavelmente por se tratar de metodologias diferentes, considerando a coloração pelo violeta cristal menos específica do que a coloração pela SRB; a realização com linhagens celulares diferentes (hepatocarcinoma murino e humano); tempos de tratamento diferentes (para o ensaio do violeta cristal foi realizado tratamento de 48h e para o ensaio de sulforrodamina B 24h), etc.

A avaliação da citotoxicidade a partir de dois métodos colorimétricos é comumente utilizada, como descrito por Oliveira (2010) que realizou dois procedimentos colorimétricos, violeta cristal e MTT, para a determinação da viabilidade celular. Em seu estudo, após comparação prévia entre as duas metodologias, ele pode observar um comportamento não linear na densidade óptica em altas concentrações quando as células foram coradas com violeta cristal, no entanto, o mesmo não foi observado no ensaio do MTT. Esse fato foi justificado pelo provável arraste mecânico de células na etapa de lavagem das placas em água corrente, como também demonstrado por Meager (2002).

5.3. Avaliação da Genotoxicidade e Mutagenicidade

As plantas são amplamente utilizadas na medicina tradicional e além disso, ultimamente essas plantas estão sendo utilizadas para o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos (NEWMAN; CRAGG, 2007). No entanto, o equilíbrio entre os

efeitos terapêuticos e toxicológicos de um composto é um parâmetro muito importante a ser avaliado. Assim, a determinação do potencial genotóxico e mutagênico dessas fontes naturais tornam-se necessárias.

As análises citogenéticas, como aberrações cromossômicas, formações de micronúcleos, trocas entre cromátides irmãs, entre outras, e as análises bioquímicas como o ensaio do cometa, podem ser avaliadas em diferentes tipos celulares, a fim de identificar possíveis danos ao DNA ocasionados por agentes químicos ou agentes físicos. Para a avaliação dos níveis de danos no DNA, no presente estudo foi empregado o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo. De acordo com SCHMITTA *et al.* (2003) diferentes produtos de origem natural, amplamente utilizados nos últimos tempos, podem ser potencialmente genotóxicos. O que torna indispensável a análise dos extratos e frações de *E. jambolana* quanto às suas características genotóxicas e mutagênicas, uma vez que nos ensaios anteriores apresentaram boa atividade quimiopreventiva. De acordo com Zeiger (2007), antes de afirmar que uma substância possui efeito antígeno-tóxico ou quimiopreventivo, deve-se também avaliar seu perfil genotóxico.

Investigação de dano ao DNA em células HepG2 pelo ensaio do cometa tem sido usada como biomarcador sensível para avaliar os efeitos genotóxicos, além disso este ensaio é conveniente para estudar quantitativamente as relações concentração-resposta *in vitro* (UHL *et al.*, 2003).

Em relação à análise da genotoxicidade, pôde-se observar que durante o tratamento das células HepG2 com altas concentrações tanto dos extratos quanto das frações, esses compostos foram potencialmente genotóxicos. Os extratos EB-Fo (Tabela 3) e EB-Fr (Tabela 5) foram genotóxicos nas concentrações de 5 a 40 µg/mL, a fração BU-Fo (Tabela 4) de 5 a 50 µg/mL e a fração HA-Fr (Tabela 6) de 5 a 30 µg/mL. Infelizmente o perfil de genotoxicidade foi observado nas concentrações em que esses

extratos e frações apresentaram indução da enzima quinona-redutase. Somente em concentrações menores, ou seja, iguais e inferiores a 2,5 µg/mL os extratos e frações das folhas e dos frutos de *E.jambolana* não demonstraram efeito genotóxico, porém nessas condições também não apresentaram atividade da enzima quinona-redutase.

O efeito genotóxico em maiores concentrações pode estar relacionado com alguns componentes presentes nas folhas e nos frutos de *E. jambolana*, pois polifenóis e taninos em altas concentrações apresentam efeito celular tóxico (KASHIWADA *et al.*, 1992).

No entanto, há também a presença de antocianinas nos frutos de *E. jambolana* que, de acordo com a literatura, de modo geral não são tóxicas, além disso, seu consumo regular e de outros flavonóides presentes em frutas, vegetais, geléias e vinhos é recomendado, pois essa ingestão está associada com uma provável redução dos riscos de doença cardiovascular, diabetes, doenças no fígado, doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, inflamações, doenças crônicas como o câncer, devido ao seu efeito antimutagênico, e atividade quimiopreventiva, além de possuir forte atividade antioxidante (MESKIN *et al.*, 2004; COOKE *et al.*, 2005; ANDERSEN; MARKHAM, 2006; VAREED *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2006; VEIGAS *et al.*, 2007; REYNERTSON *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008; CHARRON *et al.*, 2009).

A avaliação da atividade genotóxica de produtos naturais vem sendo muito explorada nos últimos tempos e para melhor complementar os resultados obtidos pelo ensaio do cometa foi avaliada a atividade mutagênica dos extratos e frações de *E. jambolana* por meio do teste do micronúcleo. A diferença entre os dois ensaios é basicamente devido às variações entre os tipos de alterações no DNA.

Para a realização do teste do micronúcleo, foram utilizadas concentrações não genotóxicas determinadas a partir do ensaio do cometa. Os resultados obtidos durante a

avaliação da mutagenicidade em células HepG2 demonstraram que os extratos EB-Fo (Tabela11) e EB-Fr (Tabela13) e a fração HA-Fr (Tabela 14) não apresentaram diferença estatística do controle negativo, por esse fato são considerados não mutagênicos nas concentrações testadas. Porém a fração BU-Fo (Tabela 12) apresentou um aumento significativo na frequência de micronúcleos nas concentrações de 0,15 a 0,62 µg/mL, demonstrando assim diferença estatística do controle negativo, ou seja, um efeito mutagênico.

O índice de divisão nuclear (IDN) tanto para os extratos como para as frações demonstrou uniformidade na divisão, quando comparado com o controle negativo. A mensuração do IDN consiste na análise da frequência de núcleos para medir a extensão e a progressão da divisão nuclear de uma célula em divisão, fornece dados importantes sobre o efeito citostático de agentes químicos ou físicos, auxilia também na identificação de moléculas que podem estimular a divisão celular. Todos esses dados podem ser obtidos na mesma lâmina em que é realizada a leitura dos micronúcleos. Essas informações só são obtidas a partir da realização do bloqueio da citocinese (FENECH, 1997).

O fato da maioria dos extratos e frações testados não apresentarem efeito mutagênico pode estar novamente relacionado com os seus constituintes, pois de acordo com Bridle; Timberlake (1996), as antocianinas que estão presentes em diversas frutas e vegetais incluindo a *E. jabolana*, não são mutagênicas. Ao contrário, possuem propriedades terapêuticas, são capazes prevenir várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo, pois são capazes de inibir, através da alimentação, os processos oxidativos e inflamatórios (MAILEN-AUBERT *et al.*, 2001; ANDERSEN & MARKHAM, 2006; MULABAGAL *et al.*, 2009)

Sabe-se que o ensaio cometa detecta lesões primárias no DNA, ou seja, danos passíveis de reparo, enquanto o teste do micronúcleo detecta lesões irreparáveis (SCOLASTICI *et al.*, 2008; SALVADORI *et al.*, 1993). Então, pode-se sugerir, frente aos resultados, que em menores concentrações somente a fração BU-Fo foi capaz de causar danos irreparáveis ao DNA observados através do teste do micronúcleo. No entanto, pelo ensaio do cometa, as concentrações iguais e inferiores a 2,5 µg/mL, dos extratos e frações de *E. jambolana* não causaram danos ao DNA.

5.4. Avaliação da Antigenotoxicidade e Antimutagenicidade

A taxa de ocorrência de câncer, bem como as doenças causadas por agentes genotóxicos estão aumentando cada vez mais no mundo todo. Frente a essa realidade, a determinação da atividade antigenotóxica de extratos de plantas é importante na descoberta de novos e eficazes tratamentos com produtos naturais. Embora um efeito antigenotóxico encontrado em um produto natural não significa necessariamente a possibilidade que ele seja um anticarcinogênico (ZAMPINI *et al.*, 2008).

A avaliação do potencial antigenotóxico de produtos naturais vem sendo amplamente explorada, por meio do ensaio do cometa, tornando-se uma ferramenta interessante para avaliar a possível atividade quimiopreventiva dos diversos extratos e frações de plantas incluindo os de *E. jambolana*, e de acordo com Flores *et al.* (2003), recentemente o teste do micronúcleo também vem sendo utilizado para detecção de efeitos antimutagênicos, devido a sua simplicidade, confiabilidade e sensibilidade.

De acordo com a literatura várias substâncias, tais como ácido ascórbico, carotenóides, vitamina E e flavonóides, têm demonstrado seu potencial antigenotóxico (BRYERS; PERRY 1992).

Dentro deste contexto, no presente estudo, dois delineamentos experimentais (pré e pós-tratamento) foram aplicados em relação ao H₂O₂ para melhor entender os possíveis mecanismos de antigenotoxicidade e antimutagenicidade de *E. jambolana* em células HepG2. Diferentes tipos de células são utilizadas para determinar a genotoxicidade e a antigenotoxicidade de compostos naturais (YUSUF *et al.*, 2000). No entanto Salvadori *et al.* (1993) relataram que a linhagem celular HepG2 parece ser uma alternativa prática para a avaliação de genotoxicidade ou antigenotoxicidade. As células HepG2 são de fácil manuseio, possuem capacidade de bioativação endógena, conservam muitas das características das células parenquimais do fígado e contêm várias enzimas responsáveis pela ativação de diversos xenobióticos (SASSA *et al.*, 1989; UHL *et al.*, 2000). Assim, o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo foram realizados nessa linhagem celular afim de identificar possíveis compostos naturais antigenotóxicos e antimutagênicos.

Por meio do ensaio do cometa, na avaliação da antigenotoxicidade, foi possível observar que os extratos e frações das folhas e dos frutos de *E. jambolana* no pré-tratamento (Tabelas 7, 8, 9 e 10) apresentaram um aumento no dano causado pela ação do mutágeno direto H₂O₂. Enquanto no pós-tratamento o extrato e a fração das folhas demonstraram efeito antigenotóxico em duas concentrações testadas (Tabelas 7 e 8), já o extrato e a fração dos frutos apresentaram efeito antigenotóxico em todas as concentrações testadas (Tabelas 9 e 10), possivelmente devido aos componentes químicos presentes nos frutos.

Como não existem, ainda, publicações sobre o potencial genotóxico/antigenotóxico e mutagênico/antimutagênico de extratos e frações de *E. jambolana*, os resultados foram comparados com estudos de produtos naturais descritos na literatura.

De acordo com os resultados do presente estudo, no ensaio do cometa, o pré-tratamento com *E. jambolana* não protegeu as células HepG2 contra os efeitos genotóxicos do H₂O₂, além de potencializar os danos causados pelo mesmo, porém no pós-tratamento uma ação antígenotóxica foi observada. Algo semelhante foi relatado por Munari *et al.* (2009) que avaliou o efeito genotóxico e antígenotóxico do extrato de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica do própolis verde, em células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (células V79), e utilizou como indutor do dano o metil metano sulfonato (200µM). Nesse estudo, o grupo demonstrou que o pré-tratamento com o extrato de *Baccharis dracunculifolia* não apresentou efeito protetor contra o dano induzido pelo metil metano sulfonato, (no entanto, um efeito potencializador do dano, como foi o caso do presente estudo, não foi observado por Munari *et al.* (2009)), enquanto que o pós-tratamento com o extrato de *Baccharis dracunculifolia* nas concentrações testadas foi quimiopreventivo.

No estudo realizado por Scolastici *et al.* (2008), foi avaliada a antígenotoxicidade e antimutagenicidade do licopeno em células HepG2 utilizando H₂O₂ e o DEN (n-nitrosodietilamina) como indutor de dano. Os resultados do ensaio do cometa demonstraram que nos três esquemas de tratamentos (pré, simultâneo e pós-tratamento), o licopeno reduziu significativamente a genotoxicidade do H₂O₂ em todas as concentrações testadas, já para o DEN foi observada uma redução significativa dos danos ao DNA somente no pré e simultâneo tratamento.

O mesmo foi observado por Barcelos *et al.* (2007) que avaliaram a genotoxicidade e a antígenotoxicidade do caju (*Anacardium occidentale* L.) em células V79 e utilizaram como indutor de dano o metil metano sulfonato. Os resultados demonstraram que houve redução da genotoxicidade do metil metanossulfonato nos três esquemas de tratamentos (pré, simultâneo e pós), no entanto, no pré-tratamento em

apenas uma concentração essa redução foi observada, demonstrando que o simultâneo e o pós-tratamento foram mais eficientes, indicando clara atividade antigenotóxica.

De acordo com o presente estudo, assim como o extrato de *Baccharis dracunculifolia*, os extratos e frações de *E. jambolana* podem agir na célula após a indução do dano ao DNA, provavelmente exercendo algum efeito estimulatório sobre o sistema de reparo do DNA (MUNARI *et al.*, 2009).

No entanto no teste do micronúcleo, na avaliação da antimutagenicidade tanto no pré quanto no pós-tratamento com os extratos e as frações das folhas e frutos de *E. jambolana* foi observada uma redução significativa da frequência de micronúcleos em todas as concentrações testadas em relação ao controle positivo (Tabelas 15, 16, 17 e 18), sugerindo um efeito antimutagênico dos extratos e frações testados.

Esses resultados corroboram com o estudo de Scolastici *et al.*(2008), em que no teste do micronúcleo o licopeno reduziu a frequência de micronúcleos induzida pelo H₂O₂ nos dois tipos de tratamentos realizados (pré e simultâneo).

De acordo com Kada *et al.* (1982), substâncias protetoras do DNA podem ser classificadas como desmutagênicas ou bioantimutagênicas. Os agentes desmutagênicos agem diretamente sobre os mutágenos, ou através de seus precursores, inativando-os, eles podem se ligar ao composto mutagênico de forma irreversível, inativando-o quimicamente através de uma ligação direta ou inibindo a ativação pela modulação de enzimas de fase 1 e 2. Já os agentes bioantimutagênicos, atuam sobre mecanismos fisiológicos de proteção e reparo de DNA, revertendo o efeito mutagênico e impedindo a fixação de mutações.

A partir dos resultados obtidos no ensaio do cometa, podemos sugerir que mecanismo de ação dos extratos e frações, principalmente dos frutos de *E. jambolana* envolve a bioantimutagênese. No entanto, o fato de no pré-tratamento os extratos e

frações demonstrarem aumento da genotoxicidade induzida pelo H₂O₂, podemos especular que isso esteja relacionado com a presença de alguns componentes nos extratos e frações de *E. jambolana*, que após metabolização das células HepG2, interagem com H₂O₂ no momento da indução do dano, nesse tipo de tratamento.

Por fim, os extratos e frações de *E. jambolana* possuem diversos componentes em suas folhas e em seus frutos, que são responsáveis por seus efeitos quimiopreventivos, genotóxicos, antigenotóxicos, antimutagênicos, dependendo diretamente da sua concentração. De acordo com isso, pode-se dizer que os extratos e frações de *E. jambolana* podem ser protótipos para agentes quimiopreventivos.

No entanto, outros ensaios de indução dos elementos de resposta antioxidante ARE (*Antioxidant Responsive Elements*) deverão ser empregados para avaliar a atividade desses extratos e frações sobre a etapa do início da carcinogênese, além de ensaios complementares de inibição de NF-κB e aromatase, somados aos ensaios de inibição das enzimas COX-1 e COX-2 para avaliar a atividade quimiopreventiva sobre a etapa de promoção e progressão da carcinogênese (CUENDET *et al.*, 2005 ; MORAIS *et al.*, 2010).

6. Conclusões

Através da análise dos resultados obtidos com o presente estudo, pode-se concluir que:

- Dentro de um rastreamento bioguiado, alguns extratos e frações de *E. jambolana*, extrato bruto e fração n-butanólica das folhas e extrato bruto e fração hidroalcoólica dos frutos, foram capazes de promover a indução da enzima QR, sugerindo alguma atividade quimiopreventiva;
- Em relação à citotoxicidade os extratos e frações dos frutos apresentaram-se, em menores concentrações, iguais ao controle negativo não apresentando citotoxicidade nas menores concentrações;
- Os resultados do ensaio do cometa com os extratos e frações de *E. jambolana*, demonstraram que nas mesmas concentrações que houve indução da enzima quinona-redutase, eles apresentam alto potencial genotóxico, entretanto em menores concentrações esse perfil não foi observado;
- Em relação à atividade antigenotóxica, os extratos e frações, principalmente dos frutos de *E. jambolana*, apresentaram capacidade bioantimutagênica, após indução de dano;
- De acordo com os resultados do teste do micronúcleo, foi possível observar que os extratos e frações de *E. jambolana* não são mutagênicos, exceto a fração n-butanólica das folhas.
- Através do teste do micronúcleo, foi possível observar que os extratos e frações possuem atividade antimutagênica;
- De acordo com todos os resultados sugerimos que extratos e frações de *E. jambolana* possuem capacidade quimiopreventiva, em diferentes concentrações.

7. Referências Bibliográficas

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **The anthocyanins. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and application***. Flórida: Taylor & Francis, 2006. Cap. 10, p. 471-523.

ANTUNES, L.M.G. Efeito protetor das vitaminas C e E sobre os danos cromossômicos induzidos pelo antitumoral doxorubicina em células de mamíferos *in vivo* e *in vitro*. 1997. Tese-Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

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

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of Syzygium cumini fruit. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 727-733, 2005.

BARCELOS, G.R.M.; SHIMABUKURO, F.; MACIEL, M.A.M.; CO' LUS, I.M.S. Genotoxicity and antigenotoxicity of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in V79 cells **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1468-1475, 2007.

BEZERRA, D.P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; DE ALENCAR, N. M; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LATUFO, L. V. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **J. Appl. Toxicol.**, v.28, p.158-63, 2008.

BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as natural food colours selected aspects. **Food Chemistry**, v. 58, p.103-109, 1996.

BYERS T, PERRY G. Dietary carotenes, vitamin C and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. **Annu Rev Nutr.**, v. 12, 139-159, 1992

CARIÑO-CORTÉS, R.; HERNÁNDEZ-CERUELOS, A.; TORRES-VALENCIA, J.M.; GONZÁLEZ-AVILA, M.; ARRIAGA-ALBA, M.; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E. Antimutagenicity of Stevia pilosa and Stevia eupatoria evaluated with the Ames test. **Toxicol. Vitro**, v. 21, p. 691-697, 2007.

CAVALCANTI, B.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BURBANO, R.R.; SILVEIRA, E.R.; CUNHA, K.M.; RAO, V.S; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; HENRIQUES, J.A; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food Chem Toxicol.**, v. 44, n.3, p. 388-392, 2006.

CHARRON, C. S.; KURILICH, A. C.; CLEVIDENCE, B. A.; SIMON, P. W.; HARRISON, D. J.; BRITZ, S. J.; BAER, D. J.; NOVOTNY, J. A. Bioavailability of anthocyanins from purple carrot juice: effects of acilation and plant matrix. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1226-1230, 2009.

CHEN, P-N.; CHU, S-C.; CHIOU, H-L.; KUO, W-H.; CHIANG, C-L.; HSIEH, Y-S. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside, and cyaniding 3-glucoside, exhibited and inhibitory effect on the migration and invasion of human lung cancer cell line. **Cancer Letters**, v. 235, p. 248-259, 2006.

COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249-257, 2004.

COOKE, D.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J.; MARCZYLO, T. Anthocyanins from edible fruits and vegetables – Does bright colour signal cancer chemopreventive activity? **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1931-1940, 2005.

COSTA-LOTUFO, L. V.; KHAN, M. T.H.; ATHER, A.; WILKE, D. V.; JIMENEZ P. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E.A.; MORAES, M. O. Studies of the anticancer potencial of plants used in Blangladeshi folk medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v.99, p.21-30, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.**, v.60, p.52-60, 1997.

CUENDET, M.; OTEHAM, C.P.; MOON, R.C.; PEZZUTO, J.M. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n. 3, p. 460-463, 2006.

CUZZOCREA, S.; RILEY, P.D.; CAPUTI, P.A.; SALVEMINI, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharm. Rev.**, v. 53, p. 135–159, 2001.

DAMETTO, A.C. Bioprospecção em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae). 2010. **Dissertação** (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, SP.

DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; HOLTZCLAW, W.D.; COLE, R.N.; ITOH, K.; WAKABAYASHI, N.; KATOH, Y.; YAMAMOTO, M.; TALALAY, P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.99, p.11908-11913, 2002.

DUVOIX, A.; BLASIUS, R.; DELHALLER, S.; SCHNEKENBURGER, M.; MORCEAU, F.; HENRY, E.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumim. **Cancer Lett.**, v. 223, p. 181 - 190, 2005.

EASTMOND, D.A.;TUCKER, J.D. Identification of aneuploidyinducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an anti-kinetochore antibody. **Environ. Mol. Mutagen.**, v.13, p. 34–43, 1989.

ESTELLER M, HERMAN JG. Cancer as epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. **J. Pathol.**, v.196, p.1-7, 2002.

FAHEY, J. W.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; STEPHENSON, K. K.; TALALAY, P. The “Prochaska” Microtiter plate Bioassy for inducers of NQ01. **Meth. Enzymol.**, v. 382, p. 243-258, 2004.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P.L.; O’NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, v. 339, p.37-59, 1995.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, v.392, p. 11–18, 1997.

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

FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65–75, 2003.

FENECH, M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. **Methods Mol. Med.**, v. 111, p. 3-32, 2005.

FLORES, L.E.R.; MADRIGAL-BUJADAR, E.; SALAZAR, M.; CHAMORR, G. Anticlastogenic effect of Spirulina maxima extract on the micronuclei induced by maleic hydrazide in Tradescantia. **Life Sci**, v.72, p.1345-1351, 2003.

GARDNER, J.E.; SNUSTAD, P. **Principles of Genetics**; 7 ed. New York: John Wiley & Sons. INC., 1986.

GREENWALD, P. Cancer prevention clinical trials. **J. Clin. Oncol**, v.20, p.14-22, 2002.

GERHÄUSER, C.; YOU, M.; LIU, J.; MORIARTY, R. M.; HAWTHORNE, M.; MEHTA, R. G.; MOON, R. C.; PEZZUTO, J. M. Cancer Chemopreventive Potential of Sulforamate, a Novel Analogue of Sulforaphane That Induces Phase 2 Drugmetabolizing Enzymes. **Cancer Res.**, v.57, p.272-278, 1997.

GROSS, H. B.; DALEBOUT, T.; GRUBB, C.D.; ABEL, S. Functional detection of chemopreventive glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Sci.**, v.159, p.265-272, 2000.

HAMBURGER, M; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Search for new drugs of plant origin. In: **Advances in Drug Research**, Academic Press, v.20, 1991.

HEDDLE, J. A. A Rapid in vivo Test for Chromosomal Damage. **Mutation Research**, v.18, p.187-190, 1973.

HEDDLE, J.A.; CIMINO, M.C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHEELBY, M.D.; TUCKER, J.D.; VANPARYS, P.H.; MACCGREGOR, J.T. Micronuclei as an index of cytogenic damage: Past, Present, and Future. **Environ. Mol. Mutag.**, v. 18, p. 277-291, 1991.

HENRIKSSON, E.; KJELLÉN, E.; WENNENBERG, J.; KJELLSTROM, J.H. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. In vitro cell. **Dev. Biol. Animal**, v. 42, p. 320-323, 2006.

HOGAN, S.; CHUNG, H.; ZHANG, L.; LI, J.; LEE, Y.; DAI, Y.; ZHOU, K. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanins-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v.118, p. 208-214, 2010.

HOU, DE-X.; FUJII, M.; TERAHARA, N.; YOSHIMOTO, M. Molecular mechanisms behind the chemopreventive effects of anthocyanidins. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2004, n. 5, p. 321-325, 2004.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P.J.; LEE, C.C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extratcts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, p. 377-387, 2007.

ILUSTRAÇÕES DAS ÁRVORES, FRUTOS E FOLHAS DE *E. JAMBOLANA*. Disponível em: <http://seboriobrancoacaonatalverde.blogspot.com/2011/02/jambolao-em-acao-natal-verde-contra-o.html>). Acesso em 10 de outubro de 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Como é o processo de carcinogênese? Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319>. Acesso em 20 setembro 2011.

KADA, T.; IVBONE, T.; NAMIKI, N. Environmental desmutagens and antimutagens. **Environmental Mutagenesis and Plant Biology**, Klekowshi EJ (ed.). Praeger: New York; p. 137–151, 1982.

KADA, T.; INOUE, T.; MORITA, K.; NAMIKI, M. Dietary desmutagens. **Progr. Clin. Biol. Res.**, v.20, p.6245-53, 1986.

KANG, Y.; PEZZUTO, J.M. Induction of Quinona Reductase as a Primary Screen for Natural Product Anticarcinogens. **Methods in Enzimology**, v. 382, p. 380–413, 2004.

KASHIWADA, Y., NONAKA, G., NISHIOKA, I., CHANG, J., LEE, K.. Tannins and related compounds as selective cytotoxic agents. **Journal of Natural Products** v. 55, p. 1033–1043, 1992.

KELLOFF, G. J.; BOONE, C. W.; STEELE, V. E.; FAY, J. R.; LUBET, R. A.; CROWELL, J. A.; SIGMAN, C. C. Mechanistic consideration in chemopreventive drug development. **J. Cell. Biochem. Suppl.**, v. 20, p. 1 - 24, 1994.

KIRSCH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M. JR.; KIRCHNER, S.; LORGE, E.; MORITA, T.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; VANHAUWAERT, A.; WAKATA, A. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research**, v. 540, p. 153–163, 2003.

KUCUK, O. New opportunities in chemoprevention. **Cancer Invest.**, v. 20, p. 237–45, 2002.

KUNDU, K.J.; SURH, J-Y. Breaking the relay in deregulated cellular signal transduction as a rationale for chemoprevention with antiinflammatory phytochemicals. **Mutation Research**, v. 591, p. 123–146, 2005.

KUSKOSKI, E. M.; VEGA, J. M.; RIOS, J. J.; FETT, R.; TRONCOSO, A. M.; ASUERO, A. G. Characterization of anthocyanins from the fruits of baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5450-5454, 2003.

LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.D.E.; HENZEL, A.; WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* Skells). **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

MAHMOUD II, MARZOUK MS, MOHARRAM FA, EL-GINDI MR, HASSAN AM. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v.58, n. 8, p.1239-44, 2001.

MAILEN-AUBERT, C.; DANGLES, O.; AMIOT, M. J. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 170-176, 2001.

MALACRIDA, C.R.; MOTTA, S. DA. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **B. Ceppa**, Curitiba, v.24, n. 1, p. 59-82, 2006.

MEAGER, A. biological assays for interferons. **J Immunol Methods**. v. 261, p.21-26, 2002.

MESKIN, M. S.; BIDLACK, W. R.; DAVIES, A. J.; LEWIS, D. S.; RANDOLPH, R. K. Absorption and metabolism of anthocyanins: potencial health effects. **Phytochemical mechanisms of action**. Flórida: CRC Press, 2004. Cap. 1, p. 1-16.

MIGLIORE, L.; COPPEDÈ, F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. **Mutation Research**, v. 512, p. 135–153, 2002.

MOLLER, P. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. **Basic Clinical Pharmacol. Toxicol.**, v. 98, p. 336–345, 2005.

MORAIS M. C. C., LUQMAN S., KONDRATYUK T. P., PETRONIO M. S., REGASINI L. O., SILVA D. H. S., BOLZANI V. S., SOARES C. P., PEZZUTO J. M. Suppression of TNF- α induced NF κ B activity by gallic acid and its semi-synthetic esters: possible role in cancer chemoprevention. **Nat. Prod. Res.**, v.24, p.1758-1765, 2010.

MORSE, M. A.; STONER, G. D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 1737 - 1746, 1993.

MULABAGAL, V.; WANG, H.; NGOUAJIO, M.; NAIR, M. G. Characterization and quantification of health beneficial anthocyanins in leaf chicory (*Chicorium intybus*) varieties. **European Food Research Technology**, v. 230, p. 47-53, 2009.

MUNARI, C.C., ALVES, J.M., BASTOS, J.K., TAVARES, D.C. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. **J. Appl. Toxicol.**, v. 30, p. 22–28, 2010.

MURUGANANDAN, S.; SRINIVASAN, K.; CHANDRA, S.; TANDAN, S.K.; LAL, J.; RAVIPRAKASH, V. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. **Fitoterapia**, v. 72, n. 4, p. 369-375, 2001.

NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat.Prod.**, v. 70, n.3, p. 461-477, 2007.

NOGUEIRA, R. C.; CERQUEIRA, H. F.; SOARES, M. B. P. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert. Opinion Ther. Pat.**, v. 20, p.1-13, 2010.

OLIVE, P.L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiat Res.**, v. 117, n.1, p. 79-92, 1989.

OLIVEIRA, E.R.A. Estudo da atividade biológica do interferon alfa-2b em Células hep-2c para aplicação em ensaios de determinação de potência. 2007. **Dissertação**. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro.

PEPATO, M.T., MORI, D.M.; BAVIEIRA, A.M.; HARAMI, J.B.; VENDRAMINI, R.C.; BRUNETTI, I.L. Fruit of jambolan tree (*Eugenia jambolana* Lam.) and experimental diabetes. **Journal of Ethnopharmacology.**, v. 96, p. 43-48, 2005.

PEZZUTO, J. M.; KOSMEDER II, J. W.; PARK, E. J.; LEE, S. K.; CUENDET, M.; GILLS, J.; BHAT, K.; GRUBJESIC, S.; PARK, H. S.; MATA-GREENWOOD, E.; TAN, Y. M.; YU, R.; LANTVIT, D. D.; KINGHORN, A. D. Characterization of natural product chemopreventive agents. **Cancer Chemoprevention: Strategies for Cancer Chemoprevention**. Totowa: Humana Press, 2005. v. 2, cap. 1, p. 3-37, 2005.

PLAZA, C.V. Investigação fitoquímica e avaliação antioxidante das folhas e frutos de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae). 2007. **Dissertação** (Mestrado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, SP.

POTTERAT, O.; HOSTETTMANN, K. Plant sources of natural drugs and compounds. In encyclopedia of environmental biology. **Academic Press**, v.3, 1995.

PROCHASKA, H. J.; SANTAMARIA, A. B. Direct measurement of NAD(P)H: quinone reductase from cells cultured in microtiter wells screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. **Anal. Biochem.**, v.169, n.2, p.328-336, 1988.

PROCHASKA, H. J.; SANTAMARIA, A. B.; TALALAY, P. Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.89, p.2394-2398, 1992.

REYNERTSON, K. A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, v. 109, p. 883-890, 2008.

RIVA, C.; BINELLI, A.; COGNI, D.; PROVINI, A. Evaluation of DNA damage induced by decabromodiphenyl ether (BDE-209) in hemocytes of *Dreissena polymorpha* using the comet and micronucleus assays. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 48, n. 9, p. 735-43, 2007.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO L. R., FENECH., M. Teste do Micronúcleo em Células Humanas *in vitro*. In: L.R. RIBEIRO, D.M.F. SALVADORI, E.K. MARQUES (Eds.). **Mutagênese Ambiental**, Editora da ULBRA, Canoas, p. 201-223, 2003.

SALVADORI, D.M., RIBEIRO, L.R., NATARAJAN, A.T. The anticlastogenicity of beta-carotene evaluated on human hepatoma cells. **Mutation Research**, v. 303, p. 151–156, 1993.

SASSA, S., IWASA, F., GALBRAITH, R., The effect of dimethyl sulfoxide on heme synthesis and the acute phase reaction in human HepG2 hepatoma cells. **Advanced experimental Medical Biology** v.271, p.103–114, 1989.

SCHMITTA, E. M. M.; JONASA, R.; DEKANTA, W.; STOPPER, H. Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.542, p.43-48, 2003.

SCOLASTICI,C.; ALVES DE LIMA, R.O.; BARBISAN, L.F.; FERREIRA, A.L.; RIBEIRO, D.A.; SALVADORI, D.M. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. **Toxicol In vitro.**, v. 22, n.2, p. 510-4, 2008.

SEVERIN, I.; JONDEAU, A.; DAHBI, L.; CHAGNON, M.C. 2,4-Diaminotoluene (2,4-DAT)-induced DNA damage, DNA repair and micronucleus formation in the human hepatoma cell line HepG2. **Toxicology**, v. 213, p. 138–146, 2005.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, p. 1107 - 1112, 1990.

SILVA, J. P.A.; SAMPAIO, L.S.; OLIVEIRA, L.S; REIS, L.A. MEDICINAL PLANTS USED BY DIABETES MELLITUS TYPE 2 CARRIERS FOR LIKELY GLICEMIC CONTROL IN THE CITY OF JEQUIÉ-BA. **Rev.Saúde.Com**, v. 4, n.1, p. 10-18, 2008.

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. **Exp. Cell. Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SPORN, M. B.; SUH, N. Chemoprevention of cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 525 - 530, 2000.

SUGUI, M.M. Mecanismos de Antimutagenicidade do cogumelo *Agaricus brasiliensis* sobre lesões no DNA induzidas *in vivo* e *in vitro*. 2006. **Tese** (Doutorado em patologia) - Faculdade de Medicina - Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho. Botucatu, SP.

TALALAY, P.; DE LONG, M. J.; PROCHASKA, H. J. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.85, p.8261-8265, 1988.

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. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, n.3, p. 206-221, 2000.

UHL, M., LAKY, E., KASSIE, M., KUNDI KNASMULLER, S. Efeitos de brotos de mostarda e allylisoitocianato de benzo (*um*) pireno induzida por dano ao DNA em humanos derivados de células : um estudo com o modelo único célula de eletroforese em gel / Hep G2 ensaio. **Teratog. Carcinog. Mutagênico**, v. 1, p. 273-282, 2003

UHL, M., HELMA, C., KNASMULLER, E. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatome (HepG2) cells. **Mutation Research**, v. 468, p. 213–225, 2000.

VAREED, S. K.; REDDY, M. K.; SCHUTZKI, R. E.; NAIR, M. G. Anthocyanins in *Cornus alterfolia*, *Cornus controversa*, *Cornus kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits. **Life Science**, v. 78, p. 777-784, 2006.

VEIGAS, J. M.; NARAYAN, M. S.; LAXMAN, P. M.; NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. **Food Chemistry**, v. 105, p. 619-627, 2007.

VERHAGEN, H.; ROMPELBERG, C.J.M.; STRUBE, M.; VAN POPPEL, G.; VAN BLADEREN, P.J. Cancer prevention by dietary constituents in toxicological perspective. **Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.**, v.16, p.343-60, 1997.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure? **Quím. Nova**, v.28, p.519-528, 2005.

VEIGAS, J. M.; NARAYAN, M. S.; LAXMAN, P. M.; NEELWARNE, B. Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. **Food Chemistry**, v. 105, p. 619-627, 2007.

WATERS, M.D.; BRADY, A.L.; STACK, H.F.; BROOKMAN, H.E. Antimutagenic profiles for some model compounds. **Mutation Research** v. 238, p.57-85, 1990.

WATTENBERG, L.W. Chemoprevention of cancer. **Cancer Res.**, v. 45, p. 1-8, 1985.

YANNAI, S.; DAY, A.J.; WILLIASON, G.; RHODES, J.C. Characterization of Flavonoids as Monofunctional or Bifunctional Inducers of Quinone Reductase in Murine Hepatoma Cell Lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 623-630, 1998.

YANG, J.; LIU, R. H. Induction of phase II enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells *in vitro* by grape extracts and selected phytochemicals. **Food Chemm.**, v.114, n.3, p.898-904, 2009.

YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D.; SUFRENDI, I. B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazil plant extract using high throughput screening. **Clinics**, v.62, p.763-768, 2007.

YUSUF, A.T., VIAN, L., SABATIER, R., CANO, J.P. In vitro detection of indirect-acting genotoxins in the comet assay using HepG2 cells. **Mutation Research**. v.468, p.227–234, 2000.

ZAMPINI, I.C., VILLARINI, M., MORETTI, M., DOMINICI, L., ISLA, M.I. Evaluation of genotoxic and antigenotoxic effects of hydroalcoholic extracts of *Zuccagnia punctata* Cav. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 330–335, 2008.

ZEIGER, E. What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript. **Mutat. Res.** v.626, p. 1–3, 2007.

ZHANG, Y.; WU, L.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Evadiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. **Acta Pharm.**, v.25, p.83-89, 2004.

ZHANG, Y.; SEERAM, N. P.; LEE, R.; FENG, L.; HEBER, D. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 670-675, 2008.

CAPÍTULO II

Evaluation of Brazilian Cerrado plants on cancer chemoprevention

Daniele Agustoni¹◆, Elaine R. Mello Monfré¹◆, Tarsia G. A. Silva¹, Aline Miranda Prieto¹, Mauro C. C. Morais¹, Luis O. Regasini², André G. dos Santos¹, Alberto J. Cavalheiro², Dulce H. S. Silva², Christiane P. Soares^{1*}

¹*Cytology and Cellular Biology Laboratory, Department of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University - UNESP, Rua Expedicionários do Brasil, n.1621, Centro, 14801-902, Araraquara-SP, Brazil,*

²*NuBBE-Nucleus of Bioassays, Biosynthesis and Ecophysiology of Natural Products, Department of Organic Chemistry, Institute of Chemistry, São Paulo State University - UNESP, Rua Prof. Francisco Degni, SN, Bairro Quitandinha, 14801-970, CP 355, Araraquara-SP, Brazil.*

*Author for Correspondence:

Christiane Pienna Soares, Ph.D.

Professor and Dean

School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University - UNESP

Rua Expedicionários do Brasil, n.1621, Centro. Zip Code: 14801-902, Araraquara-SP, Brazil. Phone: +55 16 3301-6554, Fax: +55 16 3301 6547, e-mail: soarescp@fcfar.unesp.br.

◆Both authors contributed equally to this paper.

Abstract

Cancer is a leading cause of death worldwide. Cancer chemoprevention is one of the promising strategies to decrease its incidence and both plant extracts and natural products may constitute sources of new chemoprevention agents. Some Brazilian species popularly used to treat inflammatory conditions were selected for evaluation for cancer chemoprevention. The biodiversity of the world provides a resource of unlimited structural diversity for bioprospecting by international drug discovery programs such as the BIOTA, focusing exclusively on anticancer compounds on Brazilian Cerrado. Therefore, the goal of the present study was to carry out the bioguided study of plants from Brazilian Cerrado, aiming at isolating cancer chemopreventive compounds. A total of 16 compounds / extracts / fractions from *Eugenia jambolana*, *Pterogyne nitens*, and *Casearia sylvestres*, were tested for their cancer chemoprevention activity the induction of quinone-reductase (QR). Several compounds / extracts / fractions from *Eugenia jambolana*, and *Pterogyne niten* were active, demonstrating moderate responses with QR assay.

Keywords: cancer chemoprevention; quinone-reductase; Brazilian Cerrado plants.

Introduction

Carcinogenesis can be regarded as an accumulation of genetic or biochemical cell damage, characterized by abnormal cell and tissue differentiation, and which offers possibilities to interrupt this process at various steps during the initiation, promotion or progression stage (Greenwald, 2001). This process, eventually leads to the final outcome of invasive and metastatic cancer (Sporn and Suh, 2000). According to data from World Health Organization (WHO) cancer is a leading cause of death worldwide. It accounted for 7.6 million deaths (around 13% of all deaths) in 2008. Deaths from cancer worldwide are projected to continue rising, with an estimated 13.1 million deaths in 2030. Currently, it is known that at least one-third of all cancer cases are preventable. Prevention offers the most cost-effective long-term strategy for the control of cancer (WHO, 2012).

Originally proposed by Sporn et al., (1976), the classical definition of cancer chemoprevention is the use of natural, synthetic or biological chemical agents to reverse, suppress or prevent either the initial phase of carcinogenesis or the progression of neoplastic cells to cancer (Sporn, et al., 1976). As a whole, cancer chemoprevention definition is the use of pharmacological interventions to treat or reduce the risk of cancer developing (O'Shaughnessy, et al., 2002; Kelloff, et al., 2006). Considering cancer as the end stage of a chronic disease process called carcinogenesis, it would be of extreme interest to find natural or synthetic compounds that could intervene on the carcinogenesis progress and that could not cause minimum damage to healthy cells. We need to focus more effort on the control of carcinogenesis, rather than attempting to cure end-stage disease. Thus, our common sense tells us that it is easier to fix anything when the smallest numbers of its components are broken; unfortunately, this intuition has been ignored in our allocation of resources to deal with the cancer problem (Sporn and Suh, 2000). Faced with this reality we studied three Brazilian Cerrado plants for their potential chemopreventive, *Eugenia jambolana*, *Pterogyne nitens* and *Casearia sylvestris*.

Eugenia jambolana (Lamb.) is a plant originated from India. In Brazil it is known as “jambolão” and is of great interest for medical applications because of its leaves and its fruits are present in large quantities such as flavonoids and phenolic compounds with antioxidant potential of tannins (Figure 1). Antioxidants are substances used in the prevention of cardiovascular diseases, cancer, degenerative diseases including Parkinson's and Alzheimer's, as well as to treat inflammation and skin aging. (Mahmoud et al., 2001; Banerjee, et al., 2005; Hou, et al., 2004; Plaza, 2007). *Eugenia jambolana* (Lamb.) is from the family Myrtaceae, originally from eastern India and well known in Indian and Pakistani folk medicine for its anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, antifungal effects and treatment of peptic ulcers. Many species are reported as plants rich in polyphenols gallic and ellagic acid derivatives, tannins and flavonoid glycosides (Hou, et al., 2004; Malacrida and Motta, 2006; Plaza, 2007, Loguercio, et al., 2005).

Pterogyne nitens (Fabaceae) popularly known as “amendoinzeiro”, is distributed mainly in Brazil, Bolivia, Paraguay and Argentina (Regasini, et al, 2008). It is the sole member of genus *Pterogyne* (Leguminosae) and this plant species has been reported to contain terpenoid guanidine alkaloids with anti-fungal, antioxidant and anticancer activity (Bolzani, et al., 1995). Its alkaloids also presented moderate cytotoxicity against Chinese hamster ovary cell lines (Bolzani, et al., 1995) and also presented moderate cytotoxicity against several cancer and non-cancer human cell (Regasini, et al., 2009). Preliminary study on additional biological activities of alkaloids isolated from *P. nitens*

demonstrated inhibition in the proliferation of human breast cancer cells and it induces cell death by apoptosis (Duarte, et al., 2010). Immunomodulatory activity of compounds of different cytokines showed that the compounds are capable of stimulating the production and therefore display anti-inflammatory activities important for regulating neoplastic processes (Lopes, et al., 2008).

Casearia sylvestris Swartz (Salicaceae) is a tropical tree commonly known as “guaçatonga” in Brazil and used widely for its healing, anti-inflammatory and anti-ulcerative activities (Borges et al., 2000; Sertié et al., 2000; Esteves et al., 2005). Phytochemical investigations reveal that the major compounds isolated from *C. sylvestris*, clerodane diterpenes (Figure 1), exhibit both cytotoxic, antifungal and antimutagenic activities (Orbelies et al., 2002; Oliveira et al., 2009; Santos et al., 2010).

Materials and Methods

Plants

Leaves and fruits of *Eugenia jambolana* were collected in Araraquara, Sao Paulo State, Brazil, in April 2009 and has been deposited in the Herbarium of Botanic Institute – SP (SP, Brazil). Leaves of *P. nitens* were collected in Sao Paulo Botanic Garden, SP, Brazil, in May 2003, and a voucher specimen (SP204319) has been deposited in the Herbarium of the Botanic Institute (SP, Brazil). Leaves of *C. sylvestris* were collected and identified as described in Oliveira *et al.*, 2009.

Materials

The leaves of *P. nitens*, *E. jambolana* and *C. sylvestris* were dried, minced, and extracted at room temperature with ethanol. The ethanol extract was concentrated and dissolved in H₂O. The fractions were loaded to a high performance liquid chromatography HPLC. The compounds were found to be single components by thin layer chromatography (Dametto, 2010, Bolzani, et al., 1995, Oliveira, et al., 2009).

Quinone-reductase activity in Hepa 1c1c7 cell culture

Quinone-reductase activity was evaluated as described previously with some modifications (Prochaska *et al.*, 1988; Gross et al., 2000; Yang et al., 2009). Hepa1c1c7 cells (ATCC, Rockville, MD) were supplied by Dr. John M. Pezzuto (University of Hilo – Hawaii, USA), and grown in a humidified incubator at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂, in Alpha minimal essential medium (α -MEM) supplemented with fetal bovine serum (FBS) without nucleosides and deoxyribonucleosides (GIBCO, Life Technologies, Grand Island, NY). Two hundred μ L of cell suspension with a concentration of 10⁴ cells/mL were plated in 96-well plate. After 24h, the medium was decanted and fresh medium was added with compounds dissolved in water (*P. nitens*: 0.312mM at 10mM and *E. jambolana*: 1.25 μ g/mL at 40 μ g/mL) and dissolved in Tween (*C. sylvestris*: 0.09 at 0.61 μ M). The cells were incubated for 48h β naftoflavone (positive control) (Song et al., 1999). The medium was removed and the cells were lysed with 50 μ L 0.8% (w/v) digitonin in 2 mM EDTA at pH 7.6 and incubated at 37 °C in orbital shaker (100 rpm). The plates were then agitated for another 10 min at room temperature. For measurement of QR activity, 200 μ L of assay solution (25 mM Tris–HCl, pH 7.4, 1 mM glucose-6-phosphate, 50 mM menadione, 30 mM NADP, 5 mM FAD, 0.07% (w/v) bovine serum albumin (BSA), 0.03% (w/v) MTT, 0.01% (v/v)

Tween-20, and 1 unit/mL of yeast glucose-6-phosphate dehydrogenase) were added to each well. QR activity was measured as the reduction of menadione to menadiol, this being coupled to the non-enzymatic reduction of MTT by a blue formazan. The reaction generated to a blue color, which was measured after 5 min incubation at room temperature on orbital shaker. Readings were made at 595 nm using ELx800 Absorbance Microplate Reader (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT).

Induction Ratio (IR) was expressed as the ratio of the specific activity of QR in the presence and absence of test compounds. A graphic with ratio of QR specific activities of compound-treated cells to control-treated cells as a function of inducer concentration was plotted and the concentration required to double the specific activity (CD) was determined. Chemopreventive index (CI) was determined by dividing the IC_{50} values by CD values (Gerhäuser, et al., 1997). The results are expressed as means \pm standard error of three independent experiments. Cell viability was determined in a duplicate set of plates using crystal violet staining (Dietz, et al., 2005). After treating the cells with test compounds for 48 h, the medium was decanted, and 200 μ L of 0.2% crystal violet (CV) solution in 2% ethanol was added. After 5 minutes, the plates were rinsed for 2 min with tap water and dried. The bound dye was solubilized by incubation at room temperature for 5 minutes with 200 μ L of 0.5% SDS in 50% ethanol in orbital shaker (100 rpm). The absorption was measured at 595 nm, and the IC_{50} values were determined.

Statistic analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software Inc.). Results were subjected to one-way analysis of Variance (ANOVA), and differences between means were determined by Tukey's multiple comparison test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Data are expressed as means \pm SEM.

Results and Discussion

A variety of natural products, as well as flavonoids, alkaloids and synthetic compounds were evaluated in vitro for their potential to induce quinone reductase. Samples of over three different types of Brazilian plants as well as extracts, fractions and isolated compounds were evaluated for their quinone reductase (QR) induction. The microtiter plate assay employed to determine QR induction has been used extensively to characterize the inducer potency of a variety of natural and synthetic compounds as well as crude plant extracts (Talalay and Fahey, 2001; Dinkova-Kostova and Talalay, 2000).

Three independent experiments were performed to evaluate the induction of the enzyme QR and cell viability assay by crystal violet cell line Hepa 1c1c7 (murine hepatocellular carcinoma), taking into account the induction of positive control (β -naphthoflavone) that has an induction rate of not less than two times compared to negative control. Cells were treated with extracts, fractions from the leaves and fruits of *Eugenia jambolana*, *Casearia sylvestris* and isolated substance of *Pterogyne nitens*.

Regarding treatment of Hepa 1c1c7 cell line with compounds extracted from leaves and fruits of *Eugenia jambolana*, we could observe a potential chemopreventive effect of two extracts and two fractions analyzed in the bioguided screening. The HPLC analysis (data not shown) showed that the *E. jambolana* pures substance rich in anthocyanins has an extremely unstable profile, attributing to its potential degradation. Therefore it was impossible to hold the test of quinone reductase, as well as the test of cell viability. The methanolic crude extracts from leaves and fruits of *E. jambolana*

showed induction of the enzyme quinone reductase in concentrations of 10, 20 and 30 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for the compound from the leaves, and 30 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for the compound from the fruit. The enzyme induction rates shows that during the 48 hours cells treatment with methanolic crude extract of IR (induction ratio) was of 2.1 ± 0.35 , 2.5 ± 0.36 and 2.3 ± 0.20 times respectively (Tables 1). Regarding cell viability (%) of the same extract of the leaves, there was 80 – 100% living cells. Treatment of cells with methanolic crude extracts from the fruits showed IR of 2.0 ± 0.100 times (Table 2) and cell viability was $88.4 \pm 5.7\%$. The hydro-alcoholic fraction from *E. jabolana* fruits (Table 2) showed to be a inducer of the enzyme quinone reductase activity at a concentration of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The IR was 2.5 ± 0.062 times and cell viability (%) equals 93.3 ± 3.6 Also, the n-butanol fraction from leaves of *E. jabolana* (Table 3) showed IR in concentrations of 2.5, 20 and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2.1 ± 0.3 , 2.0 ± 0.3 , 2.6 ± 0.3 times respectively). Regarding cell viability (%) n-butanol fraction from leaves, there was 95.1 ± 3.1 ; 96.8 ± 2.4 e 52.4 ± 13.8 % of living cells.

According to Mahmoud *et al.* (2001) and Loguercio *et al.* (2005) leaves of *E. jabolana* contain a mixture of polyphenols, especially flavonoids glycosides, phenolic acids and are rich in tannins and saponins. The fruits contain vitamin C, gallic acid, tannins and anthocyanins. In their extracts and fractions shown, in a study conducted by Plaza (2007), there was an antioxidant activity by DPPH assay. In view of these results these compounds can be used as potential chemopreventive agents for cardiovascular diseases, cancer and neurodegenerative disorders. They also as to treat inflammation and skin aging, since these antioxidants fight free radicals (Plaza, 2007).

A study with grape extracts, which are popular and grown all over the world, rich in phenolic compounds, including phenolic acids, tannins and flavonoids, showed that phytochemicals in grapes, which are also present in several other fruits and vegetables are potentially capable of inducing the activity of the enzyme quinone reductase in Hepa 1c1c7 cells (Yang and Liu, 2009).

In order to determine the characteristic of enzyme induction, this study evaluated the ability of enzyme induction phase 1 or phase 2 of the extracts and fractions of *E. jabolana* in mutant cell line TAOc1BPr1 which is defective in the receptor AhR (Gerhäuser *et al.*, 1997). Thus it was observed that the extracts and fractions of both leaves and fruits of *E. jabolana* were not able to induce the enzyme activity of the QR in mutant cell line, therefore they are considered bifunctional inducers. Talalay *et al.*, (1988) listed the flavonoids, which occur abundantly in nature in various edible plants as typical bifunctional inducers. However, another study by Yannai *et al.*, (1998) found that flavonoids may be classified as either mono or bifunctional inducers.

Others fractions of *E. jabolana* from leaves and fruits (acetate and n-butanol fraction from the fruits and hydro-alcoholic, acetate and hexane fraction from leaves) were tested for their potential chemopreventive and it were not observed significant induction of QR at 1.25 to 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ concentrations. The compounds of *Casearia sylvestris* were also unable to induce the enzyme activity at the concentrations tested. Table 5 showed lows levels of enzyme induction and cell viability of the compounds from leaves and fruits of *E. jabolana* at highest concentration tested (20 mg / mL) and *Casearia sylvestris* with their respective concentrations.

Studies on alkaloids *Pterogyne nitens* (Figure 1) had several pharmacological activities, such as anti-oxidant and anti-inflammatory. Therefore our group observed its activity quinone reductase enzyme, at lowest concentrations (0.31 mM) while the highest percentage of cell viability ($96 \pm 1.3\%$) respectively for the alkaloid pterogynidine (PGD), with a IR of 2.8 ± 0.07 , being equivalent to the positive control. No induction was observed at higher concentrations, equivalent rates of cell viability to

35.9 ± 1.3% in the treatment of 10 mM with alkaloid pterogynidine. Analyses for pterogynine (PGN) showed IR of 2.7 ± 0.8 at a concentration of 0.31 mM and cell viability of 68 ± 0.7%. The IC₅₀ values were 2.5 ± 0.6 mM for pterogynine and 2.0 ± 0.5 mM for pterogynidine (Table 4). Little is known about the actions of the alkaloids pterogynine and pterogynidine front and on the chemopreventive activity. In the present study, the activity of the enzyme quinone reductase was increased in two times lower concentration (0.312 mM) compared to positive control β-naphthoflavone (BNF). This increase is evidence of the chemopreventive activity of the compounds tested. The present study showed that the alkaloids pterogynine and pterogynidine induce a doubling of the enzyme quinone reductase and concomitantly the IC 50 value did not show cytotoxicity. These results are important in the study of cancer prevention, since this activity, derived from natural products may contribute to the treatment and prevention of cancer (Yang, et al., 2009). Agents that induce detoxification enzymes are classified as bifunctional and monofunctional, thus it was observed that the alkaloids pterogynine (IR = 2.67 ± 0.5) and pterogynidine (IR = 2.57 ± 0.9) induced QR in mutant cell line TAOc1BPrcl, where it was possible to observe doubling inducing activity without however, lead to cellular toxicity, characterizing the compounds as monofunctional inducers. It can be said that the alkaloids pterogynine and pterogynidine are prototypes chemopreventive agents contributing to inhibition the initial installation of events involved in the etiology of cancer.

Conclusion

Induction of the phase II detoxification enzymes such as QR is a useful strategy for cancer chemoprevention. Several plants have been found to contain cancer chemopreventive agents capable of inducing phase II enzymes. Notably some chemopreventive compounds are found in Brazilian Cerrado plants that can be effective strategy in cancer prevention.

Acknowledgements

This work was funded by grants from the “Sao Paulo State Research Foundation” FAPESP (Brazil), as part of the Biota-FAPESP – The Biodiversity Virtual Institute Program (www.bioprospecta.org.br), (n°03/02176-7) and FAPESP support n°09/52716-4.

References

- Banerjee, A., Dasgupta, N., De, B., (2005). In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*, 90,727-733.
- Bolzani, V.S., Gunatilaka, A.A.L., Kingston, D.G.I. (1995). Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. *Journal of Natural Product*, 11, 1683-1688.
- Borges, M.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Andrião-Escarso, S.H., Diniz, H., Hamaguchi, A., Quintero, A., Lizano, S., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R., Homs-Brandeburgo, M.I. (2000) Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A₂. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 127, 21-30.

Dinkova-Kostova, A.T., Talalay, P. (2000). Persuasive evidence that quinone reductase type 1 (DT diaphorase) protects cells against the toxicity of electrophiles and reactive forms of oxygen. *Free Radical Biol. Med.*, 29, 231-40.

Dametto, A.C. (2010). Bioprospection in *Eugenia jambolana* (Myrtaceae). Monographs – Institute of Chemistry, São Paulo State University, Araraquara, pp.139.

Duarte, R.A., Mello, E.R., Araki, C., Morais, M.C.C., Bolzani, V.S., Silva, D.H.S., Regasini, L.O., Silva, T.G.A., Soares, C.P. (2010). Alkaloids extracted from *Pterogyne nitens* induces apoptosis in malignant breast cancer cell line. *Tumor Biology*, 31,513-522.

Esteves, I., Souza, I.R., Rodrigues, M., Cardoso, L.G., Santos, L.S., Sertie, J.A., Perazzo, F.F., Lima, L.M., Schneedorf, J.M., Bastos, J.K., Carvalho, J.C. (2005). Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *J. Ethnopharmacol.*, 101, 191-196.

Fahey, J.W., Dinkova-Kostova, A.T., Stephenson, K.K., Talalay, P.(2004). Microtiter plate Bioassy for inducers of NQ01. *Meth. Enzymol.*, 382, 243-258.

Fahey, J.W.; Stephenson, K.K., (2002). Pinostrobin from Honey and Thai Ginger (*Boesenbergia pandurata*): A Potent Flavonoid Inducer of Mammalian Phase 2 Chemoprotective and Antioxidant Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 25, 7472-7476.

Gerhäuser, C., You, M., Liu, J., Moriarty, R.M., Hawthorne, M., Mehta, R.G.; Moon, R. C.; Pezzuto, J.M, (1997). Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug metabolizing enzymes. *Cancer Res.*, 57, 272-278.

Greenwald, P., (2001). From carcinogenesis to clinical interventions for cancer prevention. *Toxicology*, 166, 37-25.

Gross, H. B., Dalebout, T., Grubb, C.D., Abel, S. (2000). Functional detection of chemopreventive glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Sci.*, 159, 265-272.

Hou, D.X., Fujii, M., Terahara, N., Yoshimoto, M. (2004). Molecular mechanisms behind the chemopreventive effects of anthocyanidins. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 321-325.

Loguercio, A.P., Battistin, A., Vargas, A.C., Henzel, A., Witt, N.M. (2005). Antibacterial activity of hydroalcoholic extract of leaves jambolan (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Rural Science*, 35, 371-376.

Lopes, F.C.M., Rocha, A., Pirraco, A., Regasini, L.O., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S., Azevedo, I., Carlos, I.Z., Soares, R. (2009). Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea glandulosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9, 1-11.

Kelloff, G.J., Lippman, S.M., Dannenberg, A.J., Sigman, C.C., Pearce, H.L., Reid, B.J., Szabo, E., Jordan, V.C., Spitz, M.R., Mills, G.B., Papadimitrakopoulou, V.A., Lotan, R., Aggarwal, B.B., Bresalier, R.S., Kim, J., Arun, B., Lu, K.H., Thomas, M.E., Rhodes, H.E., Brewer, M.A., Follen, M., Shin, D.M., Parnes, H.L., Siegfried, J.M., Evans, A.A., Blot, W.J., Chow, W.H., Blount, P.L., Maley, C.C., Wang, K.K., Lam, S., Lee, J.J., Dubinett, S.M., Engstrom, P.F., Meyskens, F.L.Jr., O'Shaughnessy, J., Hawk, E.T., Levin, B., Nelson, W.G., Hong, W.K. (2006). Progress in chemoprevention drug development: the promise of molecular biomarkers for prevention of intraepithelial neoplasia and cancer — a plan to move forward. *Clin. Cancer Res.*, 12, 3661–3697.

Mahmoud, I.I., Marzouk, M.S.A., Moharram, F.A., El-Gind, M.R., Hassan, A.M.K. (2001). Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. *Phytochemistry*, 58, 1239-1244.

Malacrida, C.R., Motta, S. (2006). Anthocyanins in grape juice: composition and stability *B. Ceppa, Curitiba.*, 24,59-82.

O'Shaughnessy, J.A., Kelloff, G.J., Gordon, G.B., Dannenberg, A.J., Hong, W.K., Fabian, C.J., Sigman, C.C., Bertagnolli, M.M., Stratton, S.P., Lam, S., Nelson, W.G., Meyskens, F.L., Alberts, D.S., Follen, M., Rustgi, A.K., Papadimitrakopoulou, V., Scardino, P.T., Gazdar, A.F., Wattenberg, L.W., Sporn, M.B., Sakr, W.A., Lippman, S.M., Von Hoff, D.D. (2002). Treatment and prevention of intraepithelial neoplasia: an important target for accelerated new agent development. *Clin. Cancer Res.*, 8, 314–346.

Oliveira, A.M., Santos, A.G., Santos, R.A., Santos, A.G., Csipak, A.R., Olivato, C., Freitas, M.B., Bassi, C.L., Cavalheiro, A.J., Bolzani, V.S., Silva, D.H.S., Sakamoto-Hojo, E.T., Takahashi, C.S., Soares, C.P. (2009). Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caseargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. *Mutagenesis*, 24, 501-506.

Orbelies, N.H., Burgess, J.P., Navarro, H.A., Pinos, R.E., Fairchild, C.R., Peterson, R.W., Soejarto, D.D., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Wani, M.C., Wall, M.E. (2002). Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. *J. Nat. Prod.*, 65, 95-99.

Plaza, C.V. (2007). Phytochemical investigation and evaluation of antioxidant fruits and leaves of *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae). Monographs – Institute of Chemistry, São Paulo State University, Araraquara, pp.108.

Prochaska, H.J., Santamaria, A.B. (1988). Direct measurement of NAD(P)H: quinone reductase from cells cultured in microtiter wells screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.*, 169, 328-336.

Regasini, L.O., Velloso, J.C.R., Silva, D.H.S., Furlan, M., Oliveira, O.M., Khalil, N.M., Brunetti, I.L., Young, M.C.M., Barreiro, E.J., Bolzani, V.S. (2008). Flavonols from *Pterogyne nitens* and their evaluation as myeloperoxidase inhibitors. *Phytochemistry*, 69, 1739–1744.

Regasini, L.O., Castro-Gamboa, I., Silva, D.H.S., Furlan, M., Barreiro, E.J., Pinheiro-Ferreira, P.M., Pessoa, C., Lotufo, L.V.C., Moraes, M.O., Young, M.C.M., Bolzani, V.S. (2009), Cytotoxic Guanidine Alkaloids from *Pterogyne nitens*. *Journal of Natural Products* 72, 473-476.

Santos, A.G., Ferreira, P.M.P., Vieira Júnior, G.M., Perez, C.C., Tininis, A.G., Silva, G.H., Bolzani, V.S., Costa-Lotufo, L.V., Pessoa, C.do Ó., Cavalheiro, A.J. (2010). Casearin X its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumour human cells. *Chem. Biodivers.*, 7, 205-215.

Sertié, J.A.A., Carvalho, J.C.T., Panizza, S. (2000). Antiulcer activity of the crude extract from leaves of *Casearia sylvestris*. *Pharm. Biol.*, 38, 112-119.

Song, L.L., Kosmeder, J.W., Lee, S.K. (1999). Cancer chemopreventive activity mediated by 4'-bromoflavone, a potent inducer of phase II detoxification enzymes. *Cancer Research*, 59, 578-585.

Sporn, M.B., Dunlop, N.M., Newton, D.L., Smith, J.M. (1976). Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed. Proc.*, 35, 1332-1338.

Talalay, P., De Long, M. J. Prochaska, H. J. (1988). Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85,8261-8265.

Talalay, P., Fahey, J.W. (2001). Phytochemicals from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *J. Nutr.*, 131, 3027S-3033S.

Yang, J. Liu, R. H. (2009). Induction of phase II enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells in vitro by grape extracts and selected phytochemicals. *Food Chemistry*, 114, 898-904.

Yannai, S., Day, A. J. Williamson, G., Rhodes, M. J. C. (1998). Characterization of Flavonoids as Monofunctional or Bifunctional Inducers of Quinone Reductase in Murine Hepatoma Cell Lines. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 623-630.

World Health Organization, (2012):
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>

Table 1. Effect of *Eugenia jambolana* on QR Activity in Hepa 1c1c7 and Mutants

cell line	Methanolic crude extract (leaves) 10µg/ml			Methanolic crude extract (leaves) 20µg/ml			Methanolic crude extract (leaves) 30µg/ml			β-naphthoflavone (BNF)		
	CD ^a	IC ₅₀ ^b (µg/mL)	CI ^c	CD ^a	IC ₅₀ ^b (µg/mL)	CI ^c	CD ^a	IC ₅₀ ^b (µg/mL)	CI ^c	CD ^a	IC ₅₀ ^b (mM)	CI ^c
Hepa1c1c7	2.1±0.35	>50	ND	2.5±0.36	>50	ND	2.3±0.20	>50	ND	2.9±0.2	>20	>100
TAOc1BPrcl	1.3±0.50	ND	NA	1.4±0.87	ND	NA	1.4±0.61	ND	NA	0.9±0.31	>20	NA

^a Mean value of the concentration required to double the specific activity of QR and standard error SEM. ^b Mean value of the half-maximal inhibitory concentration of cell viability (SE). ^c Chemoprevention index: ratio between IC50 and CD. NA, not applicable. ND, not determined.

Table 2. Effect of *Eugenia jambolana* on QR Activity in Hepa 1c1c7 and Mutants

cell line	Methanolic crude extract (fruit) 30µg/mL			Hydro-alcoholic fraction (fruit) 20µg/mL			β-naphthoflavone (BNF)		
	CD ^a	IC ₅₀ ^b (µg/mL)	CI ^c	CD ^a	IC ₅₀ ^b (µg/mL)	CI ^c	CD ^a	IC ₅₀ ^b (mM)	CI ^c
Hepa1c1c7	2.0±0.1	>50	ND	2.5±0.06	>50	ND	2.9±0.2	>20	>100
TAOc1BPrcl	0.8±0.29	ND	NA	0.5±0.06	ND	NA	0.9±0.31	>20	NA

^a Mean value of the concentration required to double the specific activity of QR and standard error SEM. ^b Mean value of the half-maximal inhibitory concentration of cell viability (SE). ^c Chemoprevention index: ratio between IC50 and CD. NA, not applicable. ND, not determined.

Table 3. Effect of *Eugenia jambolana* on QR Activity in Hepa 1c1c7 and Mutants

cell line	n-Butanol fraction (leaves) 2,5µg/mL			n-Butanol fraction (leaves) 20µg/mL			n-Butanol fraction (leaves) 30µg/mL			β-naphthoflavone (BNF)		
	CD ^a	IC ₅₀ ^b (µg/mL)	CI ^c	CD ^a	IC ₅₀ ^b (µg/mL)	CI ^c	CD ^a	IC ₅₀ ^b (µg/mL)	CI ^c	CD ^a	IC ₅₀ ^b (mM)	CI ^c
Hepa1c1c7	2.1±0.34	35±2.3	16	2.0±0.30	35	17	2.6±0.36	35±2.3	13	2.9±0.2	>20	>100
TAOc1BPrcl	1.4±0.41	ND	NA	0.9±0.57	ND	NA	1.0±0.42	ND	NA	0.9±0.31	>20	NA

^a Mean value of the concentration required to double the specific activity of QR and standard error SEM. ^b Mean value of the half-maximal inhibitory concentration of cell viability (SE). ^c Chemoprevention index: ratio between IC50 and CD. NA, not applicable. ND, not determined.

Table 4. Effect of pterogynine and pterogynidine on QR Activity in Hepa 1c1c7 and Mutants

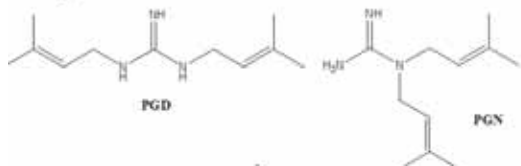
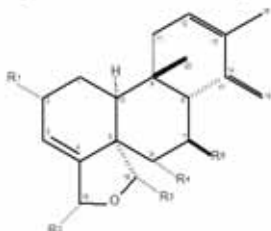
cell line	pterogynine (0.3mM)			pterogynidine (0.3mM)			β-naphthoflavone (BNF)		
	CD ^a	IC ₅₀ ^b (mM)	CI ^c	CD ^a	IC ₅₀ ^b (mM)	CI ^c	CD ^a	IC ₅₀ ^b (mM)	CI ^c
Hepa1c1c7	2.9±0.8	1.5±0.6	0.5	2.8±0.7	2.2±0.5	0.7	3.2±0.4	>20	>100
TAOc1BPrcl	2.6±0.5	1.4±0.2	0.5	2.57±0.9	2.3±0.7	0.9	1.0±0.5	>20	NA

^a Mean value of the concentration required to double the specific activity of QR and standard error SEM. ^b Mean value of the half-maximal inhibitory concentration of cell viability (SE). ^c Chemoprevention index: ratio between IC50 and CD. NA, not applicable. ND, not determined.

Table 5: Activity of the enzyme quinone reductase in Hepa 1c1c7 cell line

Compounds	IR	Surv (%)
<i>Eugenia jambolana</i>		
Hydroalcoholic fraction (leaves)	0.8 ± 0.03	93.3 ± 4.6
Hexane fraction (leaves)	0.4 ± 0.05	76 ± 6.5
Ethil acetate fraction (leaves)	1.1 ± 0.20	94.3 ± 2.9
n-Butanol fraction (fruits)	0.7 ± 0.05	96.8 ± 2.2
Ethil acetate fraction (fruits)	0.6 ± 0.04	95.3 ± 8.9
<i>Casearia sylvestris</i>		
Ethanollic extract (leaves) (0.7 µg/mL)	1.1 ± 0.03	95.3 ± 5.4
Casearin B (0.61 µM)	1.3 ± 0.09	90.7 ± 12.4
Casearin D (0.21 µM)	1.4 ± 0.39	96.1 ± 4.3
Casearin X (0.44 µM)	1.2 ± 0.13	93.5 ± 8.7
Caseargrewiin F (0.09 µM)	1.1 ± 0.01	87.4 ± 13.4
β-naphthoflavone	2.9 ± 0.21	98,3 ± 5.6

QR Induction by *E. jambolana* and *Casearia sylvestris* in Hepa 1c1c7 cell line. IR: induction ratio; surv. %: cell survival % at highest concentration tested. Results are expressed as mean ± standard error (M ± SE) of three independent experiments

Pterogyne nitens - alkaloids*Casearia sylvestris* - clerodane diterpenes

Clerodane diterpenes	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
Casearin B	OMe	OAc	OAc	OAc	OBu
Casearin D	OH	OBu	OAc	OH	OBu
Casearin X	OBu	OBu	OAc	OH	H
Caseagrevin F	OBu	OAc	OAc	OH	H

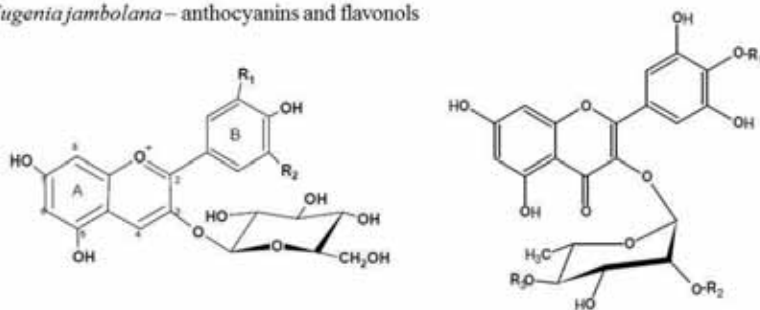
Eugenia jambolana – anthocyanins and flavonols

Figure 1. Chemical structure of compound's *P. nitens*, *C. sylvestris* and *E. jambolana*.