

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À
FARMÁCIA

“Potencial estrogênico, antimutagênico e antigenotóxico de extratos e substâncias isoladas do gênero *Syngonanthus* (Eriocaulaceae) e efeito inibidor na expressão de genes por xantonas de *Syngonanthus nitens*”

ANA PAULA OLIVEIRA-HÖHNE

Setembro - 2013

Araraquara – SP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À
FARMÁCIA

“Potencial estrogênico, antimutagênico e antigenotóxico de extratos e substâncias isoladas do gênero *Syngonanthus* (Eriocaulaceae) e efeito inibidor na expressão de genes por xantonas de *Syngonanthus nitens*”

ANA PAULA OLIVEIRA-HÖHNE

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

ORIENTADORA: PROF^a DR^a ELIANA A. VARANDA

Setembro - 2013

Araraquara – SP

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNESP – Campus de Araraquara

- O48p Oliveira-Höhne, Ana Paula
Potencial estrogênico, antimutagênico e antigenotóxico de extratos e substâncias isoladas do gênero *Syngonanthus* (Eriocaulaceae) e efeito inibidor na expressão de genes por xantonas de *Syngonanthus nitens* / Ana Paula Oliveira-Höhne. – Araraquara, 2013
186 f.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Eliana Aparecida Varanda
1. Antimutagenicidade. 2. Antigenotoxicidade. 3. Estrogenicidade. 4. Atividade Antitumoral. 5. Eriocaulaceae. 6. Syngonanthus. I. Varanda, Eliana Aparecida, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

**Esta tese foi realizada com o apoio financeiro da Fundação
de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) –
Processo nº 2010/12857-5**

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, que me deram a vida
e a sabedoria para conduzi-la da melhor maneira
possível e ao meu companheiro de vida, Leonardo, por
ter sido meu suporte mais fiel nos anos dedicados a este
trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à querida Profª Eliana Varanda que me conduziu com maestria pelos caminhos e desafios da pós-graduação, sendo mais do que uma orientadora, uma mãe.

Às Profª Denise Crispim Tavares e Raquel Alves dos Santos por terem aceitado compor a banca do Exame de Qualificação e pelas suas sugestões pertinentes e enriquecedoras.

Aos Profº Fábio Vieira dos Santos, Fernando Rogério Pavan, Raquel Alves dos Santos e Valéria Valente pela participação na banca de Defesa de Doutorado e pelas contribuições ímpares a este trabalho.

Aos colegas de laboratório Flávia Resende, Paula Boldrin, Catarine Nogueira, Livia Espanha, Rone De Grandis, por terem sido companheiros, pacientes e pelos momentos de descontração. Em especial, à Mariana Santoro, por ter me ensinado e ajudado nos meus experimentos de Cometa e de PCR Array.

À técnica da microbiologia, Sílvia Oliveira, pela amizade de sempre e pelas conversas de apoio e conforto.

Aos colegas dos laboratórios de Biologia Molecular e de Micobacteriologia pela disposição em ajudar, por emprestar prontamente os aparelhos que não dispúnhamos e pelas dicas valiosas. Em especial à Drª Mariana Santoni por ter me ajudado a conduzir melhor os experimentos de PCR Array e a interpretar os dados.

A minha família, a de nascimento e a de casamento, pelo conforto, pelos ensinamentos e por terem entendido a minha ausência nesses anos dedicados ao trabalho.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação pelo profissionalismo e atenção.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

Capítulo I

Resumo

Abstract

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Produtos Naturais.....	22
1.2. Família Eriocaulaceae	25
1.3. Atividades Biológicas.....	30
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. Objetivo Geral.....	41
2.2. Objetivos Específicos.....	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. Material Vegetal	42
3.2. Ensaios Biológicos.....	47
4. RESULTADOS	80
4.1. Mutagenicidade.....	80
4.2. Antimutagenicidade.....	82
4.3. Genotoxicidade.....	89
4.4. Antigenotoxicidade	92
4.5. Citotoxicidade	98
4.6. Estrogenicidade.....	104
4.7. Modulação da Expressão Gênica	112

5. DISCUSSÃO.....	116
5.1. Composição da Mistura M.....	116
5.2. Mutagenicidade e Antimutagenicidade	117
5.3. Genotoxicidade e Antigenotoxicidade.....	122
5.4. Citotoxicidade	126
5.5. Estrogenicidade.....	129
5.6. Modulação da Expressão Gênica	137
6. CONCLUSÕES.....	149
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	150
8. ANEXOS.....	170
PUBLICAÇÃO REFERENTE AO TRABALHO.....	177

CAPÍTULO I

RESUMO

Os extratos metanólicos dos capítulos de quatro espécies, pertencentes à família Eriocaulaceae, *Syngonanthus dealbatus* (Sd), *S. macrolepis* (Sm), *S. nitens* (Sn) e *S. suberosus* (Ss), suas substâncias isoladas, 1 (luteolina), 2 (1,5,7-trihidroxí-3,6-dimetoxixantona), 3 (1,3,6,8-tetrahidroxí-2,5-dimetoxixantona), 4 (1,3,6,8-tetrahidroxí-5-metoxixantona), 5 (7-metoxiluteolina-8-c- β -glicopiranosídeo), 6 (7-metoxiluteolina-6-c- β -glicopiranosídeo), 7 (7,3'-dimetoxiluteolina-6-c- β -glicopiranosídeo), 8 (6-hidroxiluteolina) e a mistura M (A-1,3,6-trihidroxí-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidroxí-2,5-dimetoxixantona) foram avaliados quanto ao seu potencial em causar mutações e também de prevenir o acontecimento dessas, através do teste de Ames e verificou-se que todos os extratos e suas substâncias isoladas não foram considerados mutagênicos sob as condições testadas, e que os mesmos apresentaram um efeito antimutagênico de forte a moderado contra a aflatoxina B₁ (AFB₁), o benzo[a]pireno (BaP), o 4-nitro-*o*-fenilenodiamino (NPD), a mitomicina C (MMC) e a azida sódica (AS); quanto ao potencial em causar danos no DNA e de prevenir e/ou reparar os danos causados por agentes genotóxicos por meio do ensaio Cometa, que identificou os extratos Sd, Sn e Ss e as flavonas 1 e 5 como causadores de dano significativo no DNA das células HepG2, após 4 horas de tratamento, dano esse que foi reparado pelas células, visto que nenhum efeito genotóxico foi observado após 24 horas. E ainda Sm, Sn e Ss e todas as isoladas, exceto 8, foram capazes de inibir os danos causados pelo agente genotóxico MMS no DNA; quanto ao seu potencial citotóxico frente às células cancerosas HepG2 e MCF-7/BUS, que identificou que todos os extratos, exceto Sm, e todas as substâncias isoladas foram capazes de induzir morte das células HepG2 significativamente, com a maioria das amostras alcançando 50% de morte celular. Já na linhagem MCF-7/BUS, após 24 horas de tratamento, foram encontrados valores menores que 50% de morte celular, demonstrando a maior resistência dessas células; e quanto ao seu potencial estrogênico, através de duas metodologias, o RYA e o *E-screen*, cujos resultados apontam para o caráter estrogênico de Sn, provavelmente devido à presença em sua composição das xantonas 4 e A, da mistura M, as quais apresentaram maior potencial estrogênico dentre as isoladas. E como os melhores resultados foram encontrados para a mistura M, essa foi avaliada quanto ao seu efeito modulador na expressão de 84 genes relacionados ao câncer de mama, através da metodologia do *PCR Array*, que identificou alterações significativas na expressão de 29 genes (sendo 24 destes mais expressos e 5 menos expressos), em comparação ao controle. A maioria dos genes alterados está relacionada com susceptibilidade à apoptose, favorecimento ou

inibição de metástases, com a regulação dos hormônios sexuais e susceptibilidade aos danos no DNA. Portanto, este estudo revelou uma excelente capacidade, dos extratos e suas substâncias isoladas, em proteger o DNA contra mutações e danos; um bom potencial estrogênico dos mesmos, sendo as xantonas isoladas de Sn apontadas como possíveis substituintes da terapia hormonal e, ainda, um bom potencial antitumoral da mistura M.

Palavras-chave: Antimutagenicidade, Antigenotoxicidade, Estrogenicidade, Atividade Antitumoral, Eriocaulaceae, *Syngonanthus*.

ABSTRACT

The methanol extracts of capitula of four species belonging to the Eriocaulaceae family, *Syngonanthus dealbatus* (Sd), *S. macrolepis* (Sm), *S. nitens* (Sn) and *S. suberosus* (Ss), its isolated compounds 1 (luteolin), 2 (1,5,7-trihydroxy-3,6-dimethoxyxanthone), 3 (1,3,6,8-tetrahydroxy-2,5-dimethoxyxanthone), 4 (1,3,6,8-tetrahydroxy-5-methoxyxanthone), 5 (7-methoxyluteolin-8-C- β -glucopyranoside), 6 (7-methoxyluteolin-6-C- β -glucopyranoside), 7 (7,3'-dimethoxyluteolin-6-C- β -glucopyranoside), 8 (6-hydroxyluteolin) and the mixture M (A-1,3,6-trihydroxy-2-methoxyxanthone and B-1,3,6-trihydroxy-2,5-dimethoxyxanthone) were evaluated for their potential to cause mutations and also to prevent the occurrence of them, using the Ames test, and it was found that all extracts and their isolated compounds were not considered mutagenic under the test conditions, and they also showed a strong to moderate antimutagenic effect against aflatoxin B1 (AFB1), benzo[a]pyrene (BaP), 4-nitro-o-phenilenodiamine (NPD), mitomycin C (MMC) and sodium azide (SA). They were also evaluated for the potential to cause DNA damage and to prevent and/or repair the damage caused by genotoxic agents, using the Comet assay, which identified the extracts Sd, Sn, Ss and the flavones 1 and 5 as causing significant DNA damage, after 4 hours of treatment. Such damage has been repaired by the cells, since no genotoxic effect was observed after 24 hours. Also Sm, Sn, Ss and all isolated compounds, except 8, were able to inhibit the damage caused by the genotoxic agent MMS. They were evaluated for their potential to cause cancer cells (HepG2 and MCF-7/BUS) death, and we found that all extracts, except Sm, and all the compounds were able to induce significant death of HepG2 cells, with most of the samples reaching 50% cell death. In MCF-7/BUS cells, after 24 hours of treatment, values were lower than 50% cell death, demonstrating the greater resistance of these cells. And evaluated for their estrogenic potential using two methodologies, the RYA and the *E-screen* assay, which results pointed to the estrogenic character of Sn, probably due to the presence of xanthon 4 and A, of the mixture M, in its composition, which showed higher estrogenic potential among isolated. And since the best results were found for the mixture M, this was assessed for its effect in modulating the expression of 84 genes related to breast cancer, using the *PCR Array* that identified significant changes in the expression of 29 genes (24 of these were down-regulated and 5 up-regulated) in comparison to the control. Most altered genes are related to susceptibility to apoptosis, inhibition of metastasis, regulation of sex hormones and susceptibility to DNA damage. Therefore, this study showed an excellent capacity of extracts and isolated compounds to protect DNA against damage and mutations, a good estrogenic

potential of them, being xanthenes isolated Sn identified as possible substituents of hormone therapy and a good antitumor potential of the mixture M.

Keywords: Estrogenicity, Antimutagenicity, Antigenotoxicity, Antitumoral Activity, Eriocaulaceae, *Syngonanthus*.

LISTA DE ABREVIATURAS

1 - luteolina

2 - 1,5,7-trihidroxi-3,6-dimetoxixantona

2-AMA - 2-aminoantraceno

2-AMF - 2-aminofluoreno

2-OHE₂ - estrógeno catecol 2-hidroxiestradiol

3 - 1,3,6,8-tetrahidroxi-2,5-dimetoxixantona

4 - 1,3,6,8-tetrahidroxi-5-metoxixantona

4-OHE₂ - estrógeno catecol 4-hidroxiestradiol

5 - 7-metoxiluteolina-8-c- β -glicopiranosídeo

6 - 7-metoxiluteolina-6-c- β -glicopiranosídeo

7 - 7,3'-dimetoxiluteolina-6-c- β -glicopiranosídeo

8 - 6-hidroxiluteolina

A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona

a.C. – Antes de Cristo

AFB₁ - aflatoxina B₁

ANOVA – análise de variância

AS - azida sódica

ATV - tripsina/ versene

B-1,3,6-triidroxi-2,5-dimetoxixantona

BaP - benzo[a]pireno

CASB - casearina B

cDNA - DNA complementar

Ct – ciclo *threshold*

DMEM - *Dulbecco's modification of Eagle's médium*

DMEM/ –H - meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino livre de hormônios

DMSO – dimetilsufóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP - Desvio Padrão

DXR – doxorubicina

E₂ - Hormônio 17β- estradiol

EC₅₀ - concentração efetiva mediana

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

EEQ - Estradiol-equivalente

EMT - transição epitelial-mesenquimal (*epithelial-mesenchymal transition*)

EP – efeito proliferativo

EPR - efeito proliferativo relativo

ESI-MSⁿ - Espectroscopia de Massas

Ex-DCM – extrato diclorometano

Ex-Hex - extrato hexânico

Ex-MeOH - extrato metanólico

FCFRP/USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo

HepG2 – Células de hepatocarcinoma

HK – hinoquinina

HPLC-DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjos de diodo (*High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector*)

HPLC-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, operando na luz ultravioleta. (*High-Performance Liquid Chromatography*)

HSCCC - cromatografia de contra-corrente de alta velocidade (*High-Speed Counter-Current Chromatography*)

I% - índice de inibição

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IQ - 2-amino-3-metilimidazo[4,5-*f*]quinolina

M – mistura M

MCF-7 ou MCF-7/BUS – Células de carcinoma mamário

MeOH – metanol

MMC – mitomicina C

MMS – metilmetanossulfonato

MuGal - 4-metilumbeliferona- β -D-galactopiranosídeo
N-OH-IQ - derivado nitro-hidroxilado do composto IQ
NPD - 4-nitro-*o*-fenilenodiamino
PBS - *Phosphate Buffered Saline*
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PhIP - 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5- β]-piridina
PTFE - Membrana em Politetrafluoretileno
RNA – ácido ribonucleico
RE – Receptor de Estrógeno
RE α - Receptor α -estrogênico
RE β - Receptor β -estrogênico
RM – razão de mutagenicidade
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RT-qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real quantitativa
RYA – Ensaio com leveduras recombinantes (*Recombinant Yeast Assay*)
S9 – fração microsomal de fígado de ratos tratados com Aroclor 1254
Sd – Extrato metanólico dos capítulos de *Syngonanthus dealbatus*
Sm – Extrato metanólico dos capítulos de *Syngonanthus macrolepis*
Sn – Extrato metanólico dos capítulos de *Syngonanthus nitens*.
Ss – Extrato metanólico dos capítulos de *Syngonanthus suberosus*
T47-D- linhagem de células de carcinoma ductal mamário
TA97a, TA98, TA100, TA102 – cepas de *Salmonella typhimurium*
TFA – ácido trifluoracético
TM - *Tail Moment*
UNESP – Universidade Estadual Paulista
USA – Estados Unidos da América (*United States of America*)
Y-PER – tampão de lise

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descrição	Página
1.	Mapa do Estado de Minas Gerais no qual se destaca a ocorrência da Cadeia do Espinhaço compreendida entre Belo Horizonte e o Estado da Bahia (MENEZES e GIULIETTI, 1986).	26
2.	Coleta e confecção artesanal de objetos usando as “semprevivas” como matéria-prima (ISPN, 2013; O JORNAL, 2013a).	27
3.	Exsicatas das espécies utilizadas neste estudo. [a] <i>S. nitens</i> ; [b] <i>S. dealbatus</i> ; [c] <i>S. suberosus</i> e [d] <i>S. macrolepis</i> . (FIELD MUSEUM, 2013).	29
4.	Mecanismos de transdução de sinal promovidos por estrógenos endógenos e xenoestrógenos (FRIEDRICH, 2003).	37
5.	Estrutura química dos isoflavonoides de <i>Glycine max</i> (L.) Merrill (LEHMANN <i>et al.</i> , 2005).	38
6.	Estruturas das Xantonas e Flavonas, respectivamente, identificadas em <i>Syngonanthus nitens</i> .	46
7.	Mecanismo de ação exercido pelo RYA.	66
8.	Fluxograma da análise da expressão gênica por <i>PCR Array</i> . Esquema ilustrando o sistema de PCR em tempo real (<i>RT² ProfilerTM PCR Array System</i>) e as fases desde a obtenção do RNA até a análise dos resultados.	78
9.	Estruturas das xantonas e seus valores EEQ encontrados no teste RYA. No detalhe, em vermelho, suas hidroxilas e, em azul, suas metoxilas.	132
10.	Comparação entre as estruturas da genisteína (laranja) e do 17- β -estradiol (preto).	133
11.	Estruturas de (A) apigenina e (G) genisteína.	134

LISTA DE TABELAS

Tabela	Descrição	Página
1.	Massas, em gramas, e rendimento dos extratos obtidos dos capítulos das espécies de <i>Syngonanthus</i> (Eriocaulaceae).	43
2.	Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa $\pm$ desvio padrão e razão de mutagenicidade (RM) dos extratos metanólicos de <i>Syngonanthus dealbatus</i> (S.), <i>S. macrolepsis</i> (Sm), <i>S. nitens</i> (Sn) e <i>S. suberosus</i> (Ss) nas linhagens TA100, TA98, TA97a e TA102 de <i>S. typhimurium</i> em ausência (-S9) e em presença de metabolização (+S9).	81
3.	Atividade antimutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa $\pm$ desvio padrão (DP) e índice de inibição (I%) dos extratos metanólicos de <i>Syngonanthus dealbatus</i> (Sd) e <i>S. macrolepsis</i> (Sm) nas linhagens TA100, TA98 e TA102 de <i>S. typhimurium</i> em ausência (-S9) e em presença de metabolização (+S9).	85
4.	Atividade antimutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa $\pm$ desvio padrão (DP) e índice de inibição (I%) dos extratos metanólicos de <i>Syngonanthus nitens</i> (Sn) e <i>S. suberosus</i> (Ss) nas linhagens TA100, TA98 e TA102 de <i>S. typhimurium</i> em ausência (-S9) e em presença de metabolização (+S9).	86
5.	Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa $\pm$ desvio padrão e razão de mutagenicidade (RM) das substâncias isoladas, <u>1</u> a <u>8</u> , e da mistura <u>M</u> (<u>A</u> -1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e <u>B</u> -1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), nas linhagens TA100 e TA98 de <i>S. typhimurium</i> na presença de metabolização (+S9).	87
6.	Atividade antimutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa $\pm$ desvio padrão (DP) e índice de inibição (I%) das substâncias isoladas <u>1</u> a <u>8</u> , e da mistura <u>M</u> (<u>A</u> -1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e <u>B</u> -1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), nas linhagens TA100 e TA98 de <i>S. typhimurium</i> na presença de metabolização (+S9).	88
7.	Valores médios da porcentagem de DNA na cauda (% DNA) e <i>Tail Moment</i> (TM) $\pm$ desvio padrão (DP) obtidos através do Teste do Cometa alcalino em células HepG2 tratadas por 4 e 24 horas com os extratos metanólicos de <i>S. dealbatus</i> (Sd), <i>S. macrolepsis</i> (Sm), <i>S. nitens</i> (Sn) e <i>S. suberosus</i> (Ss) e seus respectivos controles positivo e negativo.	90
8.	Valores médios da porcentagem de DNA na cauda (% DNA) e <i>Tail Moment</i> (TM) $\pm$ desvio padrão (DP) obtidos através do Teste do Cometa alcalino em células HepG2 tratadas por 4 e 24 horas com as substâncias isoladas, <u>1</u> a <u>8</u> , e da mistura <u>M</u> (<u>A</u> -1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e <u>B</u> -1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), e seus respectivos controles positivo e negativo.	91
9.	Valores médios da porcentagem de DNA na cauda (% DNA),	94

	<i>Tail Moment</i> (TM) $\pm$ desvio padrão (DP) e porcentagem de inibição (% I) obtidos através do Teste do Cometa alcalino em células HepG2 co-tratadas por 30 minutos com os extratos metanólicos de <i>S. dealbatus</i> (Sd), <i>S. macrolepsis</i> (Sm), <i>S. nitens</i> (Sn) e <i>S. suberosus</i> (Ss), adicionados de metilmetanosulfonato (MMS), e seus respectivos controles positivo e negativo.	
10.	Valores médios da porcentagem de DNA na cauda (% DNA), <i>Tail Moment</i> (TM) $\pm$ desvio padrão (DP) e porcentagem de inibição (% I) obtidos através do Teste do Cometa alcalino em células HepG2 tratadas por 4 horas com os extratos metanólicos de <i>S. dealbatus</i> (Sd), <i>S. macrolepsis</i> (Sm), <i>S. nitens</i> (Sn) e <i>S. suberosus</i> (Ss), adicionados após 30 minutos de tratamento com metilmetanosulfonato (MMS), e seus respectivos controles positivo e negativo.	95
11.	Valores médios da porcentagem de DNA na cauda (% DNA), <i>Tail Moment</i> (TM) $\pm$ desvio padrão (DP) e porcentagem de inibição (% I) obtidos através do Teste do Cometa alcalino em células HepG2 co-tratadas por 30 minutos com as substâncias isoladas <u>1</u> a <u>8</u> , e da mistura <u>M</u> (<u>A</u> -1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e <u>B</u> -1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), adicionados de metilmetanosulfonato (MMS), e seus respectivos controles positivo e negativo.	96
12.	Valores médios da porcentagem de DNA na cauda (% DNA), <i>Tail Moment</i> (TM) $\pm$ desvio padrão (DP) e porcentagem de inibição (% I) obtidos através do Teste do Cometa alcalino em células HepG2 tratadas por 4 horas com as substâncias isoladas <u>1</u> a <u>8</u> , e da mistura <u>M</u> (<u>A</u> -1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e <u>B</u> -1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), adicionados após 30 minutos de tratamento com metilmetanosulfonato (MMS), e seus respectivos controles positivo e negativo.	97
13.	Média da porcentagem de morte celular $\pm$ desvio padrão (DP) encontrados na linhagem de HepG2 após o tratamento de 24 horas com diferentes concentrações dos extratos metanólicos dos capítulos de Sd, Sm, Sn e Ss, bem como de suas oito substâncias isoladas <u>1</u> a <u>8</u> , e da mistura <u>M</u> (<u>A</u> -1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e <u>B</u> -1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), e seus respectivos controles.	101
14.	Média da porcentagem de morte celular $\pm$ desvio padrão (DP) encontrados na linhagem celular MCF-7/BUS após o tratamento de 24 horas com diferentes concentrações dos extratos metanólicos dos capítulos de Sd, Sm, Sn e Ss, bem como de suas oito substâncias isoladas <u>1</u> a <u>8</u> , e da mistura <u>M</u> (<u>A</u> -1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e <u>B</u> -1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), e seus respectivos controles.	102
15.	Média da porcentagem de morte celular $\pm$ desvio padrão (DP) encontrados na linhagem celular MCF-7/BUS após o tratamento de 144 horas (6 dias) com diferentes concentrações dos extratos metanólicos dos capítulos de Sd, Sm, Sn e Ss, bem como de suas oito substâncias isoladas <u>1</u> a <u>8</u> , e da mistura <u>M</u> (<u>A</u> -1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e <u>B</u> -1,3,6-trihidroxi-2,5-	103

	dimetoxixantona), e seus respectivos controles.	
16.	Valores de IC ₅₀ encontrados na linhagem HepG2 após o tratamento com diferentes concentrações dos extratos metanólicos dos capítulos de Sd, Sm, Sn e Ss, bem como de suas oito substâncias isoladas <u>1</u> a <u>8</u> , e da sua mistura <u>M</u> (<u>A</u> -1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e <u>B</u> -1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), e seu controle positivo (doxorubicina – DXR).	104
17.	Valores de IC ₅₀ encontrados na linhagem celular MCF-7/BUS após o tratamento, de 24 e 144 horas, com diferentes concentrações dos extratos metanólicos dos capítulos de Sd, Sm, Sn e Ss, bem como de suas oito substâncias isoladas <u>1</u> a <u>8</u> , e da sua mistura <u>M</u> (<u>A</u> -1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e <u>B</u> -1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), e seu controle positivo (doxorubicina – DXR).	104
18.	Atividade estrogênica, expressa através da média das Unidades de Fluorescência $\pm$ Desvio Padrão (DP) de cada diluição testada através do teste RYA, dos extratos metanólicos dos extratos de <i>S. dealbatus</i> (Sd), <i>S. macrolepis</i> (Sm), <i>S. nitens</i> (Sn) e <i>S. suberosus</i> (Ss), de suas oito substâncias isoladas (<u>1</u> a <u>8</u>) e de sua mistura <u>M</u> (<u>A</u> -1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e <u>B</u> -1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), além dos controles negativo e positivo.	106
19.	Atividade estrogênica expressa pela média e desvio padrão (DP) das absorbâncias obtidas por cada concentração testada dos extratos (Sd, Sm, Sn e Ss), das substâncias isoladas (<u>1</u> a <u>8</u>) e da mistura <u>M</u> (<u>A</u> -1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e <u>B</u> -1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona); pelo seu efeito proliferativo (EP) e pelo seu efeito proliferativo relativo (EPR), avaliados pelo ensaio <i>E-screen</i> .	111
20.	Quantidade e pureza das amostras de RNA obtidas das células MCF-7/BUS tratadas (teste 1-3) e não tratadas (controles 1-3) com a mistura <u>M</u> (<u>A</u> -1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e <u>B</u> -1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), obtida dos capítulos de <i>S. nitens</i> .	113
21.	Genes que tiveram a sua expressão modificada no ensaio do <i>PCR Array</i> . Média do aumento (itálico) ou diminuição (negrito) na expressão de diferentes genes em células MCF-7/BUS após tratamento de 24 horas com a mistura <u>M</u> (<u>A</u> -1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e <u>B</u> -1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona).	115
22.	Valores de Cts obtidos para cada controle endógeno em todos os <i>PCR Array</i> dos controles e testes.	116

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico	Descrição	Página
1.	Atividade estrogênica expressa em Estradiol-Equivalentes (nM) + Desvio Padrão (DP), obtidos pelo teste RYA (<i>Recombinant Yeast Assay</i>), dos extratos metanólicos de capítulos de <i>S. dealbatus</i> (Sd), <i>S. macrolepis</i> (Sm), <i>S. nitens</i> (Sn), <i>S. suberosus</i> (Ss), de suas substâncias isoladas, <u>1</u> a <u>8</u> , e da mistura <u>M</u> , além do seu controle negativo (DMSO), na linhagem BY4741 da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (<u>1</u> = luteolina; <u>2</u> = 1,5,7-trihidroxi-3,6-dimetoxixantona; <u>3</u> = 1,3,6,8-tetrahidroxi-2,5-dimetoxixantona; <u>4</u> = 1,3,6,8-tetrahidroxi-5-metoxixantona; <u>5</u> = 7-metoxiluteolina-8-c- β -glicopiranosídeo; <u>6</u> = 7-metoxiluteolina-6-c- β -glicopiranosídeo; <u>7</u> = 7,3'-dimetoxiluteolina-6-c- β -glicopiranosídeo, <u>8</u> = 6-hidroxiluteolina e <u>M</u> = mistura de <u>A</u> -1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e <u>B</u> -1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona). * P < 0,05.	106
2.	Valores de atividade estrogênica, em unidades de fluorescência, medida por 20 minutos, das cinco diluições do extrato metanólico dos capítulos de <i>S. nitens</i> (Sn) e de seus controles negativo (Controle-: DMSO), de viabilidade (Estradiol + a diluição de 1:30 do extrato) e positivo (Estradiol: E ₂).	108
3.	Valores de atividade estrogênica, em unidades de fluorescência, medida por 20 minutos, das cinco diluições da substância <u>2</u> (1,5,7-trihidroxi-3,6-dimetoxixantona) e de seus controles negativo (Controle-: DMSO), de viabilidade (Estradiol + a diluição de 1:30 do extrato) e positivo (Estradiol: E ₂).	108
4.	Valores de atividade estrogênica, em unidades de fluorescência, medida por 20 minutos, das cinco diluições da substância <u>3</u> (3,6,8-tetrahidroxi-2,5-dimetoxixantona) e de seus controles negativo (Controle-: DMSO), de viabilidade (Estradiol + a diluição de 1:30 do extrato) e positivo (Estradiol: E ₂).	109
5.	Valores de atividade estrogênica, em unidades de fluorescência, medida por 20 minutos, das cinco diluições da substância <u>4</u> (1,3,6,8-tetrahidroxi-5-metoxixantona) e de seus controles negativo (Controle-: DMSO), de viabilidade (Estradiol + a diluição de 1:30 do extrato) e positivo (Estradiol: E ₂).	109
6.	Valores de atividade estrogênica, em unidades de fluorescência, medida por 20 minutos, das cinco diluições da mistura <u>M</u> (<u>A</u> -1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e <u>B</u> -1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona) e de seus controles negativo (Controle-: DMSO), de viabilidade (Estradiol + a diluição de 1:30 do extrato) e positivo (Estradiol: E ₂).	110

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produtos Naturais

As plantas medicinais têm sido utilizadas tradicionalmente para o tratamento de várias enfermidades. Sua aplicação é vasta e abrange desde o combate ao câncer (CALIXTO, 2000; SILVA *et al.*, 2004; VIEGAS-JR *et al.*, 2006) até microrganismos patogênicos (KUREPINA *et al.*, 2013; KHALED *et al.*, 2013).

Pode-se considerar como planta medicinal aquela planta administrada sob qualquer forma e por alguma via ao homem, exercendo algum tipo de ação farmacológica. As plantas podem ser classificadas de acordo com sua ordem de importância, iniciando-se pelas plantas empregadas diretamente na terapêutica, seguidas daquelas que constituem matéria-prima para manipulação e, por último, as empregadas na indústria para obtenção de princípios ativos ou como precursores em semi-síntese (FOGLIO *et al.*, 2006).

No Brasil, a utilização popular dos produtos naturais obtidos de plantas sempre foi bastante frequente, por ser um dos países de maior biodiversidade do planeta que, aliada a uma rica diversidade étnica e cultural, detém um valioso conhecimento tradicional sobre o uso de plantas medicinais. Além disso, apresenta potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas (BRASIL, 2006).

Esses produtos naturais, com fins terapêuticos ou usados em rituais religiosos, provêm de diferentes origens e culturas tradicionais, principalmente de índios brasileiros e seitas afro-brasileiras, e da cultura e tradição africana e europeia. O uso e o comércio destes recursos, como em outros países, foram estimulados pelas necessidades de uma crescente população que demandava cada vez mais plantas medicinais para o cuidado de sua saúde e para seus cultos e tradições religiosas; pela facilidade de acesso devido aos custos elevados da medicina ocidental, aos efeitos colaterais provocados pelos fármacos sintéticos; além do crescente interesse nacional e internacional pelo potencial terapêutico e econômico que representam e

da demanda de novos produtos pela indústria farmacêutica (BRASIL, 2006; CARRARA, 1995; SIMÕES *et al.*, 1998).

Como emprego medicinal poder-se-ia citar centenas de exemplos, porém alguns são clássicos como é o caso da *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae), vulgarmente conhecida por papoula, planta usada para a extração do ópio, cujo componente majoritário é a morfina - isolada por Setürner -, princípio ativo empregado para combater a dor desde 1803-04. Passado mais de um século isolou-se desta mesma planta a codeína (Robiquet) e mais tarde a papaverina (Merck). Indícios arqueológicos indicam seu uso há 4000 anos a.C. Outro exemplo marcante é o da *Digitalis purpurea* L. e a *Digitalis lanata* Ehr., plantas que foram a origem da descoberta de medicamentos para o coração. Delas extraem-se glicosídeos cardiotônicos chamados cardenolídeos, sendo os mais utilizados a digitoxina e a digoxina. Estas plantas também têm uma longa história, pois egípcios e romanos já faziam uso delas pelas propriedades diuréticas e tóxicas. Foi durante a antiguidade Egípcia, Grega e Romana que se acumularam conhecimentos empíricos transmitidos, principalmente pelos árabes, aos herdeiros destas civilizações. Isto prova que, desde as mais antigas civilizações, as plantas são utilizadas como fitoterápicos (FELLOWS, 1992; HOSTETTMANN *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2004; YUNES e CECHINEL-FILHO, 2001).

Além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, as plantas têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica, como a emetina (SANTOS *et al.*, 2008), a vincristina (FARO *et al.*, 2009), a colchicina (BORSTAD *et al.*, 2004), a rutina (RODRIGUES *et al.*, 2003). A cada momento são relacionadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica como a forskolina, o taxol (BUSHMAN *et al.*, 2013; DUONG e YUNG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013a) e a artemisinina (LAXMINARAYAN *et al.*, 2012; KLONIS *et al.*, 2013).

Na última década, cerca de 60% dos quimioterápicos eram advindos dos produtos naturais ou derivados desses (CRAGG e NEWMAN, 2009). A maioria deles são substâncias isoladas, incluindo muitos alcaloides como morfina, codeína (analgésicos); papaverina (inibidor de fosfodiesterase); efedrina, cafeína (estimulantes); ajmalina, quinidina (antiarrítmicos); quinina (antimalárico); reserpina (anti-hipertensivo); capsaicina (dores reumáticas); colchicina (tratamento de gota); yoimbina (afrodisíaco), entre outros (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010; WINK *et al.*, 2005).

Mas, apesar da imensa diversidade brasileira, existe enorme número de plantas brasileiras, que permanecem sem quaisquer estudos químicos ou biológicos e que apresentam um enorme potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (ALVES *et al.*, 2000; BOLZANI *et al.*, 1999).

Nesse contexto, nas últimas décadas, muitos estudos foram direcionados à medicina popular, com o objetivo de identificar produtos naturais com propriedades terapêuticas (ANTER *et al.*, 2011; BAE *et al.*, 2002; BATISTA *et al.*, 2004; KAIVALYA *et al.*, 2011; RUSAK *et al.*, 2010; SU *et al.*, 2011; WEN-BO *et al.*, 2011). O que prova que o interesse na pesquisa de novas substâncias ativas, de origem vegetal, tem aumentado significativamente nos últimos anos e com isso, várias empresas privadas e organizações governamentais têm instituído projetos de pesquisa nesta área (CALIXTO, 2000).

Mas, apesar dos produtos de origem vegetal poderem atuar de forma similar a medicamentos alopáticos, eles possuem também efeitos colaterais, sendo necessário reunir conhecimentos popular e científico para garantir a segurança e eficácia desses produtos (WARGOVICH, 2001). Nas últimas décadas, parte da população dos países em desenvolvimento faz uso rotineiro de plantas medicinais, desconhecendo os riscos envolvidos.

Baseado nisso, e no intuito de aumentar o conhecimento acerca do potencial biológico dos produtos derivados da Família Eriocaulaceae, e de tentar dar maior segurança para uma

possível utilização terapêutica desses produtos, é que este trabalho foi idealizado e posto em prática.

1.2. Família Eriocaulaceae

Nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, a família Eriocaulaceae de plantas se destaca tanto pela presença significativa de seus representantes quanto pelo fato de apresentar, nesse ambiente, níveis muito altos de endemismo de suas espécies. Os representantes de Eriocaulaceae podem ser facilmente reconhecidos pela presença de inflorescências em forma de capítulos (COSTA *et al.*, 2008).

Essa família compreende aproximadamente 1200 espécies e 11 gêneros. Destes, apenas *Eriocaulon* apresenta distribuição pantropical; *Syngonanthus* e *Paepalanthus* possuem representantes na África e nas Américas e o gênero *Mesanthemum* ocorre apenas na África. *Lachnocaulon*, *Leiothrix*, *Tonina*, *Rondonanthus*, *Philodice*, *Actinocephalus* e *Blastocaulon* são gêneros restritos ao continente americano, mas com diferentes áreas de ocorrência (GIULIETTI e HENSOLD, 1990).

No Brasil, a família Eriocaulaceae situa-se nas montanhas da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais e na Bahia (Figura 1). E, tanto na porção mineira do Espinhaço, como na Chapada Diamantina, na Bahia, há diversas espécies, pertencentes principalmente ao gênero *Syngonanthus*, que apresentam importância econômica para as populações locais, onde são conhecidas e comercializadas como “sempre-vivas”. Sempre-vivas é o nome popular dado a escapos e inflorescências de plantas que mantêm a aparência de estruturas vivas, mesmo depois de destacadas e secas, sendo empregadas na decoração de interiores (COSTA *et al.*, 2008; GIULIETTI *et al.*, 1988). Um centro secundário encontra-se localizado nas montanhas da Venezuela e nas Guianas.

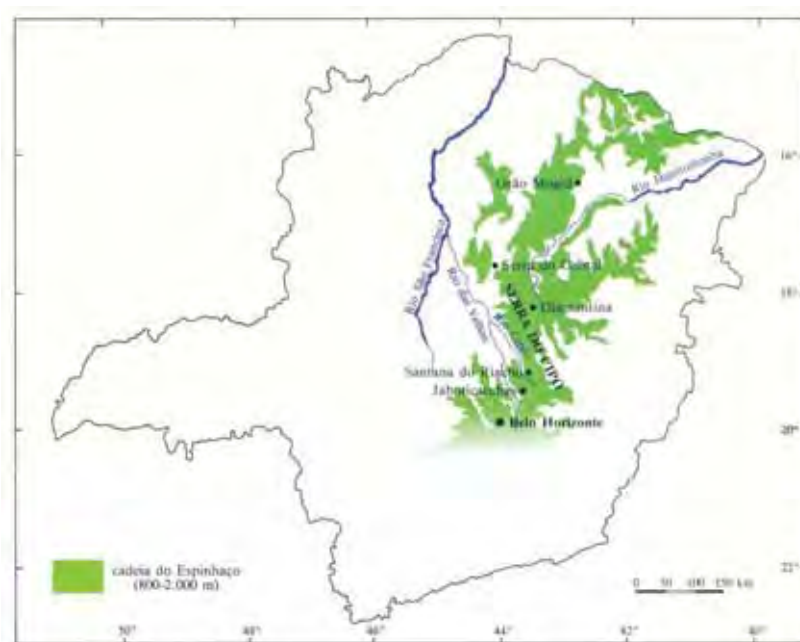


Figura 1. Mapa do Estado de Minas Gerais no qual se destaca a ocorrência da Cadeia do Espinhaço compreendida entre Belo Horizonte e o Estado da Bahia (MENEZES e GIULIETTI, 1986).

Dentre as espécies de Eriocaulaceae que ocorrem no Espinhaço, estima-se que aproximadamente 85% sejam endêmicas, a maioria delas restrita a pequenas localidades, sendo inclusive denominadas como “microendêmicas” ou endêmicas restritas. Como característica biológica, a família, de modo geral, coloniza áreas de grande altitude e, portanto, de acesso difícil. A pouca acessibilidade das áreas de ocorrência é outro fator que também está ligado ao número e à ocorrência de registros de espécies de Eriocaulaceae (COSTA *et al.*, 2008).

A coleta e a comercialização (Figura 2) de sempre-vivas pela população que vive na Cadeia do Espinhaço são responsáveis pelo sustento de inúmeras famílias da região, que, no entanto, praticam uma atividade extremamente predatória, utilizando fogo e desconhecendo completamente os riscos de extinção das mesmas. Após coletadas, as plantas são vendidas

para exportadores em Diamantina a preços baixíssimos, que por sua vez as exportam principalmente para o Japão, a preços cotados em dólar (IBAMA, 2004).



Figura 2. Coleta e confecção artesanal de objetos usando as “sempre-vivas” como matéria-prima (ISPN, 2013; O JORNAL, 2013).

Além do valor ornamental, não é conhecido qualquer outro tipo de exploração comercial relacionado à família Eriocaulaceae (FIGUEIREDO, 2007; SANO, 1999). Já em relação às atividades farmacológicas relacionadas a essa família, são conhecidas algumas atividades como a antimicrobiana (DA SILVA *et al.*, 2009; FANG *et al.*, 2008), a antioxidante (CÁLGARO-HELENA *et al.*, 2006), a citotóxica (DEVIIENNE *et al.*, 2007; KITAGAWA *et al.*, 2004), a antiinflamatória (DI STASI *et al.*, 2004), a antiulcerativa (BATISTA *et al.*, 2004); a mutagênica (DA SILVA *et al.*, 2007).

1.2.1. Gênero *Syngonanthus*

O gênero *Syngonanthus* é um grande representante da família Eriocaulaceae, possuindo aproximadamente 200 espécies distribuídas em cinco seções: *S. sect. Syngonanthus*, *S. sect. Carphocephalus*, *S. sect. Eulepis*, *S. sect. Thysanocephalus*, *S. sect.*

Chalarocaulon (LAZZARI, 2000). Na Serra do Cipó são encontradas 20 espécies de *Syngonanthus* (PARRA, 1998) e se estima que mais de 70 ocorram na Cadeia do Espinhaço.

Syngonanthus macrolepis, uma das espécies pertencentes a esse grande gênero, é caracterizada pelo tamanho relativamente grande da planta e das flores, presença de algumas folhas no caule aéreo, além das grandes brácteas involucrais, que estão situadas na base da flor ou inflorescência e que as rodeia. Essas brácteas ultrapassam as flores, daí a origem do nome da espécie (*macro*: grande, *lepis*: brácteas). Outras três espécies de *Syngonanthus* são *Syngonanthus dealbatus*, *Syngonanthus suberosus* e *Syngonanthus nitens*. Dessas espécies também não se tem muitas informações a respeito do seu potencial biológico. *S. dealbatus* Silv. é também conhecida popularmente como “roxinha” e *S. suberosus* Giul. possui o nome vulgar de “margarida”.

A espécie *S. nitens* é conhecida como “capim dourado”, pela bela cor dourada que seus escapos assumem quando secos e é muito utilizada para a prática do artesanato. É uma planta muito comum no Cerrado Brasileiro, em particular na região do Jalapão no Estado do Tocantins. O capim dourado cresce naturalmente em campos encharcados na estação chuvosa e durante os períodos de seca (PACIFICO *et al.*, 2011). Os escapos de *S. nitens* são também explorados em outras regiões do Cerrado para composição de arranjos, especialmente em Minas Gerais, onde recebem o nome comum de “sedinha” (GIULIETTI *et al.*, 1996) (Figura 3).

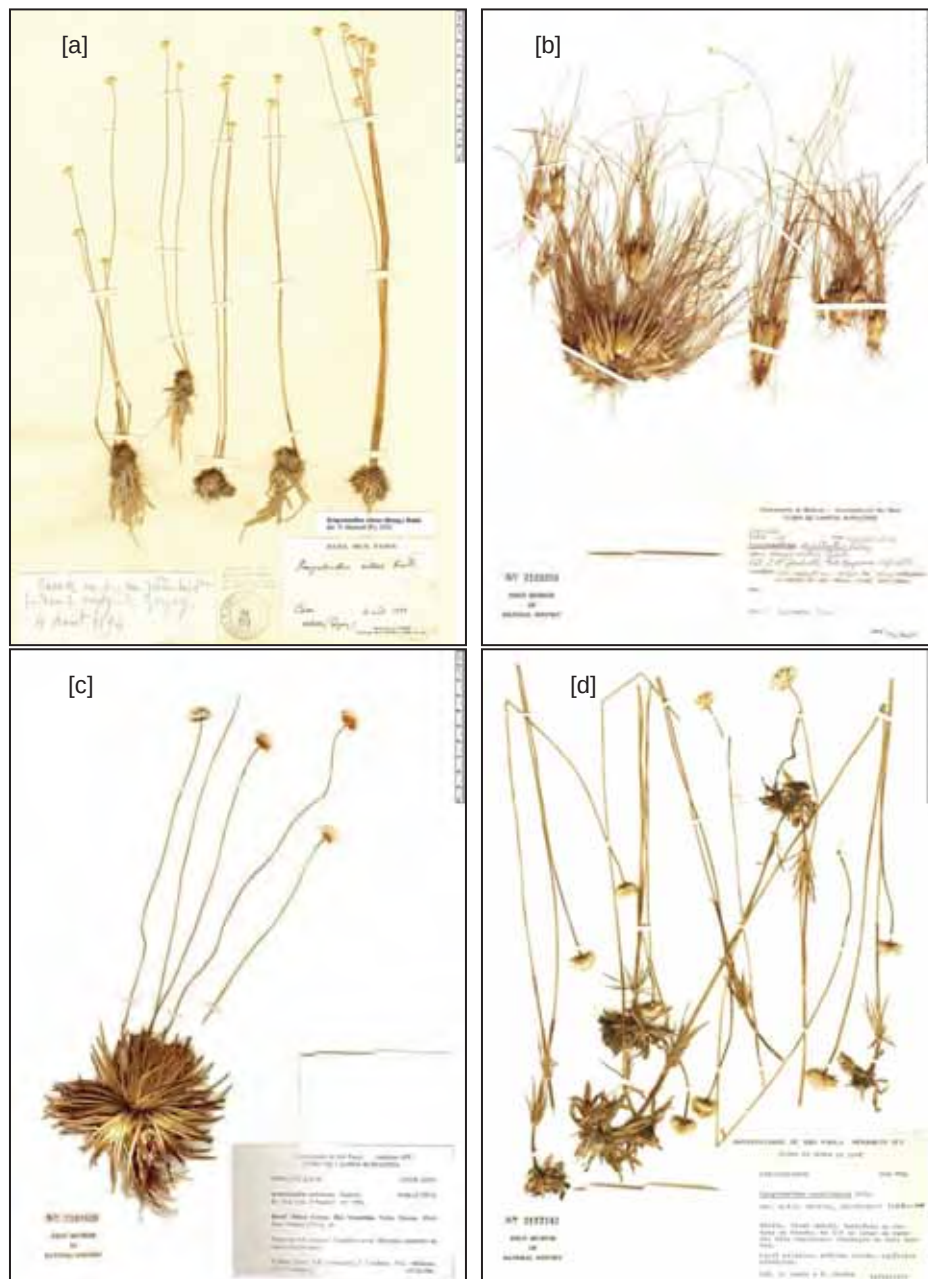


Figura 3. Exsicatas de [a] *S. nitens*; [b] *S. dealbatus*; [c] *S. suberosus* e [d] *S. macrolepsis*. (FIELD MUSEUM, 2013).

1.3. Atividades Biológicas

1.3.1. Mutagênese e Antimutagênese

Embora plantas medicinais venham sendo utilizadas no tratamento de doenças de acordo com o conhecimento acumulado ao longo dos tempos, a pesquisa científica tem mostrado que algumas substâncias presentes nessas plantas podem apresentar propriedades indesejáveis, como mutagenicidade, carcinogenicidade e toxicidade, as quais podem restringir seu uso como agentes terapêuticos (CANDIDO-BACANI *et al.*, 2013; MULAUDZI *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2012; SHIN *et al.*, 2012; WEINOEHL *et al.*, 2012).

Os testes de mutagenicidade fornecem uma avaliação do risco humano através da investigação do potencial que algumas substâncias têm de causar danos no material genético (MARON e AMES, 1983; MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Mutagenicidade é definida como uma alteração permanente no conteúdo ou na estrutura do material genético de um organismo. Pode ser manifestada como uma alteração herdável em decorrência de mutação em células germinativas e/ou mutações somáticas levando ao desenvolvimento de câncer ou outros processos crônicos degenerativos (DEARFIELD, 2002).

Os compostos mutagênicos podem induzir alterações genômicas visando diretamente e/ ou indiretamente o DNA, através da ligação às proteínas envolvidas na manutenção da integridade do genoma (MATEUCA *et al.*, 2006). Estima-se que a média da frequência de mutações espontâneas por pares de bases em células humanas seja de 10^{-8} a 10^{-10} , sendo que essa frequência pode aumentar de 1 a 10 vezes quando há exposição a um agente mutagênico (AJITH e SOJA, 2006).

As consequências das interações mutágeno-alvo podem levar a diferentes tipos de danos ao DNA (aductos de DNA, sítios alcali-lábeis, quebras de fitas) e as mutações vão de alterações de um único nucleotídeo (mutação gênica ou puntiforme) a aberrações

cromossômicas que atingem cromossomos inteiros ou pedaços de cromossomos (MATEUCA *et al.*, 2006).

Basicamente, as mutações gênicas podem ser subdivididas em substituição de pares de bases e alteração na matriz de leitura, ocorrendo por adição ou deleção de nucleotídeos. Já as mutações cromossômicas podem ser divididas em numéricas, que por sua vez são subdivididas em euploidias (envolvem genomas inteiros) e aneuploidias (envolvem parte do genoma), e mutações cromossômicas estruturais, sendo elas: deleção, duplicação, translocação e inversão (GRIFFITHS *et al.*, 2006).

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

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

Muitas substâncias provocam, além de suas propriedades antimutagênica e anticarcinogênica, outros efeitos benéficos, como a ativação do sistema imune e / ou proteção contra doenças cardiovasculares (KNASMÜLLER *et al.*, 2011).

O termo antimutagênico foi usado originalmente para descrever os compostos que reduzem a frequência ou a taxa de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente dos mecanismos de proteção envolvidos (NOVICK e SZILARD, 1952). Os agentes antimutagênicos podem ser colocados em duas categorias gerais: aqueles que inibem a formação de lesões e são classificados como desmutagênicos, e aqueles que colaboram no reparo das lesões que já estão presentes no DNA, denominados bioantimutagênicos (LIVIERO e VON BORSTEL, 1996).

Os agentes desmutagênicos são compostos capazes de inativar química, física ou enzimaticamente um agente mutagênico. As inativações química e física ocorrem por ligação direta com o agente mutagênico, impedindo sua ativação por sequestro ou adsorção de agentes mutagênicos e radicais livres, impossibilitando que os mesmos estabeleçam contato com o material genético. A inativação enzimática de um mutágeno pode ocorrer por dois mecanismos: a inativação por enzimas de fase I da biotransformação, como as enzimas da família P450, ou a indução de enzimas de fase II, como a glutathione S-transferase. Já os compostos bioantimutagênicos podem atuar como moduladores do reparo e replicação do DNA, agindo em nível celular ao aumentar a fidelidade na replicação do material genético, estimular o reparo livre de erros de danos no material genético ou inibir os sistemas de reparo sujeitos a erro (KADA *et al.*, 1982; KURODA *et al.*, 1992).

Como pouco se sabe ainda sobre as substâncias que compõem a maioria das plantas e as consequências de seu uso, testes que avaliam o potencial mutagênico de materiais vegetais são de grande importância, sendo que seu uso tem um grande impacto na saúde de um grande número de pessoas (SOHNI *et al.*, 1994).

1.3.2. Genotoxicidade e Antigenotoxicidade

O desenvolvimento do câncer é mediado por alterações na sequência e na organização do genoma celular que variam de substituição de um nucleotídeo a aberrações cromossômicas. O evento crucial é a alteração genômica que resulta em alteração funcional de algumas proteínas/enzimas como a kinase ATM (“*ataxia-telangiectasia mutated*”) e outras kinases relacionadas (SHILOH, 2003).

O processo pode se iniciar quando substâncias endógenas e exógenas reativas, ou tornadas reativas após biotransformação, se ligam a biomoléculas, como o DNA, formando aductos ou induzindo sua fragmentação ou oxidação. Essas lesões induzem várias respostas celulares, incluindo ativação do reparo do DNA, alteração do ciclo celular e apoptose (KASTAN e BARTEK, 2004).

Células com danos no DNA frequentemente não sobrevivem, mas mecanismos de reparo podem ser ativados, reduzindo desse modo a probabilidade de progredirem para a malignidade. No entanto, mutações em vias de apoptose ou necrose podem permitir a sua sobrevivência, ou seja, continuar um crescimento celular com anormalidades genômicas, contribuindo para a instalação do câncer (KASTAN e BARTEK, 2004).

O diagnóstico precoce de lesões em DNA pode servir para prevenir exposição continuada a altas doses de carcinógenos e mutágenos, impedindo a progressão do processo de carcinogênese. Em estudos epidemiológicos moleculares humanos é importante ter métodos disponíveis para avaliar a formação de aductos de DNA em níveis extremamente baixos, levando em consideração a intensidade da exposição (dose) e o efeito biológico da substância (danos causados) (KASTAN e BARTEK, 2004).

Os estudos e investigações de genotoxicidade podem abranger dois aspectos. O primeiro analisa os efeitos do produto sobre o material genético, que podem resultar em alterações na estrutura do DNA como as quebras em fita simples ou dupla e a formação de

aductos (ligação covalente de um elemento ou composto químico com as bases nitrogenadas do DNA) entre outros. Estas alterações ocorridas na molécula de DNA, quando não reparadas podem levar a mutações. Sabe-se que a capacidade de reparo do DNA diminui com o passar do tempo e que a taxa de mutação de cada divisão celular aumenta com a idade do indivíduo. Foi constatado que os sobreviventes de Hiroshima e Nagasaki tiveram um aumento anual nas mutações no gene da Gliforina A (GRISOLIA, 2005).

O segundo aspecto analisa os efeitos destas alterações nos produtos gênicos (RNAs, polipeptídios e proteínas) os quais podem se refletir nas populações alterando sua fertilidade e sua capacidade de responder às mudanças ambientais entre outras (GRISOLIA, 2005).

Os agentes antineoplásicos são exemplos de compostos exógenos que promovem lesões no DNA como alquilação de bases, ligações cruzadas e danos oxidativos (CICCIA e ELLEDGE, 2010).

Mas, ao contrário de algumas substâncias com alto potencial de lesionar o DNA, existem substâncias com capacidade de protegê-lo contra danos causados por agentes genotóxicos. E este estudo abordou as avaliações tanto da capacidade de substâncias causarem lesões no material genético, quanto a sua capacidade de prevenir tais danos.

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que compostos naturais presentes na dieta podem modular o processo de carcinogênese por meio da indução do sistema de defesa celular incluindo enzimas antioxidantes e do sistema de detoxificação (PANA e HO, 2008). De acordo com Wattenberg *et al.* (1985), a atuação dos agentes quimioprotetores pode ser dividida em duas categorias: os agentes bloqueadores e os agentes supressores.

Os agentes bloqueadores reduzem a formação e a ativação metabólica de carcinógenos que interagem com biomoléculas cruciais (DNA, RNA, proteínas, lipídios), combatem espécies reativas de oxigênio e potencializam o sistema de reparo do DNA. Dessa maneira, tornam-se mais eficazes quando utilizados de maneira preventiva à exposição dos

carcinógenos. Por outro lado, os agentes supressores inibem eventos posteriores à ação do cancerígeno, suprimindo a manifestação da neoplasia. Estes agentes podem inativar oncogenes, ativar genes supressores tumorais, inibir a angiogênese e induzir apoptose por meio de mecanismos que interferem na expressão gênica e reduzem a proliferação de células iniciadas, prevenindo o acúmulo de danos (ARORA *et al.*, 2010).

A ação dos agentes quimiopreventivos ou quimioprotetores, incluindo os de origem natural, tem sido extensivamente estudada nas duas últimas décadas, com especial ênfase para a identificação de compostos com baixa ou nenhuma toxicidade e de fácil acesso para a população humana. Muitos compostos apresentam atividades quimioprotetoras cientificamente comprovadas. Dentre eles destacam-se a curcumina, o resveratrol, o licopeno, o ácido elágico, o eugenol, o indol-3-carbinol, o epigallocatequina-3-galato e o ácido fenil éster caféico (AGGARWAL e SHISHODIA, 2006; SURH, 2003).

Para se conhecer o potencial genotóxico e antígenotóxico de um determinado composto, existem testes de genotoxicidade bem definidos e internacionalmente reconhecidos pelas agências reguladoras como parte da bateria de testes recomendada para o registro de novos produtos que entram no mercado mundial (HAYASHI *et al.*, 2000).

1.3.3. Estrogenicidade

Nos seres humanos, acredita-se que alguns compostos, mesmo em concentrações extramentes baixas, possam estar envolvidos na diminuição da espermatogênese. Em alguns países estes dados coincidem com o aumento de câncer de testículos, além do aumento da incidência de malformações congênitas do trato genital masculino, tais como hipospádia e criptorquidia (DHOOGHE *et al.*, 2006), disfunção da tireoide e alterações relacionadas com o sistema neurológico (GHISELLI e JARDIM, 2007; SOTO e SONNENSCHNEIN, 2010).

Entretanto, há diferenças importantes entre compostos estrogênicos de origem industrial e os que vêm das plantas (HAN *et al.*, 2002).

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

Os fitoestrógenos são metabólitos secundários polifenólicos não-esteroidais de plantas (WARD e KUHNLE, 2010), que exercem atividades estrogênicas ou antiestrogênicas (WANDA *et al.*, 2006), através de mecanismos que dependem e/ ou independem dos receptores de estrógeno (REs) (PIERSEN, 2003). São capazes de mimetizar o hormônio humano 17- β -estradiol (SETCHELL, 2001) e, por isso, vêm sendo fortemente sugeridos como uma alternativa natural à terapia de reposição hormonal (BECK *et al.*, 2005; BENASSAYAG *et al.*, 2002).

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

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

apenas homologia parcial nas caudas C e N-terminal (GUSTAFSSON, 1999; SHEN *et al.*, 2007).

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

Quando os RE α e/ou RE β ligam-se ao estradiol, os receptores formam dímeros. Esses dímeros, então, ligam-se a elementos de resposta a estrógenos no DNA e recrutam outros componentes da maquinaria de transcrição, que levam à expressão gênica (Figura 4) (OGAWA *et al.*, 2009).

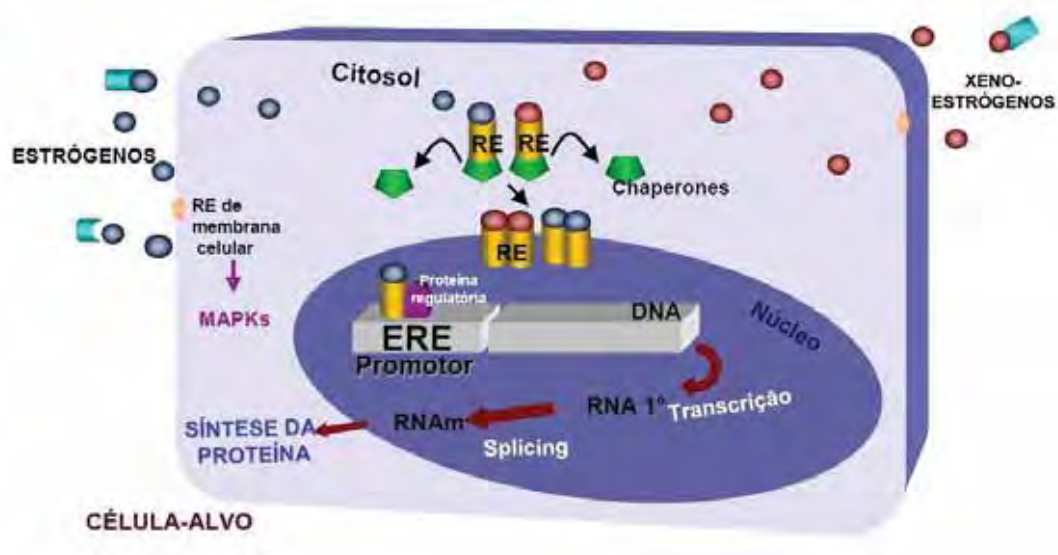


Figura 4. Mecanismos de transdução de sinal promovidos por estrógenos endógenos e xenoestrógenos (FRIEDRICH, 2003).

Nas últimas décadas, produtos naturais têm sido bastante utilizados por mulheres no tratamento dos sintomas da menopausa (GELLER e KRONENBERG, 2003), que incluem

calores súbitos, ansiedade, variações de humor, assim como aumento do risco de muitos problemas de saúde, tais como redução da densidade óssea, doenças cardiovasculares e tumores (HARLOW e SIGNORELLO, 2000). Dentre os vários produtos com atividade estrogênica destacam-se os fitoestrógenos (ALVES *et al.*, 2007).

Vários dos mais potentes fitoestrógenos conhecidos pertencem ao grupo dos isoflavonoides (Figura 5), constituintes fitoquímicos encontrados predominantemente nos grãos de soja. Eles pertencem à classe dos flavonoides, cujos compostos dividem com os estrógenos esteroidais a capacidade de ligar-se aos REs e mediar a transcrição de genes responsivos a estrógenos (BREINHOLT e LARSEN, 1998), e, por isso, vêm sendo fortemente sugeridos como uma alternativa natural à terapia de reposição hormonal (BECK *et al.*, 2005; BENASSAYAG *et al.*, 2002).

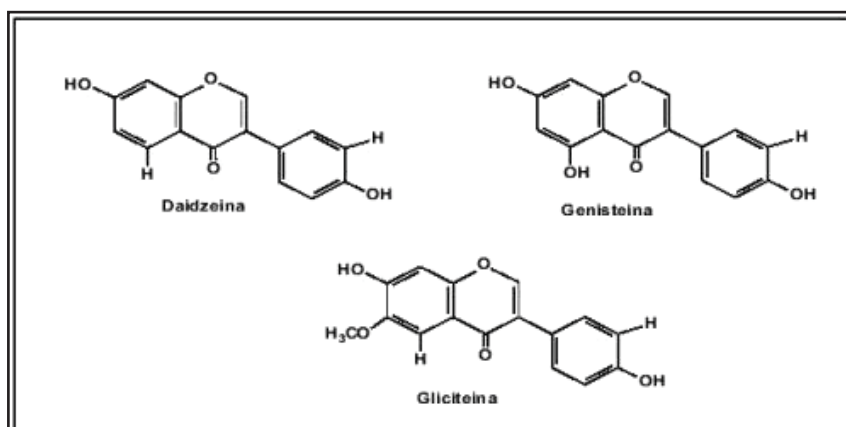


Figura 5. Estrutura química dos isoflavonoides de *Glycine max* (L.) Merrill (LEHMANN *et al.*, 2005).

Dados de Miksicek (1993, 1994) indicam que outros membros da família flavonoide, além dos isoflavonoides, exibem propriedades estrogênicas, e são designados flavo-estrógenos. E ainda, com o aumento dos relatos na literatura de que alguns fitoestrógenos demonstraram ter potencial terapêutico e preventivo na ginecologia e que eles poderiam ser

utilizados para substituir os estrógenos na terapia de reposição hormonal, já que essa tem sido relatada como sendo não tão segura ou efetiva quanto se imaginava (HAYS *et al.*, 2003), é que se despertou o interesse em avaliar o potencial estrogênico das espécies de *Syngonanthus*, que são ricas em flavonas e xantonas.

1.3.4. Modulação da expressão gênica

O estudo da expressão gênica em células tumorais e as consequentes alterações proteicas compõem a linha de pesquisa mais atual e promissora do câncer. Esse conhecimento pode levar não somente à obtenção de marcadores tumorais para diagnóstico, mas também a uma melhor avaliação dos resultados obtidos em tratamento, facilitando desse modo a compreensão da evolução da neoplasia maligna (LIMA *et al.*, 2013).

A heterogeneidade celular e molecular dos tumores de mama e o grande número de genes potencialmente envolvidos no controle do crescimento, na morte e na diferenciação celular, enfatizam a importância de se estudar as múltiplas alterações genéticas que podem ocorrer nas células tumorais. A análise de expressão gênica tem demonstrado a capacidade de identificar as características que refletem a biologia molecular e o comportamento do tumor, podendo revelar novos marcadores genéticos, os que estão relacionados à recorrência e progressão da doença e com isso contribuir para a terapêutica antitumoral (ROSA, 2007).

Atualmente, podem ser testadas centenas a milhares de sequências representativas de genes em um único experimento. A análise de expressão gênica em larga escala, denominada de *array*, permite a avaliação da expressão de um grupo pré-determinado de genes. Esta análise fornece assinaturas genéticas definidas, uma coleção de genes que classificam os tumores em grupos distintos, sendo consideradas como mais efetivas do que os marcadores prognósticos utilizados atualmente na rotina clínica, pois essas assinaturas permitem englobar as interações gênicas (ROSA, 2007).

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, as interações entre os hormônios esteroides e outros fatores reguladores da proliferação, diferenciação, e apoptose podem ser mais bem esclarecidas (DA SILVA, 1998). Nos processos hiperplásicos e neoplásicos, o mecanismo normal do controle de crescimento está alterado. Entre os eventos moleculares associados a essas alterações podem-se destacar modificações na expressão de mediadores da proliferação celular, e na ativação de proto-oncogenes.

O aumento na expressão do ER α além de representar a alteração transcricional mais comum nas neoplasias mamárias (BENZ, 1998), também está associado ao processo de tumorigênese mamária. Avaliando a expressão do ER α em lesões mamárias benignas, pré-malignas e malignas tem-se identificado uma crescente expressão do receptor, geralmente correspondente à maior atividade proliferativa da lesão (SHOKER *et al.*, 1999a, 1999b; HANSEN e BISSELL, 2000).

Ainda, os proto-oncogenes são conhecidos pela sua associação com os processos proliferativos. Sua regulação é feita por hormônios esteroides, fatores de crescimento e proteínas relacionadas à adesão celular. Quando alterados por translocações cromossômicas, deleções ou mutações, ou mesmo superexpressos, originam os oncogenes, genes com potencial de transformar células normais em neoplásicas, através da codificação de oncoproteínas. Dentre os proto-oncogenes, *C-MYC* e *BCL-2* podem ser citados como importantes mediadores das ações dos esteroides sexuais e de seus receptores na proliferação celular e apoptose mamária (DICKSON e STANCEL, 1999).

Esses proto-oncogenes, assim como outros genes de grande importância na promoção e progressão do câncer de mama, tiveram a sua expressão analisada, após tratamento com uma mistura de duas xantonas isolada de *S. nitens*, neste estudo e seus dados comparados com os obtidos das células sem tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os potenciais mutagênico e antimutagênico, genotóxico e antigenotóxico, citotóxico e estrogênico dos extratos e substâncias isoladas de *Syngonanthus* sp, além de avaliar o efeito modulatório na expressão gênica de xantonas isoladas de *Syngonanthus nitens*.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar os potenciais mutagênico e antimutagênico dos extratos metanólicos dos capítulos de *Syngonanthus dealbatus* (Sd), *Syngonanthus macrolepis* (Sm), *Syngonanthus nitens* (Sn) e *Syngonanthus suberosus* (Ss), bem como de suas oito substâncias isoladas (1= luteolina, 2= 1,5,7-trihidroxi-3,6-dimetoxixantona, 3= 1,3,6,8-tetrahidroxi-2,5-dimetoxixantona, 4= 1,3,6,8-tetrahidroxi-5-metoxixantona, 5= 7-metoxiluteolina-8-C- β -glicopiranosídeo, 6= 7-metoxiluteolina-6-C- β -glicopiranosídeo, 7= 7,3'-dimetoxiluteolina-6-C- β -glicopiranosídeo, 8= 6-hidroxiluteolina e de uma mistura de duas xantonas [A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona (M)], utilizando o Teste de Ames;
- ✓ Avaliar os potenciais genotóxico e antigenotóxico dos extratos e substâncias isoladas de *Syngonanthus* sp, utilizando o Ensaio do Cometa Alcalino;
- ✓ Avaliar o potencial citotóxico, em células HepG2 e em células MCF-7/BUS, dos extratos e substâncias isoladas de *Syngonanthus* sp;
- ✓ Avaliar o potencial estrogênico dos extratos e substâncias isoladas de *Syngonanthus* sp, utilizando os ensaios RYA (*Recombinant Yeast Assay*) e *E-screen*;

- ✓ Avaliar a atividade modulatória da expressão gênica, em células de carcinoma mamário (MCF-7/BUS), da mistura de xantonas M, utilizando a metodologia de *PCR Array*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

Syngonanthus nitens (Bong. Ruhland), conhecido popularmente como “capim dourado” (exsicata n° SPF 189975), foi coletado em Dezembro de 2008, na cidade do Jalapão, no Estado do Tocantins; *Syngonanthus dealbatus* Silv., conhecido como “roxinha” (exsicata n° CFCR 8161) e *Syngonanthus suberosus* Giul., conhecido como “margarida” (exsicata n° CFCR 4463), foram coletados em Maio de 1999 e *Syngonanthus macrolepis* (exsicata n° SANO 2978), em Fevereiro de 2002, todos em Diamantina, no Estado de Minas Gerais. As espécies foram autenticadas pelo Profº Drº Paulo Takeo Sano da Universidade de São Paulo (USP). As exsicatas foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade do Estado de São Paulo.

3.1.1. Extração

Os extratos das espécies Sd, Sm, Sn e Ss, as substâncias isoladas (1 a 8) e a mistura de xantonas M foram obtidos no Instituto de Química da UNESP, campus Araraquara-SP, sob a coordenação do Profº Drº Wagner Vilegas e da Profª. Drª. Lourdes Campaner dos Santos. Os capítulos e os escapos de Sd (300 g), Sm (500 g), Sn (410 g) e Ss (300 g) foram secos em forno a 60°C por 4 dias e então foram pulverizados. O material resultante foi macerado sequencialmente, a temperatura ambiente, com 20 mL de hexano, diclorometano e metanol, por uma semana com cada solvente, resultando nos extratos hexânico (Ex-Hex),

diclorometano (Ex-DCM) e metanólico (Ex-MeOH). Os extratos foram filtrados e o solvente foi evaporado sob baixa pressão. Os extratos metanólicos foram selecionados para este estudo devido ao seu melhor rendimento (Tabela 1).

Tabela 1. Massas, em gramas, e rendimento dos extratos obtidos dos capítulos das espécies de *Syngonanthus* (Eriocaulaceae).

Espécies	Ex-Hex (g)/ %	Ex-DCM (g)/ %	Ex-MeOH (g)/ %
<i>S. nitens</i>	2,8/ 0,7	2,2/ 0,5	11,8/ 2,8
<i>S. suberosus</i>	3,2/ 1,1	3,2/ 1,1	5,4/ 1,8
<i>S. dealbatus</i>	3,6/ 1,2	3,8/ 1,3	4,9/ 1,6
<i>S. macrolepsis</i>	3,0/ 0,6	3,0/ 0,6	4,5/ 0,9

Ex-Hex= extrato hexânico; Ex-DCM= extrato diclorometânico; Ex-MeOH= extrato metanólico.

3.1.2. Obtenção de frações e substâncias isoladas

Os dados de fracionamento, identificação, isolamento e purificação descritos abaixo foram obtidos com os extratos de capítulos e escapos de *Syngonanthus nitens*. As demais espécies foram submetidas aos mesmos passos.

3.1.2.1. Fracionamento por filtração em gel

O extrato de capítulos (3,5 g) e extrato de escapos (3,0 g) de Sn foram separadamente dissolvidos em metanol (20 mL) e cada mistura foi centrifugada por 5 minutos a 3200 rpm. Este passo foi repetido 3 vezes para o extrato de capítulos e 2 vezes para o extrato de escapos. Após a coleta dos sobrenadantes, cada solução foi filtrada utilizando um Iso-Disk P-34, uma membrana PTFE de 3 mm de diâmetro, com tamanhos de poros de 0,45 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA), e foi seca a vácuo, apresentando rendimentos de 3,0 g para o filtrado de capítulos e 2,6 g para o de escapos. Os filtrados de capítulos e de escapos foram

fracionados separadamente em uma coluna Sephadex LH-20 (57 cm x 3 cm), utilizando o metanol como fase móvel, o que nos rendeu 260 frações, de 8 mL, respectivamente.

3.1.2.2. Análise por HSCCC

As frações 69-88 dos escapos (400 mg), obtidas pela coluna Sephadex, foram fracionadas por HSCCC, em mistura de etilacetato-n-butanol-água (3,5:1,5:5,0, v/v/v), em um fluxo de 1 mL/min. A fase menos aquosa foi utilizada como fase estacionária. A retenção da fase estacionária para esse sistema de solventes foi de 87,7 % a 850 rpm. Foram obtidas 84 frações, de 3 mL cada.

3.1.2.3. Análise por HPLC-UV

As frações 16-19, obtidas por HSCCC, foram analisados por HPLC-UV, em uma coluna de fase reversa C18 (Bondapak C18, 300 mm x 7,6 mm i.d., 10 µm), utilizando A) H₂O + TFA (0,1%) e B) CH₃CN + TFA (0,1%) como fases móveis, em um fluxo de 2 mL/min, e foram detectadas a 280 nm. A eluição foi realizada de acordo com as seguintes condições: após eluição de 3 minutos de 5% de B, a eluição foi programada como segue: de 5% de B para 42% de B em 12 minutos; estaciona em 44% de B por 2 minutos e vai para 44% de B por 10 minutos; estaciona em 50% de B em 6 minutos. A separação cromatográfica rendeu dois compostos, os quais, com base em experimentos de ESI-MSⁿ e RMN, foram identificados como sendo os compostos 5 (3,8 mg, t_R= 16,1 min) e 6 (2,8 mg, t_R= 15,9 min).

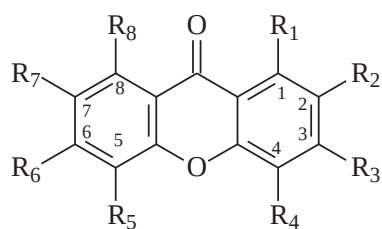
3.1.2.4. Análise por HPLC-IR

As frações dos escapos 131-253 (240 mg), obtidas pela coluna Sephadex, foram analisadas isocraticamente por HPLC-IR, em uma coluna Bondapak C18 (250 mm x 10 mm i.d., 10 µm), utilizando H₂O:MeOH (58:42) como eluentes, em um fluxo de 2 mL/min. A

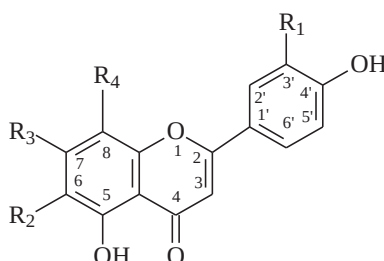
separação cromatográfica rendeu 3 compostos, que, com base em experimentos de ESI-MSⁿ e RMN, foram identificados como sendo os compostos 7 (4,2 mg, tR= 16,2 min), 1 (11,1 mg, tR= 19,3 min) e 8 (11,2 mg, tR= 23,6 min).

3.1.2.5. Análise por HPLC-DAD

As frações dos capítulos 129-134 (129 mg), obtidas pela coluna Sephadex, foram analisadas por HPLC-DAD, em uma coluna de fase reversa C18 (Bondapak C18, 300 mm × 7,6 mm i.d., 10 µm), utilizando H₂O + TFA (0,05%) e MeOH + TFA (0,1%) como fases móveis, em um fluxo de 2,5 mL/min. A eluição foi realizada de acordo com as seguintes condições: de 30% para 70% de B em 20 minutos; para 90% de B em 20 minutos e para 100% de B em 5 minutos. A separação cromatográfica rendeu dois compostos identificados, com base em experimentos de ESI-MSⁿ e RMN, como sendo os compostos A (11,2 mg, tR= 18,0 min), B (6,8 mg, tR= 18,5 min), 2 (5,0 mg, tR=19 min), 3 (10,2 mg, tR= 21,5 min) e 4 (5,3 mg, tR= 22 min). Os perfis cromatográficos das substâncias isoladas, utilizadas neste estudo, foram publicados por Pacífico *et al.* (2011). As estruturas das substâncias isoladas 1 a 8 e das xantonas A e B foram dispostos na Figura 6.



Xantonas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
<u>A</u>	OH	OCH ₃	OH	H	H	OH	H	H
<u>B</u>	OH	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OH	H	H
<u>2</u>	OH	H	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	OH	H
<u>3</u>	OH	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OH	H	OH
<u>4</u>	OH	OCH ₃	OH	H	H	OH	H	OH



Flavonas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<u>1</u>	OH	H	OH	H
<u>5</u>	OH	H	OCH ₃	C-gli
<u>6</u>	OH	C-gli	OCH ₃	H
<u>7</u>	OCH ₃	C-gli	OCH ₃	H
<u>8</u>	OH	OH	OH	H

Figura 6. Estruturas das Xantonas e Flavonas, respectivamente, identificadas em *Syngonanthus nitens*.

Nos extratos de capítulos e escapos de Sd, Sm e Ss foram encontrados somente flavonas. As xantonas 2 (1,5,7-trihidroxi-3,6-dimetoxixantona), 3 (1,3,6,8-tetrahidroxi-2,5-dimetoxixantona) e 4 (1,3,6,8-tetrahidroxi-5-metoxixantona) e A (1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona) e B (1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), da mistura M, foram apenas identificadas e isoladas do extrato metanólico dos capítulos de Sn. A flavona 1 (luteolina) foi identificada em todas as espécies. Além dela, foram identificadas as flavonas 5 (7-

metoxiluteolina-8-C- β -glicopiranosídeo) e 6 (7-metoxiluteolina-6-C- β -glicopiranosídeo) nos escapes de Sd e Ss (DA SILVA, 2008).

3.2. Ensaios Biológicos

3.2.1. Mutagenicidade e Antimutagenicidade

3.2.1.1. Teste de Ames

Para avaliar o potencial de alguns tipos de substâncias em causar mutações no DNA, destacamos o teste de Ames. É um teste amplamente aceito pela comunidade científica e pelas agências e corporações governamentais. Ele é utilizado na avaliação da mutagenicidade de vários compostos, dentre eles os extratos de plantas medicinais comumente utilizadas, compostos químicos provenientes de metabolismo de drogas vegetais (SANTOS *et al.*, 2012) e sintéticas (OZKAN *et al.*, 2013), os derivados de alimentos (AOUATIF *et al.*, 2013) e de amostras ambientais (PARRELLA *et al.*, 2013).

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

As linhagens bacterianas não apresentam enzimas de metabolização, o que impossibilita sua capacidade para identificação de agentes mutagênicos de ação indireta. Para

superar essa dificuldade, adiciona-se às culturas durante os ensaios a chamada fração S9, que contém enzimas de metabolização de xenobióticos e é obtida a partir do fígado de ratos (MARON e AMES, 1983). Todas essas características conferem ao teste de Ames uma grande capacidade de identificação e caracterização de diferentes agentes mutagênicos, com grande eficiência e sensibilidade (SANTOS *et al.*, 2006).

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

3.2.1.1.1. Linhagens utilizadas

As linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *Salmonella typhimurium*, empregadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames, da Universidade Berkeley, Califórnia, USA.

A cepa TA98 apresenta mutação no gene *his D* (*hisD3052*) que codifica para a histidinol desidrogenase, apresentando como ponto preferencial para a reversão oito resíduos repetitivos de GC, e detecta compostos mutagênicos que deslocam o quadro de leitura do DNA (*frameshift*). A mutação *hisG46* presente na cepa TA100 ocorre através da substituição do códon selvagem GGG (CCC) – prolina – por GAG (CTC) – leucina. Assim, essa cepa detecta agentes mutagênicos que ocasionam substituições, principalmente neste par G-C. A cepa TA102 contém a mutação ochre TAA no gene *hisG* e detecta eficientemente mutágenos como formaldeído, glioxal, vários hidroperóxidos, bleomicina, fenilidrazina, raios-X, luz UV, estreptonigrina e agentes *crosslink*, como mitomicina-C. A cepa TA97a também detecta mutágenos do tipo *frameshift* e apresenta mutação no gene *hisD6610* e são alvos para mutação os resíduos GC (MARON e AMES, 1983).

As substâncias isoladas 1 a 8, e a mistura M, somente foram avaliados para sua mutagenicidade e antimutagenicidade nas linhagens TA100 e TA98 porque a quantidade obtida deles foi muito pequena e uma preferência foi dada para as linhagens que em os melhores resultados para os extratos foram obtidos.

3.2.1.1.2. Manutenção e estoque das cepas de *Salmonella typhimurium*

As cepas de *S. typhimurium* ficaram estocadas em tubos para congelamento (1,5 mL), e mantidas à -70°C para que se mantivessem inalteradas todas as suas características genéticas. Para cada 0,9 mL de cultura, foram adicionados 0,1 mL de dimetilsufóxido (DMSO), que é uma substância crioprotetora.

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

As características genéticas das cepas de *S. typhimurium* foram checadas rotineiramente, antes do preparo dos estoques para congelamento. A dependência da histidina, presença de mutação *rfa*, presença de deleção *uvrB* e a presença de plasmídios de resistência também foram verificadas.

3.2.1.1.4. Taxa de reversão espontânea

A reversão espontânea das cepas-teste para independência à histidina foi medida rotineiramente sendo que a frequência de reversão é característica para cada cepa. As colônias revertentes prototróficas para a histidina, são facilmente visíveis em placas de ágar mínimo glicosado com traços de histidina e biotina, em contraste com as colônias auxotróficas, que formaram uma fina camada de crescimento bacteriano (“*background*”).

3.2.1.1.5. Preparo do inóculo de *S. typhimurium* utilizados no ensaio

Semeou-se com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade do crescimento da cultura em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2). Incubou-se a 37°C por 14 horas sob agitação (160 rpm) de modo a obter uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL. Após crescimento, manteve-se a cultura sob refrigeração durante o período que a mesma não estava sendo utilizada.

3.2.1.1.6. Controles

O controle negativo foi feito com DMSO, o solvente das amostras vegetais. Além disso, foram utilizados mutágenos diretos e indiretos conhecidos que atuaram como agentes indutores das mutações. Foram utilizados como controle positivo em ensaios sem ativação metabólica o 4-nitrofenilenodiamino (NPD) para as linhagens TA98 e TA97a, azida sódica para a linhagem TA100 e mitomicina C para a linhagem TA102 e para os ensaios com ativação metabólica foram usados o 2-antramino (TA98, TA100 e TA97a), o 2-aminofluoreno (TA102), o BaP (TA98) e a AFB₁ (TA100).

3.2.1.1.7. Realização dos ensaios de mutagenicidade

Foi utilizada a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983), e as linhagens TA100, TA98, TA97a e TA102 de *Salmonella typhimurium* foram utilizadas para os extratos e as linhagens TA100 e TA98, para as substâncias isoladas.

Anteriormente aos ensaios, as concentrações adequadas das amostras foram determinadas em experimentos de toxicidade preliminares, onde as máximas concentrações de cada amostra foram selecionadas de acordo com o seu limite de solubilidade e essas foram incubadas com cada uma das linhagens de *Salmonella*. As colônias revertentes foram

contadas, seu número comparado com o do controle negativo e, depois disso, as concentrações consideradas não tóxicas, ou seja, as que mantiveram o número de colônias revertentes acima do número de colônias do controle negativo, foram selecionadas e foram utilizadas na avaliação mutagênica.

Sd foi avaliado nas concentrações de 4,5 a 54,0 mg/placa; Sm, de 1,2 a 14,0 mg/placa; Sn, de 0,8 a 9,0 mg/placa e Ss, de 4,4 a 53,0 mg/placa. As substâncias isoladas 1 a 8, e a mistura M, foram testados de 25,0 a 100,0 µg/placa.

Em tubos de ensaios foram colocados 0,1 mL de cultura de bactérias e 0,5 mL de tampão fosfato pH 7,4 ou 0,5 mL da fração S9 (4%), no caso dos ensaios com ativação metabólica, e as amostras. Os tubos assim compostos foram incubados a 37°C durante 20 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 2 mL de ágar de superfície (top-ágar) acrescido de uma solução de histidina/biotina 0,05 mM na proporção de 10 mL/100 mL. Em seguida, os tubos foram agitados e vertidos em placas de Petri que já continham o meio mínimo glicosado. Essas placas foram incubadas por 48 horas a 37°C. Transcorrido esse tempo, foi efetuada a contagem das colônias revertentes. Todas as concentrações testadas, controles positivos e negativos foram realizados em triplicata.

3.2.1.1.8. Realização dos ensaios de antimutagenicidade

Para a realização dos ensaios de antimutagênese a metodologia de pré-incubação em placas, desenvolvida por Maron e Ames (1983), também foi empregada, sendo, neste ensaio, 5 concentrações não tóxicas (verificadas por teste de viabilidade prévio, onde o número de colônias das amostras + mutágeno foi superior ao número de colônias nas placas do controle negativo) das amostras misturadas a 0,1 mL de cultura de bactérias, a um agente mutagênico adequado para cada linhagem e a 0,5 mL da solução tampão fosfato pH 7,4, ou a 0,5 mL da

fração S9, no caso de ensaios com ativação metabólica, seguindo o protocolo de co-tratamento.

As concentrações testadas de Sd variaram de 0,1 a 36,0 mg/placa; de Sm, de 1,2 a 9,4 mg/placa; de Sn, de 0,3 a 17,4 mg/placa e de Ss, de 2,2 a 35,4 mg/placa. As substâncias isoladas 1 a 8, e a mistura M, foram avaliados em concentrações que variaram de 12,5 a 50,0 mg/placa.

A sequencia no procedimento foi a mesma utilizada para os ensaios de mutagenicidade a partir deste ponto. O cálculo da porcentagem da inibição da mutagenicidade foi realizado de acordo com Tachino *et al.* (1994) onde:

$$\text{Inibição} = \frac{1 - \text{revertentes induzidos/placa (com inibidor)}}{\text{revertentes induzidos/placa (sem inibidor)}} \times 100$$

Nenhum efeito antimutagênico foi encontrado quando a inibição foi menor que 25%, um efeito moderado foi encontrado para valores entre 25% e 40% e uma antimutagenicidade forte para valores maiores que 40% (LIRA *et al.*, 2008; LOH *et al.*, 2009; RESENDE *et al.*, 2012a; 2012b). Três experimentos independentes foram realizados com os extratos metanólicos e suas substâncias isoladas, todos em triplicata.

3.2.1.1.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa Salanal, adotando o modelo de Bernstein *et al.* (1982), no qual uma regressão linear padrão é realizada. Foram considerados valores significativos os que apresentarem valores de $p < 0,05$, marcados com um asterisco, e

muito significativos, marcados com dois asteriscos, os que apresentarem valores de $p < 0,01$. Ainda, outro parâmetro analisado foi a razão de mutagenicidade (RM), definida como a média do número de revertentes por placa de uma amostra dividida pela média do número de revertentes por placa do controle negativo, a qual foi calculada para cada uma das concentrações testadas de cada amostra. A amostra foi considerada mutagênica quando a RM foi igual ou maior que 2,0 em pelo menos uma das concentrações testadas e quando houve uma relação concentração-resposta reprodutível.

3.2.2. Genotoxicidade e Antigenotoxicidade

3.2.2.1. Ensaio do Cometa Alcalino

O ensaio do cometa é amplamente usado para detecção de danos ao DNA e reparo em células e tecidos de animais e plantas (MOLLER *et al.*, 2010). O princípio básico deste teste é a migração do DNA em uma matriz de agarose sob condições eletroforéticas (KNASMÜLLER, 2011). Quando observadas em microscópio, as células têm a aparência de um cometa com cabeça (a região nuclear) e uma cauda contendo os fragmentos de DNA que migram em direção ao polo positivo (HARTMANN *et al.*, 2003).

O ensaio cometa pode ser realizado tanto *in vitro* como *in vivo*. Assim como a maioria dos testes realizados *in vitro*, a principal vantagem de se avaliar culturas celulares é o controle das condições ambientais (SCHMALZ, 1994). Tanto as culturas primárias quanto as linhagens celulares permanentes vêm sendo empregadas na avaliação da genotoxicidade *in vitro*, sendo que as últimas têm oferecido mais vantagens principalmente no cultivo (RIBEIRO *et al.*, 2005). A versão *in vivo* do ensaio cometa é amplamente utilizada em testes de genotoxicidade e as suas vantagens incluem a aplicabilidade em diferentes órgãos, sensibilidade na detecção de baixos níveis de lesões, análise de pequeno número de células

por amostra, fácil execução, curto período para conclusão dos experimentos e custo relativamente baixo (TICE *et al.*, 2000).

Entre os tecidos recomendados para avaliação de danos por meio do ensaio cometa estão o fígado e os rins. O fígado é o principal órgão metabolizador de compostos absorvidos, como consequência, as células hepáticas são expostas a doses significativas desses compostos químicos os quais podem levar às disfunções hepáticas, dano celular e mesmo falência do órgão (HARTMANN *et al.*, 2003; ROTHFUSS *et al.*, 2011).

O teste tem sido muito utilizado na identificação de agentes com atividades genotóxicas e antigenotóxicas. A versão alcalina (pH > 13) pode ser usada para detectar danos no DNA (LIAO *et al.*, 2009; TICE *et al.*, 2000; WITTE *et al.*, 2007) do tipo quebras de fita, sítios alcali lábeis (ALS – *alkalib-labile sites*) e ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteína, e ainda detectar a prevenção desses danos (BURLINSON *et al.*, 2007; MERK e SPEIT, 1999; PFUHLER e WOLF, 1996).

Essa mesma metodologia pode ser empregada para avaliar a capacidade de substâncias diminuírem os danos causados no material genético por um agente genotóxico. A capacidade dessa metodologia em apontar um possível agente protetor de lesões no DNA é de extrema importância devido à grande facilidade com que atualmente entramos em contato com agentes mutagênicos e/ou cancerígenos.

3.2.2.1.1. Linhagem celular

A linhagem empregada para a realização dos experimentos foi a HepG2, de carcinoma hepatocelular. Essas células foram empregadas por possuírem uma capacidade parcial de metabolizar compostos, o que aproxima os efeitos obtidos em experimentos *in vitro* aos efeitos observados *in vivo*.

As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's médium - Sigma - Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell) e repicadas semanalmente por tripsinização até um máximo de 10 passagens.

3.2.2.1.2. Meios de cultura e soluções

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios foram preparados de acordo com as especificações de Rasmussen e Nielsen (2002). O meio utilizado para a cultura de células foi o DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, constituindo o denominado “meio de cultura completo”. Nos repiques, utilizou-se tampão PBS “Phosphate Buffered Saline” e solução ATV (solução de tripsina 0,2% + versene 0,2%, Instituto Adolfo Lutz), diluída 1:1 com PBS.

Para a realização do tratamento com extratos e substâncias isoladas nos ensaios de genotoxicidade e de antigenotoxicidade, foi usado o meio DMEM não suplementado com soro fetal bovino, para evitar a proliferação das células. No ensaio colorimétrico da sulforadamina B, foram utilizadas as soluções de ácido tricloroacético 10%, de sulforodamina B 0,4% em ácido acético 1%, de ácido acético 1% e tampão Tris base (10mM).

3.2.2.1.3. Tripsinização das culturas celulares

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

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

3.2.2.1.4. Preparo dos estoques celulares

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

3.2.2.1.5. Descongelamento dos estoques celulares

O vial criogênico retirado do nitrogênio líquido permaneceu em temperatura ambiente até que seu conteúdo estivesse completamente descongelado. Este conteúdo foi colocado em um tubo de centrífuga estéril (Corning Incorporated, Acton MA, USA – 15 mL) contendo 5 mL de meio de cultura completo e submetido à centrifugação por 3 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e, ao pellet, foi acrescentado 1 mL de meio de cultura completo. A suspensão celular foi transferida em um novo frasco contendo 5 mL de meio de cultura completo, o qual foi incubado nas condições previamente descritas.

3.2.2.1.6. Preparo dos extratos e substâncias isoladas

As concentrações dos extratos e substâncias isoladas foram definidas a partir do maior grau de dissolução das amostras em quantidade mínima do solvente escolhido, o DMSO. Posteriormente as mesmas foram dissolvidas em meio DMEM e estocadas a 4°C. A partir da solução estoque foram feitas diluições seriadas para obtenção das concentrações utilizadas em teste, com o meio de cultura DMEM não suplementado com soro fetal bovino. A

concentração máxima de solvente na cultura celular não excedeu a 0,1%, uma concentração conhecida que não provoca efeito sobre a viabilidade celular (SCHILIRÒ *et al.*, 2011).

3.2.2.1.7. Avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade

3.2.2.1.7.1. *Preparo das soluções*

As soluções utilizadas no ensaio do Cometa alcalino seguiram os protocolos de Singh *et al.* (1988) e Tice *et al.* (2000). Foram utilizadas: solução de lise estoque (NaCl 2,5 M; EDTA 100 mM; Tris 10 mM) em pH 10; solução de lise de uso (solução de lise estoque acrescida de Triton-X 1% e DMSO 10%) que foi preparada no momento do uso e deixada a 4°C por pelo menos 2 horas antes de ser utilizada; solução de eletroforese de pH13 (EDTA 0,5% e NaOH 3%); solução tampão de neutralização de pH7,5 (Tris 0,4 M); solução de agarose com ponto de fusão normal 1,5% e de agarose com baixo ponto de fusão 0,5%; solução de coloração (brometo de etídeo a 0,2 mg/mL; PBS de pH 7,4 (NaCl 18%, Na₂HPO₄ anidro 2,7%, Na₂H₂PO₄.H₂O 0,5%).

3.2.2.1.7.2. *Preparação das lâminas*

As lâminas novas foram lavadas com extran neutro a 3%, deixadas de molho por cerca de 3 horas, enxaguadas *overnight* e depois colocadas na estufa para secar. A agarose com ponto de fusão normal foi diluída a 1,5%, deixando quase ferver de 2 a 3 vezes no micro-ondas. O gel foi colocado já diluído no banho-maria ou em placa aquecida a 60°C e, com o auxílio de uma pinça, as lâminas foram mergulhadas na solução de agarose. As lâminas foram colocadas na posição horizontal para secar. As lâminas foram conservadas em geladeira por aproximadamente 1 mês.

3.2.2.1.7.3. *Tratamento das células*

3.2.2.1.7.3.1. **Realizações dos ensaios de genotoxicidade**

As concentrações dos extratos e substâncias isoladas foram definidas, primeiramente, a partir do maior grau de dissolução das amostras em quantidade mínima do solvente escolhido, o DMSO. Posteriormente, as amostras foram dissolvidas em meio DMEM e estocadas a 4°C. A partir da solução estoque foram feitas diluições seriadas para obtenção das concentrações utilizadas em teste, que foram obtidas através de ensaios de citotoxicidade, com o corante proteico Sulforodamina B (descrito no item 3.2.3). A concentração máxima de solvente na cultura celular não excedeu a 0,1%.

As concentrações testadas de Sd variaram entre 0,007 e 72,0 µg/mL; de Sm, entre 0,02 e 210,0 µg/mL; de Sn, entre 0,003 e 35,0 µg/mL e Ss, entre 0,07 e 710,0 µg/mL. As concentrações testadas das substâncias isoladas 1, 2, 6, 7 e 8 variaram de 0,01 a 100,0 µg/mL e das isoladas 3, 4 e 5, e da mistura M, de 0,1 a 1000,0 µg/mL.

As células HepG2 foram tripsinizadas, submetidas à contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) e 400 µL foram semeados em placas de 24 poços (Corning), a uma concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL. A aderência das células à placa ocorreu durante 24 horas e após esse período, o meio de cultura foi removido. O controle de meio consistiu em meio de cultura DMEM; o controle negativo, do meio DMEM com 0,1% de DMSO; e o controle positivo, de meio DMEM com MMS a 4,7 µM. As amostras foram submetidas à diluição seriada na própria placa, na proporção de 1:10.

Foram realizados 2 experimentos independentes, em dois tempos de tratamento diferentes, 4 e 24 horas, com 3 replicatas para cada concentração. Após esses tempos, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos, seu sobrenadante foi retirado e 100 µL solução de agarose de baixo ponto de fusão foi adicionada e

homogeneizada. Foram transferidos 100 µL da mistura cuidadosamente para uma lâmina previamente preparada com agarose com ponto de fusão normal. Uma lamínula grande (24 x 60 mm) foi colocada lentamente sobre a lâmina e essa foi deixada na geladeira por 5 minutos. A lamínula foi retirada cuidadosamente da lâmina e esta foi mergulhada na solução de lise de uso e deixadas em incubação *overnight*, ao abrigo da luz.

3.2.2.1.7.3.2. Realização dos ensaios de antigenotoxicidade

Os mesmos parâmetros utilizados no ensaio de genotoxicidade foram utilizados nestes ensaios. As diferenças entre eles consistiram, primeiramente, em incubar, juntamente com as diferentes concentrações testadas das amostras, o agente genotóxico metilmetanosulfonato (MMS) e os tempos de tratamento, agora realizados em 30 minutos e 4 horas. O MMS foi utilizado na concentração de 4,7 µM, e foi incubado com as amostras por 30 minutos (protocolo de co-tratamento) e também foi deixado agir somente nas células por 30 minutos e decorrido esse tempo, foi retirado. A placa foi lavada com PBS e o MMS substituído pelas diferentes concentrações das amostras teste (protocolo de pós-tratamento), que foram deixadas agir por 3 horas e meia, totalizando um tempo de tratamento de 4 horas.

As concentrações testadas, não tóxicas e não genotóxicas, de Sd variaram entre 0,04 e 360,0 µg/mL; de Sm, entre 0,21 e 2100,0 µg/mL; de Sn, entre 0,35 e 3500,0 µg/mL; de Ss, entre 0,7 e 7100,0 µg/mL; de 1, entre 0,05 e 500,0 µg/mL; de 2 a 8, e da mistura M, de 0,003 a 25,0 µg/mL, no co-tratamento de 30 minutos com o MMS. E variaram para o Sd entre 0,04 e 360,0 µg/mL; para o Sm entre 0,21 a 2100,0 µg/mL; para o Sn entre 0,02 e 175,0 µg/mL; para o Ss entre 0,04 e 355,0 µg/mL; para todas as isoladas, e para a mistura M, entre 0,003 e 25,0 µg/mL, no pós-tratamento de 4 horas com o MMS.

A partir desse ponto, os mesmos passos utilizados na avaliação da genotoxicidade foram seguidos.

3.2.2.1.7.4. *Eletroforese*

A solução de eletroforese foi preparada e deixada a 4°C. A cuba de eletroforese, envolvida em banho de gelo. As lâminas foram organizadas na cuba do polo negativo para o positivo. As lâminas foram deixadas na cuba por 20 minutos já com o tampão de eletroforese para haver o relaxamento do DNA. A fonte de eletroforese foi regulada para 25 volts e a 300 mA e o tempo de corrida da eletroforese foi de 20 minutos. Após isso, as lâminas foram retiradas cuidadosamente da cuba e mergulhadas na solução de neutralização e deixadas por 15 minutos. Após esse tempo, as lâminas foram fixadas em etanol puro e conservadas a 4°C até a análise.

3.2.2.1.7.5. *Coloração e análise das lâminas*

As lâminas foram coradas com cerca de 70 µL da solução de brometo de etídio, cobertas com lamínula grande (24 x 60 mm) e lidas imediatamente após a coloração. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (filtro de 516-560 nm, barreira de filtro de 590 nm) no aumento de 400 x, para permitir a visualização do nucleóides. As imagens dos nucleóides foram capturadas em bitmap e analisadas pelo software Tritex CometScore, que fornece os parâmetros “% de DNA”, que calcula a quantidade de DNA na cauda do cometa e “Tail Moment – TM” que calcula a distância do meio do nucleóide até o final da cauda do cometa. Ambos os parâmetros avaliam a extensão do dano causado pela substância-teste e agregam a esse dano um valor numérico. Quanto maior é esse valor, maior é o dano.

No que diz respeito à avaliação da antigenotoxicidade, o MMS foi incubado juntamente com as diferentes concentrações das amostras-teste para que fosse avaliada a capacidade das amostras em diminuir o dano causado pelo genotóxico. A porcentagem de diminuição dos danos causados foi obtida através da equação descrita por Zampini *et al.*, 2008:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{[(\text{intensidade da cauda}_{\text{mutágeno}} - \text{intensidade da cauda}_{\text{amostra}})]}{\text{Intensidade da cauda}_{\text{mutágeno}}} \times 100$$

3.2.2.1.7.6. *Análise Estatística*

A análise estatística do Teste do Cometa foi realizada pelo software GraphPad Prisma 6.0, onde foi realizada uma análise de variância (*One-way ANOVA* – teste não paramétrico) com pós-teste de Dunns. Foram comparados os diferentes tratamentos e controles aos pares. Foram obtidos a média e o desvio-padrão para cada concentração de tratamento e controles utilizados. E os valores de $p < 0,05$ foram marcados com um asterisco e os valores de $p < 0,01$ com dois asteriscos.

3.2.3. *Citotoxicidade*

3.2.3.1. Ensaio da Sulforrodamina

Para estudar o efeito citotóxico dos extratos e substâncias isoladas da família Eriocaulaceae, o ensaio com a sulforrodamina B foi o escolhido. Esse teste se baseia na identificação de síntese proteica, processo esse que só ocorre em células viáveis (VICHAI e KIRTIKARA, 2006). O ensaio colorimétrico da sulforrodamina B (SKEHAN *et al.*, 1990; RASMUSSEN e NIELSEN, 2002), corante que se liga a aminoácidos básicos das proteínas

celulares e, por avaliação colorimétrica, fornece uma estimativa da massa proteica total, que é relacionada ao número de células vivas que foram fixadas.

3.2.3.1.1. Linhagens utilizadas

As linhagens empregadas para a realização dos experimentos de citotoxicidade foram a HepG2, de carcinoma hepatocelular e a MCF-7/BUS, de carcinoma de mama.

3.2.3.1.2. Preparo das soluções dos extratos e substâncias isoladas

As concentrações dos extratos, das substâncias isoladas e da mistura M foram definidas a partir do limite de solubilidade das amostras em quantidade mínima do solvente escolhido, o DMSO. Posteriormente as mesmas foram dissolvidas em meio DMEM e estocadas a 4°C. A partir da solução estoque foram feitas diluições seriadas para obtenção das concentrações utilizadas em teste, com o meio de cultura DMEM não suplementado com soro fetal bovino. A concentração máxima de solvente na cultura celular não excedeu a 0,1%.

Sd foi testado nas concentrações de 0,72 a 7200,0 µg/mL; Sm, de 0,21 a 2100,0 µg/mL; Sn, de 0,35 a 3500,0 µg/mL e Ss, de 0,71 a 7100,0 µg/mL. As substâncias isoladas 1 a 8, e a mistura M, tiveram suas concentrações variando de 0,01 a 100,0 µg/mL, nos ensaios com as células HepG2.

Já para os ensaios realizados com as células MCF-7/BUS, as concentrações utilizadas variaram de 8,9 a 720,0 µg/mL para Sd; de 2,6 a 210,0 µg/mL, para Sm; de 4,3 a 350,0 µg/mL para Sn; e de 8,8 a 710,0 µg/mL para Ss. As substâncias isoladas 1 a 8, e a mistura M, foram testados de 4,1 a 1000,0 µg/mL.

3.2.3.1.3. Ensaio de citotoxicidade

As células foram tripsinizadas, submetidas à contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Germany) e 100 µL foram semeados em placas de 96 poços (Corning), a uma concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL, para as células HepG2, e $1,0 \times 10^5$ células/mL, para as células MCF-7/BUS. A aderência das células à placa ocorreu durante 24 horas e após esse período, o meio de cultura foi removido. As células foram lavadas com 100 µL de PBS. O controle de meio consistiu em meio de cultura DMEM, o controle negativo, o meio DMEM com 0,1% de DMSO e o controle positivo, de meio DMEM com doxorrubicina na concentração de 20 µg/mL, para as células HepG2, e DMSO a 40%, para as células MCF-7/BUS. As amostras foram submetidas à diluição seriada na própria placa, na proporção de 1:10, para as células HepG2, e na proporção de 1:3, para as células MCF-7/BUS. Foram realizados 3 experimentos independentes, com 3 replicatas para cada concentração. A viabilidade celular foi avaliada após 24 horas, para as duas linhagens testadas, e após 144 horas (6 dias), apenas para as células de carcinoma de mama (MCF-7/BUS), usando o ensaio colorimétrico da sulforrodamina B (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, MO, USA) (SKEHAN *et al.*, 1990, RASMUSSEN e NIELSEN, 2002).

3.2.3.1.4. Ensaio colorimétrico com a sulforrodamina B

O teste de citotoxicidade adotado baseia-se na coloração das proteínas pelo corante sulforrodamina B. Este corante possui dois grupos sulfônicos e liga-se às proteínas das células fixadas na placa. A técnica colorimétrica da sulforrodamina B consiste na substituição do meio de cultura ao final dos tempos de incubação por 200 µL de ácido tricloroacético 10%, para a fixação das células. As placas foram incubadas por 1 hora, a 4°C, na ausência de luz, e posteriormente lavadas cinco vezes com água gelada e deixadas em repouso para secagem. Em seguida, adicionou-se às placas 200 µL de sulforrodamina B e novamente foram

incubadas por meia hora em temperatura ambiente. O excesso de sulforrodamina B foi removido por meio da lavagem das placas com ácido acético 1%, sendo estas deixadas em repouso para secagem. O corante foi dissolvido com tampão Tris base pH 10,0 e a absorbância foi determinada a 492 nm.

3.2.3.1.5. Análise dos dados do ensaio de citotoxicidade

A absorbância encontrada para o controle de meio (meio DMEM), ou seja, para as células crescidas na ausência dos compostos-teste e na ausência do controle positivo, corresponde ao valor de 100% de sobrevivência. Foram comparadas com essa as médias das absorbâncias encontradas em cada uma das 5 concentrações das amostras testadas. Foram consideradas citotóxicas as concentrações das amostras que promoveram viabilidade celular inferior a 80%. A porcentagem de morte celular foi calculada, subtraindo-se o valor da viabilidade de 100% (controle de meio). Além disso, para as substâncias que foram consideradas citotóxicas, os valores de suas concentrações em que 50% (IC₅₀) de morte celular foram alcançados também foram calculados usando o método de regressão linear padrão.

3.2.4. *Estrogenicidade*

3.2.4.1. Teste RYA

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

A maioria desses ensaios está classificada dentro de uma das três categorias: a) ensaios de ligação competitiva ao RE, que verificam a afinidade de ligação de um composto químico ao RE; b) ensaios de informação gênica, que determinam se a transcrição e tradução gênica são dependentes da interação do RE com seu ligante; e c) ensaios de proliferação celular, que avaliam o aumento do número de células alvo, durante a fase exponencial de proliferação. Assim, esses ensaios atuam em diferentes níveis de complexidade biológica na resposta celular aos estrogénos (FANG *et al.*, 2001).

Um ensaio utilizado neste trabalho e usado para avaliar o potencial de desregulação endócrina de uma substância, é o ensaio de levedura recombinante (RYA) (CÉSPEDES *et al.*, 2004) onde a atividade estrogênica é resultado da interação direta com o RE (WANDA *et al.*, 2006; ZACHAREWSKI, 1998). Esse ensaio com gene repórter utilizando células de levedura é uma alternativa rápida de triagem quando comparados com estudos *in vivo* ou cultura de células (PASSOS *et al.*, 2009).

No RYA, a cepa da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) é geneticamente modificada e expressa dois elementos genéticos: um gene sensor, o RE humano, e um gene repórter, contendo o elemento responsivo a estrógeno do gene da vitelogenina B1 de *Xenopus laevis*, o qual promove a expressão da enzima β -galactosidase pela ativação do gene lacZ (Figura 7) (GARCIA-REYERO *et al.*, 2001, 2005).

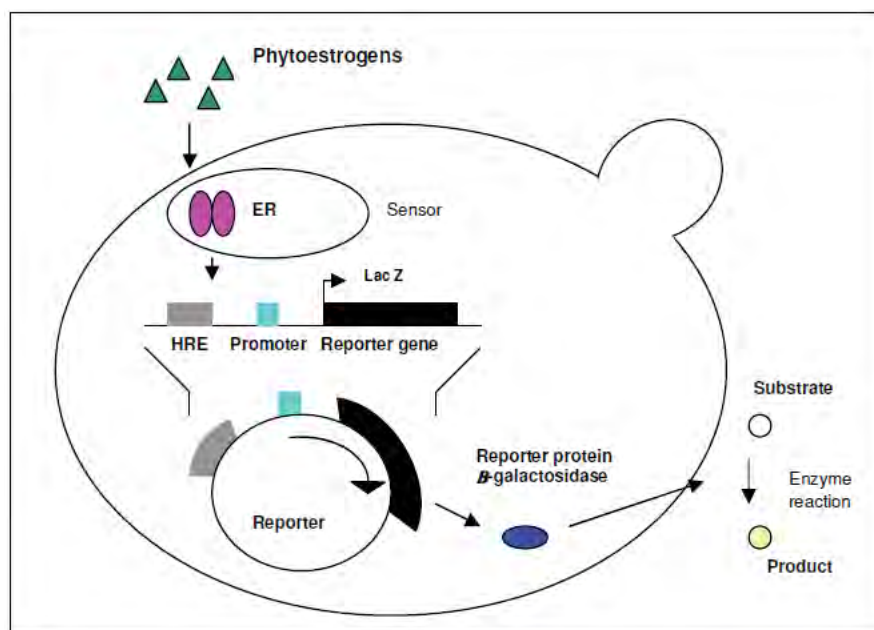


Figura 7. Mecanismo de ação exercido pelo RYA.

O gene repórter é construído de uma forma que esta enzima só será expressa na presença do complexo receptor-ligante, imitando o mecanismo pelo qual muitos genes responsivos a hormônios são regulados nos vertebrados (CÉSPEDES *et al.*, 2005; NOGUEROL *et al.*, 2006). A expressão do gene repórter é então monitorada por sua atividade enzimática utilizando substratos, cujos produtos são fáceis de detectar e quantificar (NOGUEROL *et al.*, 2006).

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

Duas características da célula leveduriforme são fundamentais para o sucesso do RYA. Primeiro, a levedura não tem um sistema endógeno homólogo de receptores nucleares de

vertebrados que poderiam interferir com o ensaio. Em segundo lugar, o processo de alteração conformacional e pós-transducional da proteína de vertebrados em levedura é muito semelhante ao das células de mamíferos, o que resulta na preservação da estrutura do receptor quando expresso em levedura (GREEN e CHAMBON, 1991; NOGUEROL *et al.*, 2006).

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

Para este experimento foi utilizada a linhagem BY4741 (MATa *ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0*), obtida da EUROSCARF, Frankfurt, Alemanha, gentilmente cedida pelo Profº Drº Benjamin Piña, CSIC – Barcelona - Espanha.

No teste de RYA foram utilizados extratos dissolvidos em DMSO e foi realizado essencialmente como descrito em Garcia-Reyero *et al.* (2005).

A levedura BY4741 transformada com os plasmídeos pH5HE0 e pVITB2x foi descongelada do estoque à -70°C e crescida a 30°C, por 2-3 dias em meio rico YPD (extrato de levedura 5 g/L, peptona 10 g/L e glicose 20 g/L). A seguir, as leveduras foram crescidas em meio mínimo SD (base nitrogenada sem aminoácidos 6,7 g/L, glicose 20 g/L) com ausência de uracila e leucina (-Ura-Leu), suplementado dos aminoácidos prototróficos necessários (0,1 g/L de histidina e metionina), por mais 1-2 dias. Então, 10 µL dessa cultura foram inoculados em 30 mL de meio mínimo, o qual foi incubado a 30°C até atingir D.O._{600nm}=0,1.

As concentrações iniciais dos extratos e substâncias isoladas foram selecionadas por teste prévio de toxicidade, onde foram dissolvidos em quantidade mínima de solvente (DMSO). Dez microlitros de concentrações não tóxicas (Sd= 1,5 mg/mL; Sm= 0,5 mg/mL; Sn= 1,0 mg/mL; Ss= 1,4 mg/mL; 1= 1,5 mg/mL; 2= 2,0 mg/mL; 3= 0,1 mg/mL; 4= 0,1 mg/mL; 5= 2,0 mg/mL; 6= 3,0 mg/mL; 7= 2,0 mg/mL, 8= 4,0 mg/mL e M= 0,2 mg/mL)

então foram adicionados a alíquotas de 90 µL de cultura de levedura na placa de 96 orifícios e essa mistura inicial foi usada para subseqüentes diluições seriadas (com os fatores de diluição 1:10; 1:30; 1:90; 1:270 e 1:810). Foram feitos também controles negativo (solvente da amostra) e positivo (10 nM de 17- β -estradiol/poço), e de toxicidade. Este último é feito colocando-se a diluição de 1:30 da amostra-teste com o estradiol (E₂) e com a levedura. O estradiol é utilizado neste controle para facilitar a visualização de possíveis efeitos tóxicos das substâncias avaliadas, pois a fluorescência obtida neste caso seria bastante alta e mesmo pequenas mudanças nela seriam percebidas.

Após isso, a microplaca foi incubada por 6 horas a 30°C com agitação. Decorrido esse período, 50 µL de tampão de lise (Y-PER, Pierce, Rockford, USA) foram adicionados a cada orifício e a microplaca foi novamente incubada na mesma temperatura por mais 30 minutos. A seguir, foram adicionados 50 µL de tampão suplementado com 0,1% de mercaptoetanol e 0,5% da solução de 4-metilumbeliferona β -D-galactopiranosídeo (MuGal). Após breve centrifugação a 1.000 rpm, as microplacas foram lidas em espectrofotômetro (355 nm de excitação e 460 nm de emissão). A fluorescência foi medida durante 15-20 minutos (uma medida por minuto) e os valores da atividade da β -galactosidase foram avaliados pelo aumento das unidades de fluorescência em relação ao tempo, usando o método de regressão linear padrão.

3.2.4.1.1. Análise dos dados

Este ensaio quantificou a atividade estrogênica, a qual foi calculada como estradiol-equivalentes (EEQ) (CÉSPEDES *et al.*, 2005; 2004). O teste RYA não fornece uma medida direta da concentração (ou massa) molar dos xenoestrógenos, mas sua atividade estrogênica. Simplificando, os resultados foram traduzidos em EEQ, definido como a quantia de estradiol

que deve estar presente para explicar a resposta observada de uma dada amostra. Esses equivalentes foram calculados a partir da menor diluição na qual a atividade da β -galactosidase foi indistinguível da atividade do controle (somente veículo). Para traduzir os resultados de diluições seriadas para EEQ, assume-se que as curvas dose-resposta hormonais seguem uma função sigmoidal,

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

Na qual R_0 , R e $R_{\max}$ representam as unidades de β -galactosidase obtidas sem adição de ligante (ou composto-teste), as obtidas numa dada concentração de ligante $[L]$, e as obtidas numa concentração de saturação de ligante, respectivamente. O K_d representa a constante de dissociação do complexo ligante-hormônio e seu valor coincide com o do EC_{50} , que é a concentração de ligante que exerce 50% da máxima resposta. Para as diluições seriadas das amostras, gráficos de fatores de diluição x resposta relativa seguem uma função sigmoidal invertida, na qual o EC_{50} aparente corresponde à diluição (real ou teórica) que exerce 50% da resposta máxima. Os valores de EC_{50} aparente para cada amostra (um mínimo de duas replicatas, com no mínimo quatro pontos cada) foram calculadas usando métodos de regressão não-linear padrão. Esses valores foram convertidos a EEQ assumindo que eles correspondam ao EC_{50} do estradiol, 40ng/L^{-1} no nosso ensaio. Três experimentos independentes foram realizados com os extratos metanólicos e substâncias isoladas, todos em triplicata.

3.2.4.2. Teste *E-screen*

Mesmo com a maior dificuldade associada aos ensaios celulares, esses não podem ser deixados de lado. Predominantemente baseado em linhagens celulares derivadas de humanos, as técnicas de proliferação utilizam alguns parâmetros para medir a multiplicação celular induzida pela exposição a compostos estrogênicos. Linhagens celulares comumente usadas são as células de câncer de mama humano responsivas a estrógenos, MCF-7 ou T47-D (ZACHAREWSKI, 1997). Todavia, para assegurar a confiabilidade da técnica, é necessário garantir que a linhagem celular empregada apresente elevada especificidade de resposta a estrógenos e não prolifere em resposta à ligação a outros receptores, como por exemplo, fatores de crescimento (JONES *et al.*, 1998).

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

O ensaio *E-screen*, desenvolvido por Soto *et al.* (1992, 1995), é baseado no crescimento das células MCF-7, na presença de estrógenos ou compostos que os mimetizam. Essas células são recomendadas devido a sua reprodutibilidade e sensibilidade estável a esses hormônios. O método pode diferenciar compostos agonistas, agonistas parciais ou inativos (KORACH e MCLACHLAN, 1995), comparando a proliferação celular obtida em concentrações variáveis da substância em análise com aquelas observadas após exposição a controles positivos e negativos (OH e CHUNG, 2004; SOTO *et al.*, 1992).

Segundo Rajapakse (2004), de todos os ensaios utilizados para triagem de substâncias químicas com atividade endócrina, o *E-screen* apresenta o maior nível de complexidade biológica, podendo isso ser considerado como um ponto de eficácia. Muitos fatores devem ser considerados durante o planejamento experimental, desenvolvimento e avaliação da combinação de efeitos estrogênicos e antiestrogênicos por diferentes mecanismos.

O teste do *E-screen* foi realizado em microplacas com 24 orifícios, conforme descrito por Rasmussen e Nielsen (2002). Foram semeados 400 µL de uma suspensão de 5×10^4 células/mL. Após 24 horas, e aderência das células, o meio de cultura foi substituído por outro meio com soro livre de estrógenos (10% de soro fetal bovino tratado com carvão/dextrana) e foram realizados os tratamentos com 5 (no caso dos extratos) ou 6 (no caso das substâncias isoladas) concentrações diferentes.

As concentrações iniciais dos extratos e substâncias isoladas foram selecionadas por teste prévio de toxicidade (descrito no item 3.2.3). Nesse, as concentrações utilizadas foram próximas do limite de solubilidade de cada amostra.

As concentrações selecionadas para este ensaio variaram de 0,01 a 2,97 µg/mL, para o Sd; para o Sm, de 0,004 a 0,87 µg/mL; para o Sn, de 0,006 a 1,43 µg/mL e para o Ss, de 0,04 a 8,8 µg/mL. Entre as substâncias isoladas, 1 foi testada nas concentrações de 0,02 a 4,10 µg/mL; 2, de 0,05 a 12,3 µg/mL; 3, de 0,02 a 4,10 µg/mL; 4, de 0,15 a 37,5 µg/mL; 5, de 0,2 a 37,0 µg/mL, 6, de 0,5 a 111,0 µg/mL; 8, de 0,006 a 1,37 µg/mL e M, de 0,3 a 75,0 µg/mL. A substância isolada 7, não foi testada pois não havia quantidade suficiente para a realização desses ensaios.

Após 144 horas (6 dias), as células foram fixadas com 500 µL de ácido tricloroacético a 10% por poço e incubadas a 4°C por 1 hora, na ausência de luz. Em seguida as placas foram lavadas com água de torneira gelada e as células foram tratadas com 500 µL de uma solução de sulforrodamina a 0,4% em ácido acético 1% por poço. As placas foram incubadas por 30

minutos a temperatura ambiente. Após esse tempo, as placas foram lavadas com ácido acético 1% (cinco vezes), deixadas em repouso, em temperatura ambiente, para secagem. Com as placas secas, o corante ligado às células foi solubilizado com 500µl de Tris base 10 mM (pH = 10,5) por poço durante 20 minutos. Finalmente, a intensidade do corante foi lida no leitor de microplacas SynergyTM H1, Biotec, em 492 nm.

Foram utilizados o 17- β -estradiol (10^{-8} M), como controle positivo, 0,01% de DMSO, como controle negativo dos testes com extratos, e meio DMEM sem vermelho de fenol com soro fetal bovino sem hormônio, como controle de meio. Os testes com as substâncias isoladas foram realizados sem controle negativo, e somente com controle de meio, pois os compostos não estavam diluídos em DMSO.

3.2.4.2.1. Remoção de estrógenos endógenos do soro fetal bovino

A remoção de estrógenos endógenos foi realizada por meio do tratamento do soro fetal bovino com carvão coberto com dextrana (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). A técnica consistiu em agitar a 120 rpm, a 37°C (shaker), 500 mL de soro fetal bovino, adicionados de 10 g de carvão coberto com dextrana, por 1 hora. Após esse tempo, o soro foi aliqotado em tubos de centrífuga e foi centrifugado a 4000 rpm por 20 minutos, duas vezes. Após centrifugação, o sobrenadante foi esterilizado através de membrana filtrante de 0,22 µm e estocado a -20°C até o uso.

3.2.4.2.2. Análise dos resultados

Após leitura das placas foram determinados os parâmetros de atividade estrogênica. Um dos parâmetros calculados foi o efeito proliferativo (EP), que estabelece a taxa máxima de proliferação induzida pela substância em células MCF7-BUS. Esse parâmetro é obtido pela

relação entre a taxa de proliferação apresentada pela substância avaliada ou pelo 17- β -estradiol e aquela apresentada pelo controle de solvente (DMSO 0,01%).

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

Outro parâmetro estabelecido é o efeito proliferativo relativo (EPR), que estabelece uma relação entre a taxa máxima de proliferação da substância avaliada e a taxa máxima obtida pelo 17- β -estradiol.

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

As amostras que apresentaram EPR menor de 25%, em todas as suas concentrações testadas, foram consideradas não estrogênicas e não proliferativas. As que apresentaram EPR entre 25 e 80%, em pelo menos uma de suas concentrações testadas, foram consideradas como agonistas parciais dos REs. As que apresentaram EPR acima de 80%, em pelo menos uma de suas concentrações testadas, foram consideradas estrogênicas, com caráter proliferativo das células MCF-7/BUS e agonistas totais dos REs (KUCH *et al.*, 2010).

Os parâmetros obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA (assumindo $p < 0,05$) seguida de pós-teste de Dunett.

3.2.5. Modulação da Expressão Gênica

O rápido avanço das pesquisas em genética e biologia molecular, consequência do atual progresso das tecnologias empregadas nessas áreas, exige que técnicas mais avançadas sejam incorporadas aos testes clássicos de citogenética para melhor compreensão de como os compostos interagem com o DNA (GARCIA-CAÑAS *et al.*, 2010).

A análise da expressão gênica global pode ser realizada com o uso da técnica de *microarray* enquanto a expressão de genes individuais é freqüentemente avaliada por meio da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) quantitativa em tempo real (GOHIL e CHAKRABORTY, 2004).

Os *microarrays* de DNA são coleções de oligonucleotídeos, segmentos de DNA fita única (denominadas sondas), geralmente anexados a uma lâmina de vidro em locais pré-definidos, representando milhares de genes. São utilizadas duas amostras de RNA em situações distintas, um controle e a amostra. Após a extração do RNA mensageiro e confecção do DNA complementar (cDNA), as amostras de cDNA são diferencialmente marcadas com compostos fluorescentes. Este cDNA marcado é, então, desnaturado por aquecimento e hibridado com os oligonucleotídeos na lâmina de *microarray* e um *scanner* especial realiza a leitura da intensidade da fluorescência nos comprimentos de onda referente aos 2 compostos fluorescentes utilizados. As imagens digitalizadas são analisadas por um *software* específico que irá converter a cor e a intensidade da fluorescência em um conjunto de valores numéricos (STORHOFF *et al.*, 2004). A análise da vasta quantidade de dados de *microarrays* é uma tarefa árdua e os resultados positivos encontrados devem ser validados pela técnica de PCR em tempo real.

O sistema “RT2 *Profiler PCR Array*” representa a união da RT-*qPCR* Syber Green (no qual fluoróforos se ligam à fita-dupla de DNA, emitindo fluorescência) com a capacidade de avaliação de múltiplos genes do *microarray* podendo ser aplicado em estudos de toxicologia, oncologia, imunologia, entre outros. Neste sistema, dezenas a centenas de genes de vias metabólicas específicas podem ser avaliadas simultaneamente sem a necessidade da validação exigida pela técnica do *microarray*. *PCR Arrays* estão disponíveis para várias vias metabólicas, entre elas, apoptose, transdução de sinais, câncer, e genes de resposta ao stress oxidativo (BALUCHAMY *et al.*, 2010; SERPELONI, 2012).

3.2.5.1. Ensaio do *PCR Array*

Para análise da expressão gênica aproximadamente 1×10^6 células MCF-7/BUS foram tratadas, por 24 horas, com a mistura de duas xantonas M= A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona, na concentração de 40,5 µg/mL, ou meio de cultivo DMEM (controle), em triplicata, em microplacas de seis orifícios. Essa mistura foi a escolhida para a realização desse ensaio, e nessa concentração, pois foi a que apresentou os melhores resultados de estrogenicidade, no teste *E-screen*, dentre as demais isoladas. Essa concentração foi utilizada para se manter a mesma concentração celular e a quantidade de substâncias disponíveis para as células. No ensaio *E-screen*, a concentração com o melhor potencial foi a de 2,7 µg/mL e foram utilizadas 2×10^4 células/poço. No *PCR Array*, utilizou-se 3×10^5 células/poço. Sendo esse número 15 vezes maior, estimou-se que uma concentração da mistura M também 15 vezes maior fosse capaz de exercer efeitos na expressão gênica representativos dos encontrados no ensaio *E-screen*, por isso utilizamos 40,5 µg/mL.

Esse tratamento foi repetido em 3 diferentes microplacas. As células de cada triplicata do controle e teste foram misturadas em um *pool* de células. Essas células foram submetidas à extração do RNA, síntese de cDNA e então realizada a técnica de *RT-qPCR Array* em triplicata para controle e teste.

3.2.5.2. Extração de RNA

As células foram submetidas ao procedimento de extração de RNA total segundo o protocolo do fabricante do *RNeasy Mini Kit* (SABiosciences; Frederick, MD, USA) que inclui os passos de lise das células, purificação do RNA, tratamento com DNase e eluição do RNA com água livre de nuclease fornecido pelo fabricante.

Para a quantificação das amostras de RNA total, uma alíquota de 2µl foi diluída em 198µl de água livre de nuclease. Para quantificar o DNA, usou-se um espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis). Este aparelho quantifica o DNA de cadeia dupla (entre outros) de acordo com a lei de Lambert-Beer:

$$C = \frac{Abs \times e}{b}$$

Onde C é a concentração de DNA em ng/µl, Abs é a absorbância (neste caso a 260nm, que corresponde ao pico de absorção de UVs do DNA), e é o coeficiente de extinção (que para o DNA de cadeia dupla é igual a 50 ng.cm/µL) e b a altura da coluna criada no espectrofotômetro (que neste caso corresponde a 1 cm). Assim, quando o NanoDrop mede a absorbância a 260 nm obtêm-se um valor, que multiplicado por 50 (constante e) indica a concentração de DNA na amostra, em ng/µL.

O aparelho também lê a absorbância a 280 nm, que corresponde ao pico de absorção de UVs de proteínas, e a 230 nm, que corresponde ao pico de absorção de UVs de contaminantes orgânicos, fazendo, assim, as razões da absorbância 260/280 e 260/230, com as quais se pode verificar a pureza das amostras. Uma solução pura de RNA apresenta razão A260/280 em torno de 2,0, razões inferiores a 1,7 são indicativas de contaminação. Devem ser utilizadas razões entre 1,8 e 2,2.

A integridade do RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão de corrida TBE (10,8 g/L Tris Base, 5,5 g/L ácido bórico e 4 mL de EDTA 0,5 mM/L, pH=8). Imediatamente antes da eletroforese as amostras de RNA foram desnaturadas (65°C por 5 minutos, seguido de banho de gelo por 10 minutos) em solução de formamida (60% do volume final), 1 µL de brometo de etídio (1 mg/mL) e 1/10 do volume da solução de tampão de carregamento 10 x (50 mM Tris-HCl pF 7,6, 0,25% de azul de bromofenol, 60% glicerol)

(MASEK *et al.*, 2005). A corrida eletroforética foi realizada a 6,5 V/cm durante 20 minutos. A integridade do RNA foi avaliada em transiluminador de luz ultravioleta observando-se a integridade das bandas de RNA. Todas as amostras de RNA foram mantidas em freezer -80°C.

3.2.5.3. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o kit *RT² First Strand Kit* (SABiosciences; Frederick, MD, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O produto da reação de *RT-PCR* foi diluído em 91 µL de água duplamente destilada e mantido a -20°C até o momento do uso.

3.2.5.4. *RT² Profiler PCR Arrays*

As reações de *PCR Array* foram realizadas com o kit *RT² Profiler PCR Array* (Breast Cancer Pathway) (SABiosciences; Frederick, MD, USA) para 84 genes de acordo com o protocolo do fabricante. O mix para as reações de *PCR Array* foi preparado com *RT² SYRB Green/ROX qPCR Master Mix* (SABiosciences; Frederick, MD, USA) suficiente para uma microplaca, água duplamente destilada e cDNA de cada amostra. O *mix* foi homogeneizado e 25 µL da solução distribuída em cada um dos 96 orifícios da placa de *PCR Array* que já continham os iniciadores de interesse. Além dos 84 genes de células de câncer de mama, as placas continham 5 diferentes controles endógenos, um controle para contaminação por DNA genômico, controle da transcriptase reversa e controle positivo para *PCR*. A distribuição dos genes analisados e dos controles na placa pode ser observada no Anexo 2. O equipamento utilizado para as reações de *RT-qPCR* foi o Applied Biosystems 7500 PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e as condições de ciclagem foram: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1 minuto. Em seguida foi realizada a curva de

dissociação elevando-se a temperatura de 65 a 95°C, com variação de 2°C por minuto. A Figura 8 demonstra os passos realizados desde a obtenção do RNA até os gráficos de análise dos resultados.

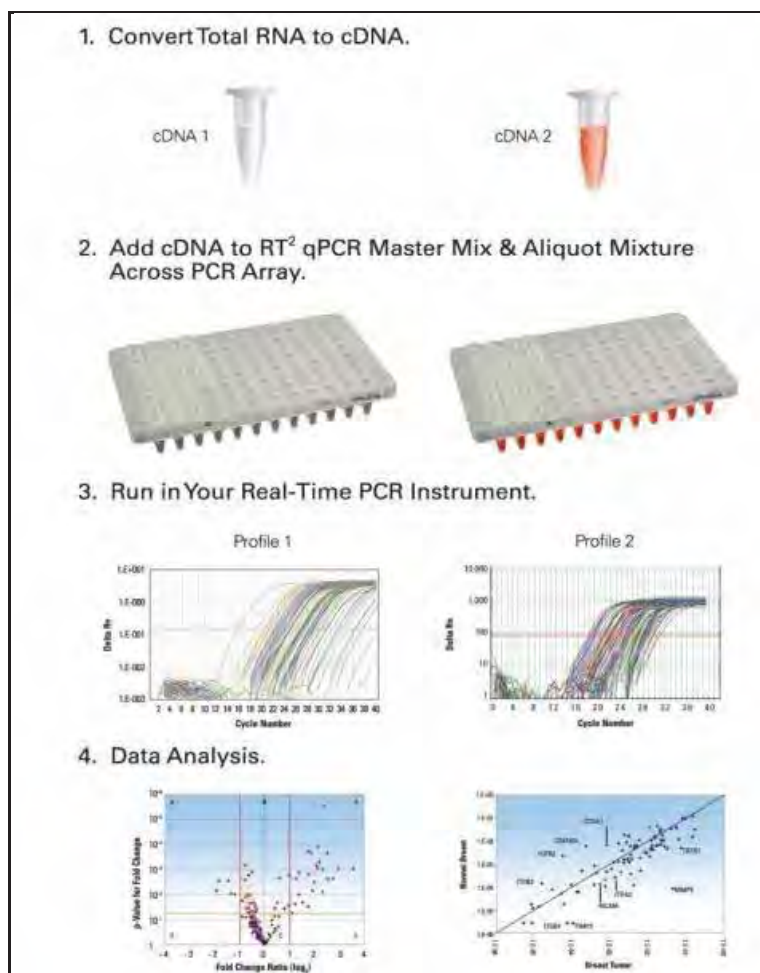


Figura 8. Fluxograma da análise da expressão gênica por *PCR Array*. Esquema ilustrando o sistema de PCR em tempo real (*RT² ProfilerTM PCR Array System*) e as fases desde a obtenção do RNA até a análise dos resultados.

3.2.5.5. Análise estatística

Após a amplificação das amostras, os cálculos da expressão diferencial foram realizados pelo programa *RT² Profiler PCR Array Data Analysis Super-Array-SABiosciences*. Os genes que apresentaram valores de ciclo *threshold* (Ct) acima de 35 foram considerados

não expressos. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Entre as vantagens do método comparativo de Ct estão a facilidade de aplicação do método e a possibilidade de apresentação dos dados através do aumento em vezes na expressão.

Após isso, o Teste t de Student foi realizado para avaliar a significância das diferenças na expressão gênica entre controle e teste. A expressão de genes com valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados estão representados como diferença (*fold regulation*) na expressão gênica, que foi normalizada pela média geométrica de cinco genes de controle endógeno.

4. RESULTADOS

4.1. Mutagenicidade

Os extratos metanólicos Sd, Sm, Sn, e Ss foram avaliados nas concentrações de 4,5 a 54,0 mg/placa; 1,2 a 14,0 mg/placa; 0,8 a 9,0 mg/placa e 4,4 a 53,0 mg/placa, respectivamente, nas linhagens TA100, TA98, TA97a e TA102 de *S. typhimurium*, na presença (+S9) e na ausência (-S9) de metabolização.

De acordo com os dados da Tabela 2, verificou-se que, tanto em ausência (-S9), quanto na presença de metabolização (+S9), a mutagenicidade foi considerada negativa, ficando com todos os valores de RM abaixo de 2, em todas as linhagens testadas, todas concentrações testadas, de todos os extratos, exceto pelo extrato Ss, que apresentou indícios de mutagenicidade na linhagem TA100, na presença de metabolização (+S9), pois teve o seu RM menor que 2,0 em todas as concentrações testadas, mas apresentou uma relação dose-resposta nas maiores concentrações testadas (17,7 a 53,0 mg/placa).

Os dados da avaliação da mutagenicidade das substâncias isoladas foram dispostos juntamente com os dados da avaliação da sua antimutagenicidade (seção 4.2), pois foram realizados apenas testes preliminares, na presença de metabolização, com algumas linhagens (TA100 e TA98), para averiguar se nessas condições havia potencial mutagênico.

Tabela 2. Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa $\pm$ desvio padrão e razão de mutagenicidade (RM) dos extratos metanólicos de *Syngonanthus dealbatus* (S.), *S. macroloplepis* (Sm), *S. nitens* (Sn) e *S. suberosus* (Ss) nas linhagens TA100, TA98, TA97a e TA102 de *S. typhimurium* em ausência (-S9) e em presença de metabolização (+S9).

Revertentes de <i>Salmonella typhimurium</i> / placa + DP									
Tratamento mg/placa	TA100		TA98		TA97a		TA102		
Sd	- S9 ^c	+ S9 ^b	- S9 ^a	+ S9 ^b	- S9 ^a	+ S9 ^b	- S9 ^d	+ S9 ^b	
C-	191 + 17	162 + 20	20 + 4	24 + 3	147 + 11	183 + 25	305 + 15	303 + 8	
4,5	185 + 5 (1,0)	203 + 22 (1,3)	18 + 2 (0,9)	27 + 9 (1,1)	159 + 24 (1,1)	235 + 19 (1,3)	372 + 34 (1,2)	408 + 29 (1,4)	
9,0	186 + 23 (1,0)	224 + 18 (1,4)	25 + 3 (1,3)	31 + 9 (1,3)	187 + 39 (1,3)	200 + 63 (1,1)	355 + 7 (1,2)	374 + 21 (1,2)	
18,0	191 + 17 (1,0)	211 + 2 (1,3)	19 + 6 (1,0)	22 + 3 (0,9)	147 + 45 (1,0)	214 + 38 (1,2)	351 + 46 (1,2)	364 + 13 (1,2)	
36,0	179 + 17 (0,9)	197 + 12 (1,2)	15 + 1 (0,8)	21 + 4 (0,9)	148 + 13 (1,0)	186 + 39 (1,0)	296 + 16 (1,0)	374 + 31 (1,2)	
54,0	150 + 12 (0,8)	168 + 23 (1,0)	20 + 2 (1,0)	21 + 8 (0,9)	129 + 31 (0,9)	224 + 3 (1,2)	279 + 20 (0,9)	295 + 9 (1,0)	
C+	3740 + 450	2171 + 254	1329 + 206	1792 + 128	1209 + 170	2171 + 254	3135 + 329	1485 + 172	
Sm									
C-	139 + 12	163 + 12	24 + 3	24 + 4	133 + 19	159 + 10	293 + 17	335 + 20	
1,2	162 + 19 (1,2)	162 + 19 (1,0)	21 + 4 (0,9)	23 + 5 (1,0)	115 + 23 (0,9)	175 + 11 (1,1)	332 + 23 (1,1)	392 + 15 (1,2)	
2,3	172 + 13 (1,2)	153 + 6 (0,9)	26 + 3 (1,1)	22 + 2 (0,9)	139 + 2 (1,1)	181 + 7 (1,1)	318 + 12 (1,1)	344 + 13 (1,0)	
4,7	153 + 6 (1,1)	162 + 18 (1,0)	29 + 13 (1,2)	20 + 3 (0,8)	145 + 22 (1,1)	192 + 19 (1,2)	308 + 19 (1,1)	415 + 49 (1,2)	
9,4	166 + 2 (1,2)	139 + 11 (0,9)	30 + 4 (1,3)	21 + 5 (0,9)	134 + 38 (1,0)	194 + 30 (1,2)	325 + 29 (1,1)	392 + 15 (1,2)	
14,0	193 + 27 (1,4)	156 + 17 (1,0)	32 + 13 (1,3)	18 + 2 (0,8)	154 + 44 (1,2)	202 + 35 (1,3)	331 + 21 (1,1)	404 + 35 (1,2)	
C+	1053 + 229	2174 + 348	880 + 48	480 + 43	1025 + 129	2189 + 171	1608 + 74	3364 + 437	
Sn									
C-	222 + 12	149 + 13	26 + 10	23 + 1	155 + 19	217 + 8	264 + 18	238 + 29	
0,8	253 + 14 (1,1)	191 + 13 (1,3)	26 + 5 (1,0)	-----	195 + 8 (1,3)	263 + 17 (1,2)	237 + 31 (0,9)	262 + 64 (1,1)	
1,5	236 + 18 (1,0)	154 + 16 (1,0)	25 + 5 (1,0)	19 + 4 (0,8)	193 + 13 (1,3)	233 + 14 (1,1)	252 + 22 (0,9)	300 + 6 (1,3)	
3,0	254 + 17 (1,1)	128 + 30 (0,9)	25 + 1 (1,1)	19 + 8 (0,8)	182 + 8 (1,2)	215 + 10 (1,0)	254 + 6 (0,9)	294 + 22 (1,2)	
6,0	253 + 20 (1,1)	149 + 11 (1,0)	48 + 8 (1,9)	30 + 7 (1,3)	188 + 9 (1,2)	219 + 4 (1,0)	238 + 40 (0,9)	326 + 43 (1,4)	
9,0	298 + 15 (1,3)	175 + 29 (1,2)	18 + 12 (0,7)	24 + 5 (1,0)	183 + 30 (1,2)	223 + 4 (1,0)	198 + 49 (0,7)	341 + 9 (1,4)	
C+	3740 + 450	4933 + 240	1329 + 206	3189 + 132	1444 + 82	3006 + 151	3135 + 329	1476 + 201	
Ss									
C-	97 + 6	140 + 11	38 + 3	25 + 6	157 + 4	183 + 25	305 + 15	238 + 29	
4,4	106 + 19 (1,1)	163 + 22 (1,2)	40 + 4 (1,1)	33 + 4 (1,3)	171 + 1 (1,1)	227 + 18 (1,2)	296 + 23 (1,0)	262 + 64 (1,1)	
8,8	113 + 5 (1,1)	167 + 6 (1,2)	42 + 9 (1,1)	29 + 8 (1,2)	166 + 7 (1,1)	226 + 43 (1,2)	338 + 28 (1,1)	300 + 6 (1,3)	
17,7	135 + 17 (1,4)	190 + 12 (1,4)*	42 + 2 (1,4)	36 + 4 (1,4)	162 + 10 (1,0)	210 + 31 (1,2)	297 + 43 (1,0)	294 + 22 (1,2)	
35,4	116 + 13 (1,2)	228 + 23 (1,6)*	36 + 8 (1,0)	31 + 9 (1,3)	153 + 8 (1,0)	179 + 29 (1,0)	208 + 13 (0,7)	326 + 43 (1,4)	
53,0	126 + 21 (1,3)	207 + 12 (1,5)**	50 + 2 (1,3)	23 + 4 (0,9)	128 + 5 (0,8)	169 + 50 (0,9)	195 + 37 (0,6)	341 + 9 (1,4)	
C+	3740 + 450	4933 + 240	1329 + 206	3058 + 503	1444 + 82	3955 + 151	3135 + 329	1476 + 201	

C:-controle negativo, DMSO (100 µL/placa); C+: controles positivos: a) NPD: 4-nitrophenilenediamino (10 µg/placa); b) 2-Antramine (1,25 µg/placa); c) Azida sódica (2,5 µg/placa); d) Mitomicina (0,5 µg/placa). *P < 0,05 e **P < 0,01.

4.2. Antimutagenicidade

Os extratos metanólicos Sd, Sm, Sn e Ss foram avaliados nas concentrações de 0,1 a 36,0 mg/placa; 1,2 a 9,4 mg/placa; 0,3 a 17,5 mg/placa e 2,2 a 35,4 mg/placa, respectivamente, nas linhagens TA100, TA98 e TA102 de *S. typhimurium*, na presença (+S9) e na ausência (-S9) de metabolização.

De acordo com os dados dispostos na Tabela 3, verificou-se que o Sd apresentou atividade antimutagênica nas três linhagens testadas, todavia os resultados mais proeminentes foram verificados na presença de metabolização, nas linhagens TA100 e TA98. Para a linhagem TA100, a maior taxa de inibição da mutagenicidade causada pela AFB₁ foi de 78%, encontrada na concentração de 18,0 mg/placa. Para a TA98, alcançou valores maiores da taxa de inibição da mutagenicidade causada pelo BaP. O maior valor encontrado foi de 96%, na mesma concentração de 18,0 mg/placa. Para a TA102, na ausência de metabolização, os resultados foram menos expressivos nas 3 menores concentrações (0,1; 0,3 e 0,5 mg/placa), mas alcançou até 73% na maior concentração testada (1,0 mg/placa).

Ainda na Tabela 3, pode-se verificar que o Sm apresentou atividade antimutagênica nas 3 linhagens testadas e, assim como no extrato Sd, os resultados mais proeminentes foram verificados na presença de metabolização, nas linhagens TA100 e TA98. Na TA100, o maior valor encontrado da taxa de inibição foi de 72%, na concentração de 4,7 mg/placa. Para a TA98, o extrato reduziu até 55% da mutagenicidade causada pelo NPD, na sua maior concentração testada (9,4 mg/placa), na ausência de metabolização. Na presença da mistura S9, os resultados foram maiores, alcançando até 91% de inibição da mutagenicidade causada pelo BaP também na sua maior concentração testada.

Na Tabela 4 estão dispostos os dados do Sn e pode-se verificar que este apresentou atividade antimutagênica nas 3 linhagens testadas, assim como os extratos Sd e Sm. Na linhagem TA100, resultados expressivos foram encontrados apenas na presença de

metabolização, onde o maior valor da taxa de inibição foi 75% na concentração de 6,0 mg/placa. Para a linhagem TA98, o extrato reduziu 60% da mutagenicidade causada pelo NPD, na concentração de 17,5 mg/placa, na ausência de metabolização. Na presença da mistura S9, os resultados foram maiores, alcançando até 80% de inibição, na maior concentração testada (6,0 mg/placa).

Ainda na Tabela 4, o Ss também apresentou atividade antimutagênica nas três linhagens testadas. Na linhagem TA100, resultados expressivos foram encontrados apenas na presença de metabolização, alcançando até 69% de inibição na sua maior concentração (35,4 mg/placa). Para a linhagem TA98, o extrato reduziu até 54% da mutagenicidade causada pelo NPD, também na sua maior concentração, na ausência de metabolização. Na presença da mistura S9, os resultados foram maiores, alcançando 89% de inibição, também na sua maior concentração. Na linhagem TA102, reduziu até 64% da mutagenicidade causada pela mitomicina C, na concentração de 17,7 mg/placa, na ausência de metabolização.

Anteriormente à realização dos ensaios de antimutagenicidade, ensaios preliminares onde as substâncias isoladas e a mistura M foram testadas nas linhagens TA100 e TA98, na presença da fração metabolizadora S9, apenas para verificar se elas não induziam o aumento da mutagenicidade nessas condições.

Na Tabela 5, portanto, estão dispostos os dados da avaliação da mutagenicidade das substâncias isoladas 1 a 8 e da mistura M. As substâncias e a mistura foram avaliadas nas concentrações de 25,0; 50,0 e 100,0 µg/placa, nas linhagens TA100 e TA98 de *S. typhimurium*. Verificou-se que, na presença de metabolização (+S9), a mutagenicidade foi considerada negativa para todas as concentrações testadas, de todas as substâncias isoladas, em ambas as linhagens testadas.

Na Tabela 6 estão dispostos os dados da avaliação da antimutagenicidade das substâncias isoladas 1 a 8, e da mistura M, que foram avaliadas nas concentrações de 12,5;

25,0 e 50,0 µg/placa cada uma, nas linhagens TA100 e TA98, na presença de metabolização (+S9). Foram escolhidas essas duas linhagens apenas, pois foram as que apresentaram os melhores resultados na antimutagenicidade dos extratos.

De acordo com os dados pode-se verificar que todas as substâncias isoladas, exceto 3, foram antimutagênicas nas 2 linhagens testadas, mas melhores resultados foram encontrados na linhagem TA100, diminuindo em até 62% (1); 51% (2); 89% (4); 69% (5); 75% (6); 85% (7); 75% (8) e 55% (M) a taxa de revertência causada pela AFB₁. A substância 3 apresentou melhor efeito antimutagênico na linhagem TA98, na presença de metabolização, e diminuiu em até 54% a mutagenicidade causada pelo BaP.

Tabela 3. Atividade antimutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa $\pm$ desvio padrão (DP) e índice de inibição (I%) dos extratos metanólicos de *Syngonanthus dealbatus* (Sd) e *S. macrolophus* (Sm) nas linhagens TA100, TA98 e TA102 de *S. typhimurium* em ausência (-S9) e em presença de metabolização (+S9).

Revertentes de <i>Salmonella typhimurium</i> / placa $\pm$ DP (I%)									
TA100 mg/placa (-S9)	TA100 mg/placa (+S9)	TA98 mg/placa (-S9)	TA98 mg/placa (+S9)	TA98 mg/placa (-S9)	TA98 mg/placa (+S9)	TA102 mg/placa (-S9)	TA102 mg/placa (+S9)		
AS (1,25x10 ⁻³)	1281 $\pm$ 321	AFB ₁ (1x10 ⁻³)	932 $\pm$ 114	NPD (1x10 ⁻²)	934 $\pm$ 272	BaP (5x10 ⁻⁴)	243 $\pm$ 18	MMC (5x10 ⁻⁴)	3893 $\pm$ 801
DMSO	181 $\pm$ 22	DMSO	226 $\pm$ 24	DMSO	24 $\pm$ 4	DMSO	22 $\pm$ 2	DMSO	447 $\pm$ 19
Sd + AS	Sd + AFB ₁	Sd + NPD	Sd + BaP	Sd + MMC					
2,3	980 $\pm$ 62 (24) ^a	4,5	290 $\pm$ 9 (69) ^c	4,5	824 $\pm$ 164 (12) ^a	4,5	36 $\pm$ 13 (85) ^c	0,1	2603 $\pm$ 235 (33) ^b
4,5	813 $\pm$ 57 (37) ^b	9,0	241 $\pm$ 14 (74) ^c	9,0	687 $\pm$ 166 (27) ^b	9,0	31 $\pm$ 4 (87) ^c	0,3	3028 $\pm$ 87 (22) ^a
9,0	869 $\pm$ 47 (32) ^b	18,0	209 $\pm$ 5 (78) ^c	18,0	557 $\pm$ 48 (40) ^b	18,0	11 $\pm$ 2 (96) ^c	0,5	3213 $\pm$ 643 (18) ^a
18,0	993 $\pm$ 78 (23) ^b	36,0	214 $\pm$ 20 (77) ^c	36,0	300 $\pm$ 30 (68) ^c	36,0	17 $\pm$ 3 (93) ^c	1,0	1048 $\pm$ 217 (73) ^c
AS (1,25x10 ⁻³)	1603 $\pm$ 21	AFB ₁ (1x10 ⁻³)	932 $\pm$ 114	NPD (1x10 ⁻²)	934 $\pm$ 272	BaP (5x10 ⁻⁴)	243 $\pm$ 18	MMC (5x10 ⁻⁴)	3697 $\pm$ 445
DMSO	177 $\pm$ 3	DMSO	226 $\pm$ 24	DMSO	24 $\pm$ 4	DMSO	22 $\pm$ 2	DMSO	352 $\pm$ 67
Sm + AS	Sm + AFB ₁	Sm + NPD	Sm + BaP	Sm + MMC					
1,2	973 $\pm$ 67 (39) ^b	1,2	369 $\pm$ 22 (60) ^c	1,2	1116 $\pm$ 73 ^a	1,2	60 $\pm$ 3 (73) ^c	1,2	3697 $\pm$ 445 ^a
2,3	1126 $\pm$ 254 (30) ^b	2,3	274 $\pm$ 23 (71) ^c	2,3	904 $\pm$ 115 (3) ^a	2,3	46 $\pm$ 8 (81) ^c	2,3	3130 $\pm$ 172 (13) ^a
4,7	1212 $\pm$ 253 (24) ^b	4,7	261 $\pm$ 28 (72) ^c	4,7	592 $\pm$ 17 (37) ^b	4,7	31 $\pm$ 6 (87) ^c	4,7	2890 $\pm$ 527 (20) ^a
9,4	866 $\pm$ 64 (46) ^c	9,4	270 $\pm$ 48 (71) ^c	9,4	419 $\pm$ 46 (55) ^c	9,4	23 $\pm$ 5 (91) ^c	9,4	1957 $\pm$ 464 (46) ^c

AS: azida sódica; NPD: 4-nitro-o-phenilenediamino; MMC: mitomicina C; AFB₁: aflatoxina B₁; BaP: benzo[a]pireno; I= porcentagem de inibição da mutagenicidade; DMSO= controle negativo (100 μ L/placa). a) sem efeito antimutagênico (< 25% de inibição); b) moderado efeito antimutagênico (25% - 40% de inibição); c) forte efeito antimutagênico (> 40% de inibição).

Tabela 4. Atividade antimutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa $\pm$ desvio padrão (DP) e índice de inibição (I%) dos extratos metanólicos de *Syngonanthus nitens* (Sn) e *S. suberosus* (Ss) nas linhagens TA100, TA98 e TA102 de *S. typhimurium* em ausência (-S9) e em presença de metabolização (+S9).

Revertentes de <i>Salmonella typhimurium</i> / placa $\pm$ DP (I%)									
TA100 mg/placa (-S9)	TA100 mg/placa (+S9)	TA98 mg/placa (-S9)	TA98 mg/placa (+S9)	TA102 mg/placa (-S9)	TA102 mg/placa (+S9)				
AS (1,25x10 ⁻³)	1281 $\pm$ 321	AFB ₁ (1x10 ⁻³)	932 $\pm$ 114	NPD (1x10 ⁻²)	934 $\pm$ 272	BaP (5x10 ⁻⁴)	100 $\pm$ 9	MMC (5x10 ⁻⁴)	3893 $\pm$ 801
DMSO	181 $\pm$ 22	DMSO	226 $\pm$ 24	DMSO	24 $\pm$ 4	DMSO	17 $\pm$ 3	DMSO	447 $\pm$ 19
Sn + AS	Sn + AFB ₁	Sn + NPD	Sn + BaP						
0,4	1073 $\pm$ 263 (16) ^a	0,8	362 $\pm$ 9 (61) ^c	2,2	1014 $\pm$ 264 ^a	0,8	26 $\pm$ 7 (74) ^c	0,3	2405 $\pm$ 968 (38) ^b
0,8	770 $\pm$ 99 (40) ^b	1,5	265 $\pm$ 19 (72) ^c	4,4	845 $\pm$ 144 (10) ^a	1,5	30 $\pm$ 4 (70) ^c	0,5	3850 $\pm$ 822 (1) ^a
1,5	1063 $\pm$ 83 (17) ^a	3,0	259 $\pm$ 19 (72) ^c	8,8	488 $\pm$ 42 (48) ^c	3,0	25 $\pm$ 4 (75) ^c	1,0	3611 $\pm$ 481 (7) ^a
3,0	971 $\pm$ 25 (24) ^a	6,0	235 $\pm$ 39 (75) ^c	17,5	376 $\pm$ 32 (60) ^c	6,0	20 $\pm$ 3 (80) ^c	2,0	2233 $\pm$ 175 (43) ^c
AS (1,25x10 ⁻³)	1603 $\pm$ 21	AFB ₁ (1x10 ⁻³)	932 $\pm$ 114	NPD (1x10 ⁻²)	934 $\pm$ 272	BaP (5x10 ⁻⁴)	243 $\pm$ 18	MMC (5x10 ⁻⁴)	3591 $\pm$ 962
DMSO	177 $\pm$ 3	DMSO	226 $\pm$ 24	DMSO	24 $\pm$ 4	DMSO	22 $\pm$ 2	DMSO	352 $\pm$ 67
Ss + AS	Ss + AFB ₁	Ss + NPD	Ss + BaP						
4,4	1011 $\pm$ 120 (37) ^b	4,4	394 $\pm$ 24 (58) ^c	4,4	823 $\pm$ 54 (12) ^a	4,4	66 $\pm$ 11 (73) ^c	2,2	2913 $\pm$ 903 (19) ^a
8,8	1148 $\pm$ 180 (28) ^b	8,8	347 $\pm$ 60 (63) ^c	8,8	870 $\pm$ 126 (7) ^a	8,8	53 $\pm$ 13 (78) ^c	4,4	2739 $\pm$ 42 (24) ^a
17,7	924 $\pm$ 63 (42) ^c	17,7	337 $\pm$ 63 (64) ^c	17,7	580 $\pm$ 86 (38) ^b	17,7	32 $\pm$ 6 (87) ^c	8,8	2329 $\pm$ 51 (35) ^b
-----	-----	35,4	292 $\pm$ 17 (69) ^c	35,4	433 $\pm$ 47 (54) ^c	35,4	26 $\pm$ 6 (89) ^c	17,7	1294 $\pm$ 195 (64) ^c

AS: azida sódica; NPD: 4-nitro-o-phenilenediamino; MMC: mitomicina C; AFB₁: aflatoxina B₁; BaP: benzo[a]pireno; I= porcentagem de inibição da mutagenicidade; DMSO= controle negativo (100 μ L/placa). a) sem efeito antimutagênico (< 25% de inibição); b) moderado efeito antimutagênico (25% - 40% de inibição); c) forte efeito antimutagênico (> 40% de inibição).

Tabela 5. Atividade mutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa $\pm$ desvio padrão e razão de mutagenicidade (RM) das substâncias isoladas, 1 a 8, e da mistura M (A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), nas linhagens TA100 e TA98 de *S. typhimurium* na presença de metabolização (+S9).

Revertentes de <i>Salmonella typhimurium</i> / placa $\pm$ DP (I%)					
Tratamento (μ g/placa)	TA100 (+S9 ^e)	TA98 (+S9 ^f)	Tratamento (μ g/placa)	TA100 (+S9 ^e)	TA98 (+S9 ^f)
<u>1</u>			<u>6</u>		
C-	163 $\pm$ 9	29 $\pm$ 0	C-	163 $\pm$ 9	29 $\pm$ 0
25,0	170 $\pm$ 7 (1,0)	31 $\pm$ 2 (1,1)	25,0	175 $\pm$ 28 (1,1)	33 $\pm$ 6 (1,1)
50,0	166 $\pm$ 16 (1,0)	21 $\pm$ 7 (0,7)	50,0	164 $\pm$ 2 (1,0)	33 $\pm$ 6 (1,1)
100,0	149 $\pm$ 6 (0,9)	17 $\pm$ 1 (0,6)	100,0	119 $\pm$ 4 (0,7)	21 $\pm$ 2 (0,7)
C+	1332 $\pm$ 55	230 $\pm$ 8	C+	1332 $\pm$ 55	230 $\pm$ 8
<u>2</u>			<u>7</u>		
C-	163 $\pm$ 9	29 $\pm$ 0	C-	163 $\pm$ 9	29 $\pm$ 0
25,0	168 $\pm$ 10 (1,0)	22 $\pm$ 2 (0,8)	25,0	168 $\pm$ 8 (1,0)	30 $\pm$ 2 (1,0)
50,0	190 $\pm$ 8 (1,2)	25 $\pm$ 4 (0,9)	50,0	168 $\pm$ 2 (1,0)	27 $\pm$ 3 (0,9)
100,0	146 $\pm$ 6 (0,9)	22 $\pm$ 6 (0,8)	100,0	139 $\pm$ 3 (0,9)	18 $\pm$ 11 (0,6)
C+	1332 $\pm$ 55	230 $\pm$ 8	C+	1332 $\pm$ 55	230 $\pm$ 8
<u>3</u>			<u>8</u>		
C-	163 $\pm$ 9	29 $\pm$ 0	C-	163 $\pm$ 9	29 $\pm$ 0
25,0	205 $\pm$ 1 (1,3)	33 $\pm$ 10 (1,1)	25,0	170 $\pm$ 6 (1,0)	28 $\pm$ 11 (1,0)
50,0	196 $\pm$ 9 (1,2)	29 $\pm$ 13 (1,0)	50,0	158 $\pm$ 21 (1,0)	24 $\pm$ 2 (0,8)
100,0	142 $\pm$ 32 (0,9)	22 $\pm$ 3 (0,8)	100,0	138 $\pm$ 19 (0,9)	33 $\pm$ 4 (1,1)
C+	1332 $\pm$ 55	230 $\pm$ 8	C+	1332 $\pm$ 55	230 $\pm$ 8
<u>4</u>			<u>M</u>		
C-	163 $\pm$ 9	29 $\pm$ 0	C-	163 $\pm$ 9	29 $\pm$ 0
25,0	197 $\pm$ 3 (1,2)	24 $\pm$ 1 (0,8)	25,0	186 $\pm$ 13 (1,1)	30 $\pm$ 5 (1,0)
50,0	189 $\pm$ 7 (1,2)	26 $\pm$ 0 (0,9)	50,0	174 $\pm$ 3 (1,1)	22 $\pm$ 3 (0,8)
100,0	166 $\pm$ 8 (1,0)	22 $\pm$ 6 (0,8)	100,0	143 $\pm$ 13 (0,9)	16 $\pm$ 4 (0,6)
C+	1332 $\pm$ 55	230 $\pm$ 8	C+	1332 $\pm$ 55	230 $\pm$ 8
<u>5</u>					
C-	163 $\pm$ 9	29 $\pm$ 0			
25,0	175 $\pm$ 20 (1,1)	28 $\pm$ 7 (1,0)			
50,0	186 $\pm$ 22 (1,1)	23 $\pm$ 5 (0,8)			
100,0	156 $\pm$ 7 (1,0)	19 $\pm$ 3 (0,7)			
C+	1332 $\pm$ 55	230 $\pm$ 8			

C-: controle negativo, DMSO (100 μ L por placa); C+: controles positivos: e) aflatoxina (1,0 μ g/placa), f) benzo[a]pireno (0,5 μ g/placa).

Tabela 6. Atividade antimutagênica expressa pelo número médio de revertentes/placa $\pm$ desvio padrão (DP) e índice de inibição (I%) das substâncias isoladas 1 a 8, e da mistura M (A-1,3,6-trihidrox-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidrox-2,5-dimetoxixantona), nas linhagens TA100 e TA98 de *S. typhimurium* na presença de metabolização (+S9).

Revertentes de <i>Salmonella typhimurium</i> / placa $\pm$ DP (I%)									
TA100 $\mu\text{g/placa}$ (+S9)		TA98 $\mu\text{g/placa}$ (+S9)		TA100 $\mu\text{g/placa}$ (+S9)		TA98 $\mu\text{g/placa}$ (+S9)			
AFB ₁ (1x10 ⁻³)		BaP (5x10 ⁻⁴)		AFB ₁ (1x10 ⁻³)		BaP (5x10 ⁻⁴)			
DMSO	1751 $\pm$ 137	180 $\pm$ 13	DMSO	316 $\pm$ 7	1751 $\pm$ 137	180 $\pm$ 13	DMSO	316 $\pm$ 7	
1 + AFB ₁		1 + BaP		24 $\pm$ 2		2 + BaP		24 $\pm$ 2	
12,5	1015 $\pm$ 94 (42) ^c	12,5	260 $\pm$ 16 (18) ^a	12,5	1258 $\pm$ 184 (28) ^b	12,5	307 $\pm$ 11 (3) ^a		
25,0	759 $\pm$ 62 (57) ^c	25,0	194 $\pm$ 3 (39) ^b	25,0	1142 $\pm$ 144 (35) ^b	25,0	298 $\pm$ 23 (6) ^a		
50,0	673 $\pm$ 27 (62) ^c	50,0	162 $\pm$ 31 (49) ^c	50,0	864 $\pm$ 210 (51) ^c	50,0	274 $\pm$ 40 (13) ^a		
AFB ₁ (1x10 ⁻³)		BaP (5x10 ⁻⁴)		AFB ₁ (1x10 ⁻³)		BaP (5x10 ⁻⁴)			
DMSO	1751 $\pm$ 137	180 $\pm$ 13	DMSO	316 $\pm$ 7	1751 $\pm$ 137	180 $\pm$ 13	DMSO	316 $\pm$ 7	
3 + AFB ₁		3 + BaP		24 $\pm$ 2		4 + BaP		24 $\pm$ 2	
12,5	1144 $\pm$ 209 (35) ^b	12,5	245 $\pm$ 32 (23) ^a	12,5	275 $\pm$ 1 (84) ^c	12,5	272 $\pm$ 21 (14) ^a		
25,0	891 $\pm$ 117 (49) ^c	25,0	209 $\pm$ 7 (34) ^b	25,0	250 $\pm$ 7 (86) ^c	25,0	273 $\pm$ 5 (14) ^a		
50,0	938 $\pm$ 181 (46) ^c	50,0	146 $\pm$ 5 (54) ^c	50,0	194 $\pm$ 5 (89) ^c	50,0	259 $\pm$ 28 (18) ^a		
AFB ₁ (1x10 ⁻³)		BaP (5x10 ⁻⁴)		AFB ₁ (1x10 ⁻³)		BaP (5x10 ⁻⁴)			
DMSO	1751 $\pm$ 137	180 $\pm$ 13	DMSO	316 $\pm$ 7	1751 $\pm$ 137	180 $\pm$ 13	DMSO	316 $\pm$ 7	
5 + AFB ₁		5 + BaP		24 $\pm$ 2		6 + BaP		24 $\pm$ 2	
12,5	562 $\pm$ 184 (68) ^c	12,5	342 $\pm$ 31 ^a	12,5	487 $\pm$ 92 (75) ^c	12,5	281 $\pm$ 26 (11) ^a		
25,0	549 $\pm$ 121 (69) ^c	25,0	304 $\pm$ 75 (4) ^a	25,0	598 $\pm$ 128 (66) ^c	25,0	277 $\pm$ 54 (12) ^a		
50,0	601 $\pm$ 123 (66) ^c	50,0	250 $\pm$ 19 (21) ^a	50,0	432 $\pm$ 5 (75) ^c	50,0	216 $\pm$ 6 (17) ^a		
AFB ₁ (1x10 ⁻³)		BaP (5x10 ⁻⁴)		AFB ₁ (1x10 ⁻³)		BaP (5x10 ⁻⁴)			
DMSO	1751 $\pm$ 137	180 $\pm$ 13	DMSO	316 $\pm$ 7	1751 $\pm$ 137	180 $\pm$ 13	DMSO	316 $\pm$ 7	
7 + AFB ₁		7 + BaP		24 $\pm$ 2		8 + BaP		24 $\pm$ 2	
12,5	438 $\pm$ 9 (75) ^c	12,5	266 $\pm$ 27 (16) ^a	12,5	447 $\pm$ 35 (75) ^c	12,5	273 $\pm$ 16 (14) ^a		
25,0	387 $\pm$ 74 (78) ^c	25,0	269 $\pm$ 40 (15) ^a	25,0	440 $\pm$ 15 (75) ^c	25,0	253 $\pm$ 34 (20) ^a		
50,0	269 $\pm$ 38 (85) ^c	50,0	218 $\pm$ 9 (31) ^b	50,0	461 $\pm$ 2 (74) ^c	50,0	257 $\pm$ 54 (19) ^a		
AFB ₁ (1x10 ⁻³)		BaP (5x10 ⁻⁴)		AFB ₁ (1x10 ⁻³)		BaP (5x10 ⁻⁴)			
DMSO	1751 $\pm$ 137	180 $\pm$ 13	DMSO	316 $\pm$ 7					
M + AFB ₁		M + BaP		24 $\pm$ 2					
12,5	1141 $\pm$ 197 (35) ^b	12,5	249 $\pm$ 8 (21) ^a						
25,0	1094 $\pm$ 23 (38) ^b	25,0	209 $\pm$ 5 (34) ^b						
50,0	787 $\pm$ 21 (55) ^c	50,0	175 $\pm$ 8 (45) ^c						

AS: azida sódica; NPD: 4-nitro-o-phenilenediamino; MMC: mitomicina C; AFB₁: aflatoxina B₁; BaP: benzo[a]pireno; I= porcentagem de inibição da mutagenicidade; DMSO= controle negativo (100 $\mu\text{L/placa}$). a) sem efeito antimutagênico (< 25% de inibição); b) moderado efeito antimutagênico (25% - 40% de inibição); c) forte efeito antimutagênico (> 40% de inibição).

4.3. Genotoxicidade

S. dealbatus (Sd) foi testado nas concentrações de 0,007 a 72,0 µg/mL; *S. macrolepis* (Sm), de 0,02 a 210,0 µg/mL; *S. nitens* (Sn), de 0,003 a 35,0 µg/mL e *S. suberosus* (Ss), de 0,07 a 710,0 µg/mL.

Foram realizados 2 experimentos independentes, todos em triplicata (Tabela 7), com 5 concentrações diferentes e os resultados obtidos mostram que, dentre os extratos, Sd, Sn e Ss, após 4 horas de tratamento, foram capazes de induzir dano significativo (média de 20,97; 17,03 e 13,60 em “% de DNA na cauda” e de 35,81; 24,68 e 17,93 no “*Tail Moment* – TM”, respectivamente) no DNA das células de hepatocarcinoma.

O extrato metanólico de Sm não apresentou resultados expressivos em nenhuma das concentrações testadas, em nenhum dos experimentos.

As concentrações testadas das substâncias isoladas 1, 2, 6, 7 e 8 variaram de 0,01 a 100,0 µg/mL; das isoladas 3, 4 e 5, e da mistura M, de 0,1 a 1000,0 µg/mL. De acordo com os dados dispostos na Tabela 8, podemos verificar que as substâncias 1 (luteolina) e 5 (7-metoxiluteolina-8-*c*-β-glicopiranosídeo) foram capazes de induzir dano significativo (média de 10,95 e 11,61 em “% de DNA na cauda” e de 21,32 e 16,87 no “*Tail Moment* – TM”, respectivamente) no DNA das células de hepatocarcinoma após 4 horas de tratamento.

Após 24 horas de tratamento, nenhum dos extratos, nem suas substâncias isoladas, foram capazes de induzir danos significantes.

Tabela 7. Valores médios da porcentagem de DNA na cauda (% DNA) e *Tail Moment* (TM) $\pm$ desvio padrão (DP) obtidos através do Teste do Cometa alcalino em células HepG2 tratadas por 4 e 24 horas com os extratos metanólicos de *S. dealbatus* (Sd), *S. macrolepsis* (Sm), *S. nitens* (Sn) e *S. suberosus* (Ss) e seus respectivos controles positivo e negativo.

Amostras ($\mu\text{g/mL}$)		% DNA $\pm$ DP		TM $\pm$ DP	
Sd		4h	24h	4h	24h
0,007	6,518 $\pm$ 0,022	6,252 $\pm$ 0,045	3,282 $\pm$ 0,032	2,564 $\pm$ 0,044	
0,07	20,97 $\pm$ 0,031*	10,63 $\pm$ 0,021	35,81 $\pm$ 0,013*	8,397 $\pm$ 0,045	
0,72	11,91 $\pm$ 0,076	5,066 $\pm$ 0,004	16,06 $\pm$ 0,101	1,465 $\pm$ 0,043	
7,2	7,661 $\pm$ 0,053	6,757 $\pm$ 0,040	18,25 $\pm$ 0,098	4,930 $\pm$ 0,056	
72,0	14,59 $\pm$ 0,078	6,405 $\pm$ 0,026	18,62 $\pm$ 0,056	2,625 $\pm$ 0,065	
C+	23,53 $\pm$ 0,131	16,83 $\pm$ 0,023	50,14 $\pm$ 0,075	47,35 $\pm$ 0,066	
C-	5,861 $\pm$ 0,034	5,188 $\pm$ 0,008	8,651 $\pm$ 0,033	2,326 $\pm$ 0,078	
Sm					
0,02	5,450 $\pm$ 0,027	5,118 $\pm$ 0,066	2,099 $\pm$ 0,066	4,877 $\pm$ 0,015	
0,21	6,989 $\pm$ 0,055	5,466 $\pm$ 0,074	2,403 $\pm$ 0,054	4,841 $\pm$ 0,013	
2,1	4,762 $\pm$ 0,063	3,806 $\pm$ 0,098	1,299 $\pm$ 0,031	1,304 $\pm$ 0,002	
21,0	4,126 $\pm$ 0,068	4,263 $\pm$ 0,087	1,488 $\pm$ 0,030	1,428 $\pm$ 0,021	
210,0	6,110 $\pm$ 0,059	4,303 $\pm$ 0,069	3,243 $\pm$ 0,027	1,056 $\pm$ 0,031	
C+	40,42 $\pm$ 0,178	35,98 $\pm$ 0,054	56,45 $\pm$ 0,064	34,97 $\pm$ 0,087	
C-	5,588 $\pm$ 0,013	4,567 $\pm$ 0,034	2,799 $\pm$ 0,028	2,067 $\pm$ 0,031	
Sn					
0,003	4,861 $\pm$ 0,041	4,778 $\pm$ 0,032	1,562 $\pm$ 0,017	2,183 $\pm$ 0,044	
0,03	6,518 $\pm$ 0,032	6,252 $\pm$ 0,052	3,282 $\pm$ 0,034	2,564 $\pm$ 0,067	
0,35	4,463 $\pm$ 0,027	4,894 $\pm$ 0,078	1,126 $\pm$ 0,023	0,881 $\pm$ 0,055	
3,5	12,35 $\pm$ 0,041	4,263 $\pm$ 0,075	20,61 $\pm$ 0,065	2,564 $\pm$ 0,056	
35,0	17,03 $\pm$ 0,056*	4,303 $\pm$ 0,086	24,68 $\pm$ 0,078*	8,397 $\pm$ 0,067	
C+	18,14 $\pm$ 0,035	17,90 $\pm$ 0,090	36,75 $\pm$ 0,105	23,56 $\pm$ 0,176	
C-	5,209 $\pm$ 0,009	5,321 $\pm$ 0,034	3,046 $\pm$ 0,022	5,433 $\pm$ 0,048	
Ss					
0,07	7,643 $\pm$ 0,067	4,646 $\pm$ 0,075	5,357 $\pm$ 0,066	1,873 $\pm$ 0,064	
0,71	13,60 $\pm$ 0,088*	5,167 $\pm$ 0,053	17,93 $\pm$ 0,098*	1,519 $\pm$ 0,043	
7,1	9,741 $\pm$ 0,050	5,995 $\pm$ 0,039	9,187 $\pm$ 0,056	1,276 $\pm$ 0,062	
71,0	4,463 $\pm$ 0,038	4,894 $\pm$ 0,089	1,126 $\pm$ 0,077	0,881 $\pm$ 0,028	
710,0	4,861 $\pm$ 0,061	4,778 $\pm$ 0,078	1,562 $\pm$ 0,034	2,183 $\pm$ 0,055	
C+	21,43 $\pm$ 0,121	23,87 $\pm$ 0,111	43,67 $\pm$ 0,145	34,90 $\pm$ 0,123	
C-	5,210 $\pm$ 0,044	4,384 $\pm$ 0,087	3,237 $\pm$ 0,079	0,896 $\pm$ 0,007	

C+: Controle positivo, MMS (metilmetanosulfonato) 6,25 μM / 1×10^5 células; C-: Controle negativo, DMSO (dimetilsulfóxido) 0,1 %. * $P < 0,05$.

Tabela 8. Valores médios da porcentagem de DNA na cauda (% DNA) e *Tail Moment* (TM) $\pm$ desvio padrão (DP) obtidos através do Teste do Cometa alcalino em células HepG2 tratadas por 4 e 24 horas com as substâncias isoladas, 1 a 8, e da mistura M (A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), e seus respectivos controles positivo e negativo.

Amostras ($\mu\text{g/mL}$)		% DNA $\pm$ DP		TM $\pm$ DP	
<u>1</u>		4h	24h	4h	24h
0,01	9,254 $\pm$ 0,098	2,874 $\pm$ 0,056	14,25 $\pm$ 0,066	2,965 $\pm$ 0,075	
0,1	10,95 $\pm$ 0,097*	4,325 $\pm$ 0,078	21,32 $\pm$ 0,144*	3,874 $\pm$ 0,063	
1,0	6,247 $\pm$ 0,086	4,256 $\pm$ 0,089	6,101 $\pm$ 0,056	3,568 $\pm$ 0,042	
10,0	4,895 $\pm$ 0,065	3,658 $\pm$ 0,054	3,478 $\pm$ 0,067	3,658 $\pm$ 0,039	
100,0	5,695 $\pm$ 0,077	3,145 $\pm$ 0,041	3,652 $\pm$ 0,055	2,247 $\pm$ 0,036	
C+	40,95 $\pm$ 0,156	22,65 $\pm$ 0,101	63,12 $\pm$ 0,176	48,17 $\pm$ 0,201	
C-	3,877 $\pm$ 0,043	3,581 $\pm$ 0,047	4,110 $\pm$ 0,066	4,231 $\pm$ 0,098	
<u>2</u>					
0,01	5,669 $\pm$ 0,074	4,589 $\pm$ 0,087	3,365 $\pm$ 0,084	2,854 $\pm$ 0,068	
0,1	5,784 $\pm$ 0,066	5,101 $\pm$ 0,056	2,989 $\pm$ 0,065	2,487 $\pm$ 0,037	
1,0	4,889 $\pm$ 0,065	3,998 $\pm$ 0,055	2,774 $\pm$ 0,035	3,102 $\pm$ 0,031	
10,0	6,202 $\pm$ 0,077	4,357 $\pm$ 0,053	3,578 $\pm$ 0,077	3,698 $\pm$ 0,042	
100,0	7,658 $\pm$ 0,045	6,554 $\pm$ 0,065	4,109 $\pm$ 0,056	3,492 $\pm$ 0,057	
C+	62,15 $\pm$ 0,424	71,25 $\pm$ 0,576	64,12 $\pm$ 0,482	65,89 $\pm$ 0,466	
C-	5,222 $\pm$ 0,045	4,998 $\pm$ 0,062	5,101 $\pm$ 0,043	5,475 $\pm$ 0,056	
<u>3</u>					
0,1	4,254 $\pm$ 0,066	3,168 $\pm$ 0,055	1,549 $\pm$ 0,067	1,647 $\pm$ 0,077	
1,0	3,555 $\pm$ 0,071	3,125 $\pm$ 0,048	1,852 $\pm$ 0,074	1,741 $\pm$ 0,034	
10,0	5,999 $\pm$ 0,067	4,268 $\pm$ 0,078	2,558 $\pm$ 0,044	2,454 $\pm$ 0,032	
100,0	4,265 $\pm$ 0,054	3,154 $\pm$ 0,045	2,854 $\pm$ 0,087	2,415 $\pm$ 0,086	
1000,0	4,358 $\pm$ 0,062	4,012 $\pm$ 0,074	3,014 $\pm$ 0,089	2,854 $\pm$ 0,067	
C+	72,44 $\pm$ 0,523	65,25 $\pm$ 0,454	67,52 $\pm$ 0,598	59,84 $\pm$ 0,288	
C-	4,646 $\pm$ 0,087	3,282 $\pm$ 0,045	1,625 $\pm$ 0,021	2,114 $\pm$ 0,066	
<u>4</u>					
0,1	4,126 $\pm$ 0,063	4,263 $\pm$ 0,074	1,488 $\pm$ 0,066	1,428 $\pm$ 0,023	
1,0	4,889 $\pm$ 0,055	3,998 $\pm$ 0,034	2,774 $\pm$ 0,054	3,102 $\pm$ 0,043	
10,0	5,999 $\pm$ 0,035	4,268 $\pm$ 0,066	2,558 $\pm$ 0,034	2,454 $\pm$ 0,029	
100,0	6,518 $\pm$ 0,067	6,252 $\pm$ 0,039	3,282 $\pm$ 0,065	2,564 $\pm$ 0,066	
1000,0	7,643 $\pm$ 0,073	5,167 $\pm$ 0,061	2,099 $\pm$ 0,087	2,183 $\pm$ 0,065	
C+	68,26 $\pm$ 0,576	58,14 $\pm$ 0,455	62,12 $\pm$ 0,387	71,11 $\pm$ 0,573	
C-	5,450 $\pm$ 0,034	4,894 $\pm$ 0,007	2,403 $\pm$ 0,091	1,985 $\pm$ 0,055	
<u>5</u>					
0,1	8,985 $\pm$ 0,033	5,247 $\pm$ 0,065	12,68 $\pm$ 0,033	2,267 $\pm$ 0,045	
1,0	10,58 $\pm$ 0,092	3,658 $\pm$ 0,088	15,48 $\pm$ 0,065	2,542 $\pm$ 0,032	
10,0	11,61 $\pm$ 0,078*	3,985 $\pm$ 0,045	16,87 $\pm$ 0,046*	2,333 $\pm$ 0,087	
100,0	5,487 $\pm$ 0,069	3,167 $\pm$ 0,071	2,114 $\pm$ 0,076	2,547 $\pm$ 0,101	
1000,0	6,142 $\pm$ 0,054	2,514 $\pm$ 0,023	1,958 $\pm$ 0,098	2,055 $\pm$ 0,045	
C+	61,58 $\pm$ 0,477	57,35 $\pm$ 0,621	74,83 $\pm$ 0,476	72,48 $\pm$ 0,632	
C-	4,889 $\pm$ 0,067	3,998 $\pm$ 0,032	2,774 $\pm$ 0,043	3,102 $\pm$ 0,062	
<u>6</u>					
0,01	4,463 $\pm$ 0,055	4,894 $\pm$ 0,067	1,126 $\pm$ 0,051	0,881 $\pm$ 0,073	

0,1	4,646 ± 0,076	3,282 ± 0,098	1,625 ± 0,052	2,114 ± 0,081
1,0	4,126 ± 0,065	4,263 ± 0,071	1,488 ± 0,055	1,428 ± 0,054
10,0	5,450 ± 0,043	5,118 ± 0,052	2,099 ± 0,058	4,877 ± 0,032
100,0	5,214 ± 0,067	4,894 ± 0,047	2,403 ± 0,057	1,985 ± 0,021
C+	67,65 ± 0,543	66,48 ± 0,333	78,21 ± 0,764	77,54 ± 0,441
C-	5,999 ± 0,076	4,268 ± 0,058	2,558 ± 0,064	2,454 ± 0,066

7				
0,01	4,463 ± 0,068	4,894 ± 0,098	1,126 ± 0,033	0,881 ± 0,066
0,1	3,555 ± 0,098	3,125 ± 0,055	1,852 ± 0,078	1,741 ± 0,087
1,0	4,895 ± 0,074	3,658 ± 0,081	3,478 ± 0,074	3,658 ± 0,034
10,0	4,889 ± 0,056	3,972 ± 0,073	2,774 ± 0,087	3,102 ± 0,056
100,0	4,126 ± 0,052	4,263 ± 0,065	1,488 ± 0,031	1,428 ± 0,029
C+	69,55 ± 0,498	71,22 ± 0,672	65,35 ± 0,423	62,89 ± 0,598
C-	4,126 ± 0,077	4,263 ± 0,054	1,488 ± 0,055	1,428 ± 0,077

8				
0,01	4,265 ± 0,073	3,154 ± 0,034	2,854 ± 0,087	2,415 ± 0,023
0,1	5,487 ± 0,067	3,225 ± 0,035	2,114 ± 0,056	2,547 ± 0,045
1,0	5,701 ± 0,043	5,101 ± 0,022	2,989 ± 0,061	2,487 ± 0,043
10,0	6,247 ± 0,026	4,256 ± 0,034	6,101 ± 0,082	3,568 ± 0,021
100,0	5,925 ± 0,038	4,268 ± 0,087	2,543 ± 0,074	2,454 ± 0,034
C+	62,45 ± 0,571	68,22 ± 0,281	72,54 ± 0,727	77,23 ± 0,339
C-	4,265 ± 0,076	3,154 ± 0,043	2,854 ± 0,087	2,415 ± 0,064

M				
0,1	6,254 ± 0,065	5,784 ± 0,052	2,589 ± 0,051	3,221 ± 0,046
1,0	4,861 ± 0,050	4,894 ± 0,034	1,519 ± 0,073	1,873 ± 0,087
10,0	4,646 ± 0,098	3,282 ± 0,029	1,625 ± 0,041	2,114 ± 0,028
100,0	7,643 ± 0,087	5,167 ± 0,078	2,099 ± 0,052	2,183 ± 0,076
1000,0	5,450 ± 0,063	4,894 ± 0,088	2,403 ± 0,065	1,985 ± 0,028
C+	61,87 ± 0,225	56,18 ± 0,309	47,95 ± 0,320	72,12 ± 0,471
C-	5,123 ± 0,087	4,623 ± 0,054	4,785 ± 0,067	4,833 ± 0,002

C+: Controle positivo, MMS (metilmetanosulfonato) 6,25 µM/ 1x10⁵ células; C-: Controle negativo, DMSO (dimetilsulfóxido) 0,1 %. * P < 0,05.

4.4. Antigenotoxicidade

Foram realizados 2 experimentos independentes, todos em triplicata, com 5 concentrações diferentes e os resultados obtidos mostram que, foram capazes de diminuir significativamente o dano causado pelo MMS após 30 minutos de tratamento simultâneo, em mais de uma de suas concentrações testadas, os extratos Sm, Sn, Ss e as isoladas 3 e 6, e a mistura M. As isoladas 4, 5 e 7 também diminuiram significativamente os danos causados pelo MMS, mas apenas em uma de suas concentrações testadas.

De acordo com a Tabela 9, podemos observar que Sm alcançou o maior índice de inibição na concentração de 21,0 µg/mL, quando diminuiu os danos causados pelo MMS em 27,0%. Sn, na concentração de 350,0 µg/mL, diminuiu 43,0% do dano. Ss, na concentração de 710,0 µg/mL, diminuiu 17,5% do dano.

Os maiores índices de inibição alcançados pelas substâncias isoladas, e pela mistura M, quando incubadas por 30 minutos com o MMS, estão dispostos na Tabela 10 e verificou-se que esses foram de 31,0% para a substância 3, na menor concentração testada (0,003 µg/mL); 29,3% para 4, na maior concentração testada (25,0 µg/mL); 18,0% para 5, na concentração de 2,5 µg/mL; 21,8% para 6, também na concentração de 2,5 µg/mL; de 20,2% para 7, na mesma concentração de 2,5 µg/mL e 22,1% para a mistura M, na concentração de 0,25 µg/mL.

Já para o pós-tratamento de 4 horas (Tabela 11), foi verificado que nenhum dos extratos foi considerado antigenotóxico, não alcançando níveis significativos de inibição do dano causado pelo MMS.

De acordo com a Tabela 12, pode-se verificar que, dentre as isoladas, houve uma diminuição significativa dos danos causados pelo MMS apenas para 1, em mais de uma concentração testada (33,8%, na concentração de 2,5 µg/mL e 26,8%, na concentração de 0,03 µg/mL), e para 2, em apenas uma concentração testada (23,5%, na concentração de 0,03 µg/mL).

Tabela 9. Valores médios da porcentagem de DNA na cauda (% DNA), *Tail Moment* (TM) $\pm$ desvio padrão (DP) e porcentagem de inibição (% I) obtidos através do Teste do Cometa alcalino em células HepG2 **co-tratadas por 30 minutos** com os extratos metanólicos de *S. dealbatus* (Sd), *S. macrolophsis* (Sm), *S. nitens* (Sn) e *S. suberosus* (Ss), adicionados de metilmetanosulfonato (MMS), e seus respectivos controles positivo e negativo.

Amostra ($\mu\text{g/mL}$) + MMS 4,7 μM	%DNA $\pm$ DP	TM $\pm$ DP	% I	Amostra ($\mu\text{g/mL}$) + MMS 4,7 μM	%DNA $\pm$ DP	TM $\pm$ DP	% I
Sd							
0,04	62,02 $\pm$ 5,012	168,2 $\pm$ 27,52	-	0,21	48,32 $\pm$ 7,871*	136,09 $\pm$ 17,3*	22,4
0,36	66,82 $\pm$ 4,485	158,5 $\pm$ 22,84	-	2,1	54,89 $\pm$ 6,576*	144,21 $\pm$ 20,7*	11,8
3,6	66,15 $\pm$ 2,472	166,9 $\pm$ 18,66	-	21,0	45,40 $\pm$ 2,912*	133,39 $\pm$ 11,2*	27,0
36,0	63,99 $\pm$ 9,497	163,7 $\pm$ 19,47	-	210,0	53,66 $\pm$ 3,454*	142,65 $\pm$ 12,8*	13,8
360,0	62,77 $\pm$ 5,675	172,4 $\pm$ 15,63	-	2100,0	60,32 $\pm$ 2,871	153,23 $\pm$ 17,67	-
C-	6,064 $\pm$ 0,667	0,442 $\pm$ 0,091	-	C-	6,365 $\pm$ 0,879	7,008 $\pm$ 0,956	-
C+	61,04 $\pm$ 4,481	165,5 $\pm$ 12,79	-	C+	62,24 $\pm$ 5,667	157,9 $\pm$ 17,22	-
Sn							
0,35	81,48 $\pm$ 6,855	222,5 $\pm$ 21,87	-	0,7	81,09 $\pm$ 9,912*	249,3 $\pm$ 14,21*	11,3
3,5	66,28 $\pm$ 4,943*	179,7 $\pm$ 10,63*	22,7	7,1	82,34 $\pm$ 4,832*	182,5 $\pm$ 13,49*	9,9
35,0	63,22 $\pm$ 7,634*	187,5 $\pm$ 15,95*	26,3	71,0	79,93 $\pm$ 8,437*	180,1 $\pm$ 11,85*	12,6
350,0	48,81 $\pm$ 2,952**	158,3 $\pm$ 13,62**	43,0	710,0	75,41 $\pm$ 9,823*	172,7 $\pm$ 13,54*	17,5
3500,0	83,58 $\pm$ 4,532	229,6 $\pm$ 12,86	-	7100,0	82,63 $\pm$ 5,624*	256,2 $\pm$ 15,21*	9,6
C-	5,876 $\pm$ 0,598	6,385 $\pm$ 1,732	-	C-	4,381 $\pm$ 0,864	7,261 $\pm$ 0,973	-
C+	85,76 $\pm$ 6,734	231,7 $\pm$ 19,43	-	C+	91,43 $\pm$ 12,39	255,9 $\pm$ 16,31	-
Ss							

C+: Controle positivo, MMS (metilmetanosulfonato) 4,7 μM / 1×10^5 células; C-: Controle negativo, DMSO (dimetilsulfóxido) 0,1 %. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Tabela 10. Valores médios da porcentagem de DNA na cauda (% DNA), *Tail Moment* (TM) $\pm$ desvio padrão (DP) e porcentagem de inibição (% I) obtidos através do Teste do Cometa alcalino em células HepG2 **tratadas por 4 horas** com os extratos metanólicos de *S. dealbatus* (Sd), *S. macrolepsis* (Sm), *S. nitens* (Sn) e *S. suberosus* (Ss), adicionados após 30 minutos de tratamento com metilmetanosulfonato (MMS), e seus respectivos controles positivo e negativo.

Amostra ($\mu\text{g/mL}$) + MMS 4,7 μM	%DNA $\pm$ DP	TM $\pm$ DP	% I	Amostra ($\mu\text{g/mL}$) + MMS 4,7 μM	%DNA $\pm$ DP	TM $\pm$ DP	% I
Sd				Sm			
0,04	89,23 $\pm$ 10,36	243,9 $\pm$ 30,02	-	0,21	78,65 $\pm$ 3,948	186,4 $\pm$ 17,75	-
0,36	81,31 $\pm$ 2,872	239,5 $\pm$ 16,76	-	2,1	74,45 $\pm$ 8,369	184,3 $\pm$ 19,36	-
3,6	82,31 $\pm$ 8,051	251,3 $\pm$ 12,09	-	21,0	75,40 $\pm$ 2,922	189,5 $\pm$ 17,65	-
36,0	87,15 $\pm$ 7,254	248,7 $\pm$ 9,321	-	210,0	70,63 $\pm$ 4,982	176,4 $\pm$ 9,602	-
360,0	85,52 $\pm$ 7,444	261,4 $\pm$ 21,34	-	2100,0	72,32 $\pm$ 9,767	180,2 $\pm$ 12,45	-
C -	6,969 $\pm$ 0,255	0,868 $\pm$ 0,330	-	C -	3,620 $\pm$ 0,501	3,287 $\pm$ 0,265	-
C +	88,74 $\pm$ 5,957	258,9 $\pm$ 33,87	-	C +	74,25 $\pm$ 10,23	186,3 $\pm$ 25,72	-
Sn				Ss			
0,02	64,39 $\pm$ 4,824	162,4 $\pm$ 15,43	-	0,04	71,82 $\pm$ 6,524	194,2 $\pm$ 18,27	-
0,18	62,85 $\pm$ 4,393	149,7 $\pm$ 10,63	-	0,36	72,67 $\pm$ 8,322	192,5 $\pm$ 23,76	-
1,75	63,67 $\pm$ 8,691	157,4 $\pm$ 13,68	-	3,55	77,54 $\pm$ 3,947	190,7 $\pm$ 21,47	-
17,5	68,32 $\pm$ 5,650	154,8 $\pm$ 12,87	-	35,5	75,92 $\pm$ 3,648	197,4 $\pm$ 13,61	-
175,0	63,71 $\pm$ 8,322	169,3 $\pm$ 30,32	-	355,0	72,63 $\pm$ 8,532	196,6 $\pm$ 16,82	-
C -	4,287 $\pm$ 1,765	5,281 $\pm$ 0,339	-	C -	3,279 $\pm$ 0,218	8,982 $\pm$ 2,271	-
C +	62,44 $\pm$ 2,876	159,9 $\pm$ 12,49	-	C +	71,87 $\pm$ 3,762	192,4 $\pm$ 36,97	-

C+: Controle positivo, MMS (metilmetanosulfonato) 4,7 μM / 1x10⁵ células; C-: Controle negativo, DMSO (dimetilsulfóxido) 0,1 %.

Tabela 11. Valores médios da porcentagem de DNA na cauda (% DNA), *Tail Moment* (TM) $\pm$ desvio padrão (DP) e porcentagem de inibição (% I) obtidos através do Teste do Cometa alcalino em células HepG2 **co-tratadas por 30 minutos** com as substâncias isoladas 1 a 8, e da mistura M (A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), adicionados de metilmetanosulfonato (MMS), e seus respectivos controles positivo e negativo.

Amostra (μg/mL) + MMS 4,7μM		Amostra (μg/mL) + MMS 4,7μM			Amostra (μg/mL) + MMS 4,7μM					
%DNA + DP	TM + DP	% I	(μg/mL) + MMS 4,7μM	%DNA + DP	TM + DP	% I	(μg/mL) + MMS 4,7μM	%DNA + DP	TM + DP	% I
1										
0,05	49,78 ± 7,622	143,5 ± 25,34	-	0,003	58,73 ± 4,955	161,5 ± 13,69	-	0,003	41,78 ± 3,485*	171,1 ± 11,87*
0,5	41,32 ± 8,328	139,7 ± 26,43	-	0,03	64,71 ± 10,32	154,7 ± 16,44	-	0,03	62,99 ± 9,244	167,5 ± 18,45
5,0	42,57 ± 8,761	135,4 ± 21,74	-	0,25	62,50 ± 3,589	158,3 ± 21,77	-	0,25	43,27 ± 8,614*	172,4 ± 11,64*
50,0	47,89 ± 2,689	134,8 ± 19,98	-	2,5	53,57 ± 4,862	162,6 ± 19,21	-	2,5	48,56 ± 7,320*	164,8 ± 15,32*
500,0	45,52 ± 3,762	136,6 ± 22,08	-	25,0	57,22 ± 9,634	158,5 ± 7,982	-	25,0	63,67 ± 8,291	179,8 ± 28,27
C -	2,762 ± 0,963	1,276 ± 0,945	-	C -	3,620 ± 0,422	1,763 ± 0,333	-	C -	7,858 ± 1,233	3,276 ± 1,039
C +	45,23 ± 9,321	138,6 ± 17,76	-	C +	56,23 ± 2,639	159,2 ± 36,45	-	C +	60,52 ± 3,720	183,3 ± 21,62
4										
5										
0,003	80,63 ± 8,259	234,2 ± 15,69	-	0,003	71,32 ± 9,826	224,2 ± 11,82	-	0,003	69,23 ± 7,582	205,9 ± 21,02
0,03	69,13 ± 6,367	222,5 ± 16,72	-	0,03	69,27 ± 2,464	212,3 ± 23,43	-	0,03	54,31 ± 8,372*	188,5 ± 9,208*
0,25	71,67 ± 9,348	231,9 ± 23,61	-	0,25	67,23 ± 2,876	215,7 ± 18,92	-	0,25	63,73 ± 8,792	179,3 ± 10,12
2,5	77,36 ± 3,422	217,6 ± 17,93	-	2,5	58,92 ± 7,248*	199,3 ± 10,56*	18,0	2,5	53,15 ± 2,569*	181,7 ± 13,72*
25,0	52,74 ± 8,592*	193,7 ± 6,782*	29,3	25,0	71,91 ± 1,902	222,8 ± 14,52	-	25,0	55,52 ± 9,283*	177,4 ± 12,93*
C -	7,728 ± 0,932	2,684 ± 0,472	-	C -	6,239 ± 0,799	3,726 ± 0,727	-	C -	8,122 ± 1,632	4,481 ± 1,271
C +	74,56 ± 3,724	226,7 ± 28,47	-	C +	71,87 ± 3,862	216,4 ± 26,44	-	C +	67,98 ± 3,562	198,9 ± 28,49
7										
8										
0,003	69,34 ± 8,947	173,4 ± 26,27	-	0,003	59,39 ± 7,202	171,1 ± 18,63	-	0,003	68,56 ± 8,348*	201,3 ± 15,89*
0,03	61,77 ± 8,236	179,3 ± 5,398	-	0,03	62,77 ± 5,273	169,2 ± 23,83	-	0,03	78,72 ± 8,932	212,4 ± 31,82
0,25	60,74 ± 4,273	175,3 ± 6,728	-	0,25	52,82 ± 3,208	166,4 ± 12,37	-	0,25	65,71 ± 9,587*	198,2 ± 12,32*
2,5	50,21 ± 3,925*	149,9 ± 8,664*	20,2	2,5	57,31 ± 6,730	168,4 ± 19,71	-	2,5	79,93 ± 4,673	227,6 ± 17,28
25,0	65,38 ± 4,286	171,4 ± 21,34	-	25,0	55,38 ± 5,276	167,3 ± 17,63	-	25,0	82,45 ± 7,489	238,3 ± 13,79
C -	5,391 ± 0,811	4,844 ± 1,723	-	C -	9,842 ± 1,763	4,730 ± 1,834	-	C -	9,629 ± 2,762	8,672 ± 1,642
C +	62,92 ± 8,438	173,5 ± 28,62	-	C +	52,69 ± 6,734	163,3 ± 26,28	-	C +	84,33 ± 5,835	235,7 ± 35,86

C+: Controle positivo, MMS (metilmetanosulfonato) 4,7 μM / 1×10^5 células; C-: Controle negativo, DMSO (dimetilsulfóxido) 0,1 %. * $P < 0,05$.

Tabela 12. Valores médios da porcentagem de DNA na cauda (% DNA), *Tail Moment* (TM) $\pm$ desvio padrão (DP) e porcentagem de inibição (% I) obtidos através do Teste do Cometa alcalino em células HepG2 **tratadas por 4 horas** com as substâncias isoladas 1 a 8, e da mistura M (A-1,3,6-trihidrox-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidrox-2,5-dimetoxixantona), adicionados após 30 minutos de tratamento com metilmetanosulfonato (MMS), e seus respectivos controles positivo e negativo.

Amostra ($\mu\text{g/mL}$) + MMS 4,7 μM	Amostra				Amostra			
	% I	TM $\pm$ DP	% I	($\mu\text{g/mL}$) + MMS 4,7 μM	% I	TM $\pm$ DP	% I	($\mu\text{g/mL}$) + MMS 4,7 μM
<u>1</u>	<u>2</u>				<u>3</u>			
0,003	-	0,003	50,88 $\pm$ 5,382	133,5 $\pm$ 18,49	-	0,003	56,84 $\pm$ 7,524	156,6 $\pm$ 18,89
0,03	26,4	0,03	36,98 $\pm$ 7,925*	114,6 $\pm$ 9,775*	23,5	0,03	61,85 $\pm$ 9,023	169,3 $\pm$ 16,82
0,25	-	0,25	53,71 $\pm$ 1,560	145,5 $\pm$ 21,36	-	0,25	60,37 $\pm$ 1,962	157,4 $\pm$ 9,912
2,5	33,8	2,5	42,39 $\pm$ 9,236	137,8 $\pm$ 14,82	-	2,5	58,73 $\pm$ 1,398	164,6 $\pm$ 21,91
25,0	-	25,0	51,47 $\pm$ 3,928	140,8 $\pm$ 22,47	-	25,0	55,28 $\pm$ 1,967	155,3 $\pm$ 20,73
C -	-	C -	6,744 $\pm$ 0,281	2,481 $\pm$ 0,192	-	C -	6,872 $\pm$ 1,223	8,368 $\pm$ 1,216
C +	-	C +	48,33 $\pm$ 5,539	133,7 $\pm$ 27,62	-	C +	52,71 $\pm$ 5,312	162,9 $\pm$ 18,83
<u>4</u>	<u>5</u>				<u>6</u>			
0,003	-	0,003	56,32 $\pm$ 3,867	144,2 $\pm$ 18,57	-	0,003	69,23 $\pm$ 9,272	233,2 $\pm$ 11,08
0,03	-	0,03	52,67 $\pm$ 8,322	142,5 $\pm$ 19,76	-	0,03	71,58 $\pm$ 2,764	239,8 $\pm$ 9,260
0,25	-	0,25	57,54 $\pm$ 9,473	140,7 $\pm$ 18,52	-	0,25	72,89 $\pm$ 8,282	241,9 $\pm$ 17,02
2,5	-	2,5	55,92 $\pm$ 1,786	147,4 $\pm$ 15,12	-	2,5	77,45 $\pm$ 2,287	238,7 $\pm$ 12,14
25,0	-	25,0	52,63 $\pm$ 3,654	146,5 $\pm$ 16,43	-	25,0	70,23 $\pm$ 7,363	231,5 $\pm$ 14,93
C -	-	C -	8,921 $\pm$ 1,345	2,763 $\pm$ 0,638	-	C -	5,232 $\pm$ 0,838	4,283 $\pm$ 0,501
C +	-	C +	58,24 $\pm$ 2,473	141,7 $\pm$ 21,39	-	C +	72,74 $\pm$ 1,948	234,6 $\pm$ 22,18
<u>7</u>	<u>8</u>				<u>M</u>			
0,003	-	0,003	69,49 $\pm$ 7,326	213,7 $\pm$ 22,48	-	0,003	72,38 $\pm$ 6,336	198,3 $\pm$ 27,49
0,03	-	0,03	63,57 $\pm$ 3,485	209,3 $\pm$ 21,73	-	0,03	64,38 $\pm$ 7,249	194,6 $\pm$ 15,26
0,25	-	0,25	62,41 $\pm$ 6,824	219,6 $\pm$ 18,83	-	0,25	65,53 $\pm$ 8,162	189,2 $\pm$ 27,42
2,5	-	2,5	67,35 $\pm$ 5,729	228,4 $\pm$ 16,49	-	2,5	70,48 $\pm$ 3,475	197,5 $\pm$ 19,23
25,0	-	25,0	65,38 $\pm$ 3,382	211,6 $\pm$ 17,37	-	25,0	62,89 $\pm$ 7,223	190,9 $\pm$ 25,72
C -	-	C -	6,324 $\pm$ 0,663	10,83 $\pm$ 1,836	-	C -	5,283 $\pm$ 1,371	1,273 $\pm$ 0,666
C +	-	C +	61,99 $\pm$ 8,924	206,3 $\pm$ 28,34	-	C +	69,21 $\pm$ 6,212	201,6 $\pm$ 35,82

C+: Controle positivo, MMS (metilmetanosulfonato) 4,7 μM / 1x10⁵ células; C-: Controle negativo, DMSO (dimetilsulfóxido) 0,1 %. * P < 0,05.

4.5. Citotoxicidade

4.5.1. Células HepG2

S. dealbatus (Sd) foi testado nas concentrações de 0,72 a 7200,0 µg/mL; *S. macrolepis* (Sm), de 0,21 a 2100,0 µg/mL; *S. nitens* (Sn), de 0,35 a 3500,0 µg/mL e *S. suberosus* (Ss), de 0,71 a 7100,0 µg/mL.

Foram realizados 3 experimentos independentes, todos em triplicata (Tabela 13), com 5 concentrações diferentes e foi verificado que Sd e Sn obtiveram resultados menores que 80% de viabilidade celular, ou seja, causaram morte celular significativa, em relação ao controle negativo, e esses valores foram verificados principalmente nas maiores concentrações testadas (7200,0 µg/mL, para Sd e 350 e 3500,0 µg/mL, para Sn). Pode-se observar que Sd e Sn obtiveram os resultados mais expressivos, ou seja, apresentaram uma capacidade de causar morte celular maior, alcançando 46,1% e 58,8%, respectivamente.

Já Sm e Ss não apresentaram resultados expressivos em nenhuma das concentrações testadas, em nenhum dos experimentos, e não causaram morte celular significativa.

As concentrações testadas de todas as substâncias isoladas, e da mistura M, variaram de 0,01 a 100,0 µg/mL. De acordo com os dados dispostos na Tabela 14, podemos verificar que as substâncias isoladas 3 (1,3,6,8-tetrahidroxi-2,5-dimetoxixantona) e 4 (1,3,6,8-tetrahidroxi-5-metoxixantona) e a mistura M (A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), são as que apresentaram maior potencial citotóxico dentre as substâncias isoladas, e verificou-se que essas causaram a morte de 49,6%, 51,8% e 55,4%, respectivamente, das células presentes nos poços em que a sua maior concentração (100,0 µg/mL) foi utilizada.

Os valores de IC₅₀ foram dispostos na Tabela 15 e verificou-se que os valores de 7800,0 e 750,0 µg/mL foram encontrados para os extratos Sd e Sn e para as xantonas 3 e 4, e

para a mistura M, os valores de 100,0; 93,0 e 90,0 µg/mL foram, respectivamente, verificados.

As xantonas 3 e 4, e a mistura M, foram isoladas somente do extrato metanólico dos capítulos de *S. nitens*. Esses dados corroboram os encontrados nos experimentos realizados com os extratos, dispostos na Tabela 13, onde o Sn foi citotóxico.

4.5.2. Células MCF-7/BUS

Os dados da avaliação da citotoxicidade causada pelos extratos Sd, Sm, Sn e Ss, bem como de suas substâncias isoladas, 1 a 8, e de sua mistura M, após 24 e 144 horas, nas células MCF-7/BUS, foram dispostos nas Tabelas 16 e 17, respectivamente.

Foram realizados 3 experimentos independentes, todos em triplicata. Nos experimentos com 24 e 144 horas, Sd foi testado nas concentrações de 8,9 a 720,0 µg/mL; Sm, nas concentrações de 2,6 a 210,0 µg/mL; Sn, nas concentrações de 4,3 a 350,0 µg/mL e Ss, nas concentrações de 8,8 a 710,0 µg/mL. As substâncias isoladas e a mistura M foram testados nas concentrações de 4,1 a 1000,0 µg/mL.

De acordo com os dados, pode-se observar que, dentre os extratos, Sd, Sm e Sn induziram morte celular acima de 20% em pelo menos uma de suas concentrações testadas. As maiores taxas de morte das células de carcinoma mamário, em relação ao controle de meio, foram encontradas nas maiores concentrações testadas desses extratos, nos ensaios de 24 horas. Sd inibiu 34,3%, na concentração de 720,0 µg/mL; Sm, 23,2%, na concentração de 70,0 µg/mL; Sn, 21,0%, na concentração de 116,7 µg/mL. O extrato Ss não foi capaz de causar a morte das células MCF-7/BUS acima de 20% em nenhuma de suas concentrações testadas. Nos ensaios de 144 horas, todos os extratos foram capazes de causar a morte das células MCF-7/BUS acima de 20%. Sd inibiu em 52,7%, na concentração de 240,0 µg/mL;

Sm, 49,8%, na concentração de 210,0 µg/mL; Sn, 55,5%, na concentração de 116,7 µg/mL e Ss, 43,4%, na concentração de 710,0 µg/mL.

Dentre as substâncias isoladas e a mistura M, pode-se observar que em 24 horas de tratamento as substâncias 2-5 e 8, e a mistura M, causaram 27,1%, 20,9%, 26,5%, 26,3%, 20,2% e 34,5% de morte celular, respectivamente. As substâncias 1 e 6 não foram capazes de induzir morte celular acima de 20% e não foram consideradas citotóxicas. Já nos ensaios com 144 horas de tratamento, todas as substâncias isoladas foram capazes de induzir morte celular acima de 20%.

Na Tabela 20, estão dispostos os IC₅₀ dos extratos e substâncias isoladas testados frente às células de MCF-7/BUS. Foi verificado que nenhuma das amostras testadas apresentou IC₅₀ abaixo de 100 µg/mL, nem no tratamento de 24, nem no de 144 horas.

Tabela 13. Média da porcentagem de morte celular $\pm$ desvio padrão (DP) encontrados na linhagem de HepG2 após o tratamento de 24 horas com diferentes concentrações dos extratos metanólicos dos capítulos de Sd, Sm, Sn e Ss, bem como de suas oito substâncias isoladas 1 a 8, e da mistura M (A-1,3,6-trihidrox-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidrox-2,5-dimetoxixantona), e seus respectivos controles.

Amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Média $\pm$ DP	Amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Média $\pm$ DP	Amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Média $\pm$ DP	Amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Média $\pm$ DP	Amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Média $\pm$ DP	Amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Média $\pm$ DP
Sd	Sm	Sn	Ss								
0,72	5,7 $\pm$ 0,8	0,21	0,0 $\pm$ 0,0	0,35	0,2 $\pm$ 0,0	0,71	1,7 $\pm$ 0,0				
7,2	3,1 $\pm$ 0,4	2,1	0,0 $\pm$ 0,0	3,5	0,7 $\pm$ 0,0	7,1	5,8 $\pm$ 0,0				
72,0	1,0 $\pm$ 0,7	21,0	0,0 $\pm$ 0,0	35,0	0,0 $\pm$ 0,0	71,0	0,1 $\pm$ 0,0				
720,0	18,7 $\pm$ 0,3	210,0	0,3 $\pm$ 0,0	350,0	26,6 $\pm$ 0,1*	710,0	6,8 $\pm$ 0,1				
7200,0	46,1 $\pm$ 0,3*	2100,0	3,5 $\pm$ 0,0	3500,0	58,8 $\pm$ 0,1*	7100,0	20,4 $\pm$ 0,1*				
Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0				
Cs	5,6 $\pm$ 0,5	Cs	5,6 $\pm$ 0,5	Cs	5,6 $\pm$ 0,5	Cs	5,6 $\pm$ 0,5				
C+	58,6 $\pm$ 8,6	C+	58,6 $\pm$ 8,6	C+	58,6 $\pm$ 8,6	C+	58,6 $\pm$ 8,6				
1	2	3	4								
0,01	20,1 $\pm$ 0,1*	0,01	22,7 $\pm$ 0,1*	0,01	15,1 $\pm$ 0,3	0,01	9,3 $\pm$ 0,2				
0,1	24,6 $\pm$ 0,2*	0,1	23,4 $\pm$ 0,1*	0,1	13,8 $\pm$ 0,2	0,1	9,7 $\pm$ 0,2				
1,0	19,8 $\pm$ 0,1	1,0	23,7 $\pm$ 0,2*	1,0	13,5 $\pm$ 0,2	1,0	13,4 $\pm$ 0,2				
10,0	32,1 $\pm$ 0,2*	10,0	26,8 $\pm$ 0,2*	10,0	17,1 $\pm$ 0,3	10,0	27,2 $\pm$ 0,2*				
100,0	10,3 $\pm$ 0,1	100,0	24,5 $\pm$ 0,2*	100,0	49,6 $\pm$ 0,1*	100,0	51,8 $\pm$ 0,1*				
Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0				
Cs	0,0 $\pm$ 0,9	Cs	0,0 $\pm$ 0,9	Cs	0,0 $\pm$ 0,9	Cs	0,0 $\pm$ 0,9				
C+	53,9 $\pm$ 5,8	C+	53,9 $\pm$ 5,7	C+	53,9 $\pm$ 5,7	C+	47,1 $\pm$ 2,4				
5	6	7	8	M							
0,01	26,9 $\pm$ 0,1*	0,01	12,4 $\pm$ 0,2	0,01	24,2 $\pm$ 0,1*	0,01	19,6 $\pm$ 0,2	0,01	4,8 $\pm$ 0,1		
0,1	21,6 $\pm$ 0,1*	0,1	8,8 $\pm$ 0,1	0,1	22,6 $\pm$ 0,1*	0,1	25,9 $\pm$ 0,3*	0,1	17,7 $\pm$ 0,2		
1,0	26,4 $\pm$ 0,2*	1,0	9,7 $\pm$ 0,2	1,0	26,1 $\pm$ 0,1*	1,0	27,6 $\pm$ 0,2*	1,0	18,1 $\pm$ 0,2		
10,0	24,6 $\pm$ 0,1*	10,0	19,8 $\pm$ 0,1	10,0	32,3 $\pm$ 0,2*	10,0	37,1 $\pm$ 0,2*	10,0	9,4 $\pm$ 0,1		
100,0	22,3 $\pm$ 0,1*	100,0	17,8 $\pm$ 0,2	100,0	32,4 $\pm$ 0,1*	100,0	28,5 $\pm$ 0,2*	100,0	55,4 $\pm$ 0,0*		
Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0		
Cs	0,0 $\pm$ 0,9	Cs	0,0 $\pm$ 0,9	Cs	0,0 $\pm$ 0,9	Cs	0,0 $\pm$ 0,9	Cs	0,0 $\pm$ 0,9		
C+	47,1 $\pm$ 2,4	C+	47,1 $\pm$ 2,4	C+	47,1 $\pm$ 2,4	C+	53,5 $\pm$ 3,2	C+	53,9 $\pm$ 5,8		

Cm: controle de meio (meio DMEM); Cs: controle de solvente (meio DMEM + DMSO 0,1%); C+: controle positivo (meio DMEM + doxorrubicina 20,0 $\mu\text{g/mL}$). * $P < 0,05$.

Tabela 14. Média da porcentagem de morte celular $\pm$ desvio padrão (DP) encontrados na linhagem celular MCF-7/BUS após o tratamento de **24 horas** com diferentes concentrações dos extratos metanólicos dos capítulos de Sd, Sm, Sn e Ss, bem como de suas oito substâncias isoladas 1 a 8, e da mistura M (A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), e seus respectivos controles.

Amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Média $\pm$ DP	Amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Média $\pm$ DP	Amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Média $\pm$ DP	Amostra ($\mu\text{g/mL}$)	Média $\pm$ DP
Sd		Sm		Sn		Ss	
8,9	24,7 $\pm$ 4,3*	2,6	10,0 $\pm$ 2,5	4,3	5,5 $\pm$ 1,9	8,8	0,0 $\pm$ 0,0
26,7	26,7 $\pm$ 4,4*	7,8	22,6 $\pm$ 7,6*	13,0	10,6 $\pm$ 1,5	26,3	3,4 $\pm$ 0,7
80,0	26,8 $\pm$ 1,7*	23,3	21,3 $\pm$ 1,0*	38,9	18,2 $\pm$ 1,4	78,9	9,4 $\pm$ 1,5
240,0	30,3 $\pm$ 1,4*	70,0	23,2 $\pm$ 5,4*	116,7	21,0 $\pm$ 2,2*	236,7	15,4 $\pm$ 3,4
720,0	34,3 $\pm$ 2,9*	210,0	17,1 $\pm$ 5,4	350,0	18,0 $\pm$ 5,9	710,0	7,5 $\pm$ 1,6
Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0
Cs	0,6 $\pm$ 0,0	Cs	0,6 $\pm$ 0,0	Cs	0,6 $\pm$ 0,0	Cs	0,6 $\pm$ 0,0
C+	38,9 $\pm$ 4,6	C+	38,9 $\pm$ 4,6	C+	38,9 $\pm$ 4,6	C+	38,9 $\pm$ 4,6
1		2		3		4	
4,1	4,2 $\pm$ 1,7	4,1	27,1 $\pm$ 5,5*	4,1	16,8 $\pm$ 1,6	4,1	26,5 $\pm$ 4,3*
12,4	4,8 $\pm$ 1,6	12,4	15,6 $\pm$ 0,0	12,4	1,1 $\pm$ 0,5	12,4	3,4 $\pm$ 0,3
37,0	0,0 $\pm$ 0,0	37,0	9,4 $\pm$ 0,0	37,0	6,0 $\pm$ 0,3	37,0	7,8 $\pm$ 1,1
111,0	0,9 $\pm$ 0,2	111,0	14,1 $\pm$ 1,7	111,0	7,8 $\pm$ 1,1	111,0	7,2 $\pm$ 0,5
333,0	3,3 $\pm$ 0,6	333,0	10,9 $\pm$ 1,8	333,0	19,2 $\pm$ 3,0	333,0	26,3 $\pm$ 1,8*
1000,0	0,0 $\pm$ 0,0	1000,0	22,9 $\pm$ 0,0*	1000,0	20,9 $\pm$ 1,8*	1000,0	22,3 $\pm$ 1,2*
Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0
C+	40,5 $\pm$ 8,9	C+	40,5 $\pm$ 8,9	C+	40,5 $\pm$ 8,9	C+	40,5 $\pm$ 8,9
5		6		8		M	
4,1	26,3 $\pm$ 2,5*	4,1	0,0 $\pm$ 0,0	4,1	20,2 $\pm$ 5,3*	4,1	27,0 $\pm$ 2,4*
12,4	2,3 $\pm$ 0,8	12,4	0,5 $\pm$ 0,0	12,4	7,0 $\pm$ 2,1	12,4	9,5 $\pm$ 1,6
37,0	13,4 $\pm$ 1,7	37,0	0,0 $\pm$ 0,0	37,0	6,2 $\pm$ 1,8	37,0	12,0 $\pm$ 1,9
111,0	0,8 $\pm$ 0,1	111,0	0,0 $\pm$ 0,0	111,0	9,9 $\pm$ 1,5	111,0	19,5 $\pm$ 4,8
333,0	4,3 $\pm$ 1,0	333,0	1,9 $\pm$ 0,0	333,0	7,0 $\pm$ 1,9	333,0	34,5 $\pm$ 7,5*
1000,0	7,3 $\pm$ 0,4	1000,0	0,0 $\pm$ 0,0	1000,0	11,0 $\pm$ 2,7	1000,0	22,0 $\pm$ 2,9*
Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0	Cm	0,0 $\pm$ 0,0
C+	35,7 $\pm$ 2,8	C+	35,7 $\pm$ 2,8	C+	35,7 $\pm$ 2,8	C+	39,1 $\pm$ 12,3

Cm: controle de meio (meio DMEM); Cs: controle de solvente (meio DMEM + DMSO 0,1%); C+: controle positivo (meio DMEM + DMSO 40%), * P < 0,05.

Tabela 15. Média da porcentagem de morte celular + desvio padrão (DP) encontrados na linhagem celular MCF-7/BUS após o tratamento de **144 horas** (6 dias) com diferentes concentrações dos extratos metanólicos dos capítulos de Sd, Sm, Sn e Ss, bem como de suas oito substâncias isoladas 1 a 8, e da mistura M (A-1,3,6-trihidrox-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidrox-2,5-dimetoxixantona), e seus respectivos controles.

Amostra (µg/mL)	Média ± DP	Amostra (µg/mL)	Média ± DP	Amostra (µg/mL)	Média ± DP	Amostra (µg/mL)	Média ± DP
Sd	Sm	Sn	Ss				
8,9	30,2 ± 1,3*	2,6	17,9 ± 1,9	4,3	20,0 ± 1,5*	8,8	0,8 ± 0,09
26,7	39,9 ± 2,5*	7,8	29,2 ± 0,5*	13,0	25,8 ± 1,5*	26,3	16,0 ± 1,8
80,0	47,5 ± 0,6*	23,3	23,0 ± 1,6*	38,9	23,0 ± 2,5*	78,9	21,0 ± 1,1*
240,0	52,7 ± 2,2*	70,0	24,4 ± 1,7*	116,7	55,5 ± 1,9*	236,7	32,6 ± 1,9*
720,0	39,8 ± 1,8*	210,0	49,8 ± 1,4*	350,0	45,0 ± 1,9*	710,0	43,4 ± 0,6*
Cm	0,0 ± 0,0	Cm	0,0 ± 0,0	Cm	0,0 ± 0,0	Cm	0,0 ± 0,0
Cs	2,4 ± 0,8	Cs	2,4 ± 0,8	Cs	2,4 ± 0,8	Cs	2,4 ± 0,8
C+	49,8 ± 5,8	C+	49,8 ± 5,8	C+	39,8 ± 5,8	C+	39,8 ± 5,8
1	2	3	4				
4,1	1,8 ± 0,5	4,1	4,3 ± 0,6	4,1	4,4 ± 1,3	4,1	12,9 ± 1,3
12,4	13,1 ± 1,6	12,4	4,7 ± 0,7	12,4	8,3 ± 1,4	12,4	9,0 ± 1,4
37,0	15,3 ± 1,8	37,0	16,5 ± 2,5	37,0	13,2 ± 0,8	37,0	10,2 ± 1,1
111,0	40,9 ± 1,7*	111,0	15,2 ± 1,5	111,0	44,6 ± 8,1*	111,0	11,0 ± 1,4
333,0	38,1 ± 1,7*	333,0	37,0 ± 0,7*	333,0	37,7 ± 3,7*	333,0	22,8 ± 2,6*
1000,0	23,1 ± 1,4*	1000,0	22,2 ± 1,1*	1000,0	29,9 ± 2,7*	1000,0	33,3 ± 6,1*
Cm	0,0 ± 0,0	Cm	0,0 ± 0,0	Cm	0,0 ± 0,0	Cm	0,0 ± 0,0
C+	43,6 ± 4,3	C+	43,6 ± 4,3	C+	43,6 ± 4,3	C+	43,6 ± 4,3
5	6	8	M				
4,1	6,1 ± 1,7	4,1	0,0 ± 0,0	4,1	9,1 ± 2,8	4,1	
12,4	6,7 ± 1,8	12,4	0,0 ± 0,0	12,4	27,2 ± 3,8	12,4	20,4 ± 3,1*
37,0	0,0 ± 0,0	37,0	0,0 ± 0,0	37,0	22,7 ± 2,6	37,0	41,4 ± 4,8*
111,0	8,1 ± 1,1	111,0	0,0 ± 0,0	111,0	13,2 ± 1,4	111,0	49,9 ± 6,9*
333,0	28,8 ± 6,9*	333,0	21,0 ± 1,0*	333,0	31,7 ± 6,8*	333,0	38,2 ± 8,2*
1000,0	17,8 ± 5,2	1000,0	21,6 ± 2,1*	1000,0	25,1 ± 8,6*	1000,0	35,7 ± 3,2*
Cm	0,0 ± 0,0	Cm	0,0 ± 0,0	Cm	0,0 ± 0,0	Cm	0,0 ± 0,0
C+	44,2 ± 2,7	C+	44,2 ± 2,7	C+	44,2 ± 2,7	C+	37,4 ± 4,2

Cm: controle de meio (meio DMEM); Cs: controle de solvente (meio DMEM + DMSO 0,1%); C+: controle positivo (meio DMEM + DMSO 40%), * P < 0,05.

Tabela 16. Valores de IC₅₀ encontrados na linhagem HepG2 após o tratamento com diferentes concentrações dos extratos metanólicos dos capítulos de Sd, Sm, Sn e Ss, bem como de suas oito substâncias isoladas 1 a 8, e da sua mistura M (A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), e seu controle positivo (doxorrubicina – DXR).

Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)	Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)	Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)	Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)
Sd	7800,0	Sm	Não inibiu	Sn	750,0	Ss	Não inibiu
<u>1</u>	Não inibiu	<u>2</u>	Não inibiu	<u>3</u>	100,0	<u>4</u>	93,0
<u>5</u>	Não inibiu	<u>6</u>	Não inibiu	<u>7</u>	Não inibiu	<u>8</u>	Não inibiu
<u>M</u>	90,0	DXR	21,0				

Tabela 17. Valores de IC₅₀ encontrados na linhagem celular MCF-7/BUS após o tratamento, de 24 e 144 horas, com diferentes concentrações dos extratos metanólicos dos capítulos de Sd, Sm, Sn e Ss, bem como de suas oito substâncias isoladas 1 a 8, e da sua mistura M (A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), e seu controle positivo (doxorrubicina – DXR).

	24 horas	144 horas
Amostra	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
Sd	650,0	177,0
Sm	2500,0	215,0
Sn	1080,0	102,0
Ss	1870,0	1460,0
<u>1</u>	2300,0	600,0
<u>2</u>	1320,0	535,0
<u>3</u>	2350,0	384,0
<u>4</u>	Não inibiu	Não inibiu
<u>5</u>	Não inibiu	Não inibiu
<u>6</u>	Não inibiu	Não inibiu
<u>8</u>	Não inibiu	Não inibiu
<u>M</u>	Não inibiu	110,0

4.6. Estrogenicidade

4.6.1. Teste RYA

Os dados obtidos da avaliação da estrogenicidade foram dispostos nos Gráficos 1 a 6 e na Tabela 18. No Gráfico 1, a atividade estrogênica foi expressa através do EEQ dos quatro extratos metanólicos, Sd, Sm, Sn e Ss, de suas oito substâncias isoladas, 1 a 8 e da mistura de

xantonas M. Pode-se observar que, dentre os extratos, apenas o Sn obteve resultados expressivos e estatisticamente relevantes. Verificou-se que esse alcançou o valor de $EEQ \pm$ Desvio Padrão (DP) de $14,7 \pm 1,6$ nM. Os extratos metanólicos de Sd, Sm e Ss não apresentaram resultados significativos em nenhuma das concentrações testadas, nas condições utilizadas.

De acordo com os dados dispostos na Tabela 18, podemos verificar que a substância isolada 4 e a mistura M são as que apresentaram maior potencial estrogênico, medido em unidades de fluorescência, e que as substâncias 2 e 3, apresentaram um potencial estrogênico moderado. Pode-se verificar também que as unidades de fluorescência aumentaram com o aumento das concentrações testadas, observando uma clara relação dose-resposta, mas apenas para o extrato Sn, para as substâncias isoladas 2, 3 e 4 e para a mistura M. Para as demais amostras testadas, as unidades de fluorescência não variaram muito entre as concentrações testadas.

As amostras com resultados significativos pertencem à classe das xantonas e foram isoladas do extrato metanólico dos capítulos de *S. nitens*. Esses dados corroboram os encontrados nos experimentos realizados com os extratos, dispostos no Gráfico 1 e na Tabela 18, onde é mostrado que, dentre os extratos, apenas o Sn foi considerado estrogênico.

Além desses dados, os Gráficos 2 a 6 mostram o perfil da atividade estrogênica, medida em unidades de fluorescência, encontrada nas amostras que obtiveram resultados significativos (Sn, mistura M e isoladas 2, 3 e 4), em relação ao tempo (20 minutos) em que a fluorescência foi medida. Foram dispostas as cinco diluições da amostra e seus respectivos controles negativo, positivo e de viabilidade. Foi verificado um aumento progressivo das unidades de fluorescência com o passar dos minutos, gerando uma curva ascendente nos gráficos.

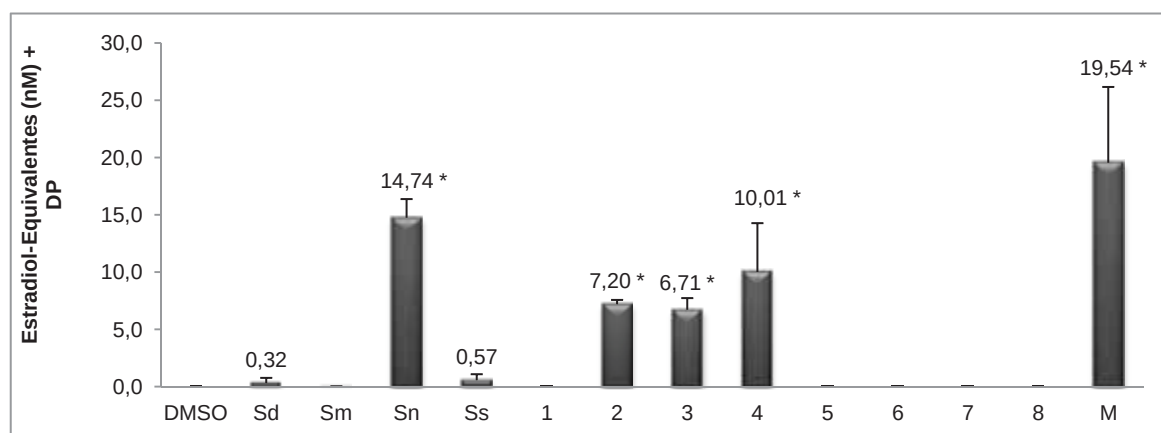


Gráfico 1. Atividade estrogênica expressa em Estradiol-Equivalentes (nM) + Desvio Padrão (DP), obtidos pelo teste RYA (*Recombinant Yeast Assay*), dos extratos metanólicos de capítulos de *S. dealbatus* (Sd), *S. macrolepsis* (Sm), *S. nitens* (Sn), *S. suberosus* (Ss), de suas substâncias isoladas, 1 a 8, e da mistura M, além do seu controle negativo (DMSO), na linhagem BY4741 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. (1= luteolina; 2= 1,5,7-trihidroxi-3,6-dimetoxixantona; 3= 1,3,6,8-tetrahidroxi-2,5-dimetoxixantona; 4= 1,3,6,8-tetrahidroxi-5-metoxixantona; 5= 7-metoxiluteolina-8-c- β -glicopiranosídeo; 6= 7-metoxiluteolina-6-c- β -glicopiranosídeo; 7= 7,3'-dimetoxiluteolina-6-c- β -glicopiranosídeo, 8= 6-hidroxiluteolina e M= mistura de A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona). * $P < 0,05$.

Tabela 18. Atividade estrogênica, expressa através da média das Unidades de Fluorescência $\pm$ Desvio Padrão (DP) de cada diluição testada através do teste RYA, dos extratos metanólicos dos extratos de *S. dealbatus* (Sd), *S. macrolepsis* (Sm), *S. nitens* (Sn) e *S. suberosus* (Ss), de suas oito substâncias isoladas (1 a 8) e de sua mistura M (A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), além dos controles negativo e positivo.

Amostras ($\mu\text{g/poço}$)	Unidades Fluorescência $\pm$ DP	Amostras ($\mu\text{g/poço}$)	Unidades Fluorescência $\pm$ DP
Sd		<u>4</u>	
0,2	324 $\pm$ 21	0,01	231 $\pm$ 57
0,6	329 $\pm$ 15	0,04	341 $\pm$ 40
1,7	328 $\pm$ 6	0,1	1660 $\pm$ 191**
5,0	286 $\pm$ 30	0,3	7368 $\pm$ 846**
15,0	317 $\pm$ 42	1,0	7735 $\pm$ 1235**
C-	348 $\pm$ 26	C-	238 $\pm$ 43
C+	13271 $\pm$ 1632	C+	10194 $\pm$ 1093
Sm		<u>5</u>	
0,04	319 $\pm$ 9	0,3	261 $\pm$ 58
0,1	325 $\pm$ 21	0,7	258 $\pm$ 52
0,4	316 $\pm$ 3	2,2	236 $\pm$ 50
1,1	302 $\pm$ 19	6,7	195 $\pm$ 35
3,2	360 $\pm$ 52	20,0	141 $\pm$ 31
C-	348 $\pm$ 26	C-	238 $\pm$ 43

C+	13271 ± 1632	C+	10194 ± 1093
<u>Sn</u>		<u>6</u>	
0,06	356 ± 69	0,4	216 ± 56
0,2	566 ± 267	1,1	215 ± 56
0,6	3167 ± 924**	3,3	213 ± 51
1,7	5471 ± 583**	10,0	181 ± 40
5,2	2159 ± 437**	30,0	147 ± 39
C-	348 ± 26	C-	201 ± 63
C+	13271 ± 1632	C+	9795 ± 1252
<u>Ss</u>		<u>7</u>	
0,2	326 ± 100	0,3	272 ± 99
0,5	352 ± 112	0,7	298 ± 109
1,5	390 ± 120	2,2	216 ± 56
4,5	326 ± 105	6,7	181 ± 45
13,5	423 ± 37	20,0	158 ± 38
C-	322 ± 39	C-	201 ± 63
C+	9386 ± 1983	C+	9795 ± 1252
<u>1</u>		<u>8</u>	
0,2	310 ± 23	0,5	263 ± 106
0,6	305 ± 16	1,5	272 ± 123
1,7	290 ± 23	4,4	260 ± 111
5,0	232 ± 21	13,3	218 ± 89
15,0	180 ± 29	40,0	157 ± 59
C-	280 ± 34	C-	236 ± 86
C+	10746 ± 1122	C+	7106 ± 1445
<u>2</u>		<u>M</u>	
0,3	284 ± 32	0,02	301 ± 31
0,7	282 ± 24	0,06	362 ± 57
2,2	461 ± 53	0,2	2346 ± 478**
6,7	1101 ± 143**	0,5	7050 ± 2048**
20,0	1177 ± 384**	1,5	7558 ± 1753**
C-	280 ± 34	C-	280 ± 34
C+	10746 ± 1122	C+	10746 ± 1122
<u>3</u>			
0,1	281 ± 32		
0,3	291 ± 34		
1,0	396 ± 31		
3,0	2234 ± 484**		
9,0	4214 ± 940**		
C-	280 ± 34		
C+	10746 ± 1122		

Controles: C-: negativo - DMSO (5%); C+: positivo – 17- β -estradiol (E₂) a 10 nM. ** P < 0,01.

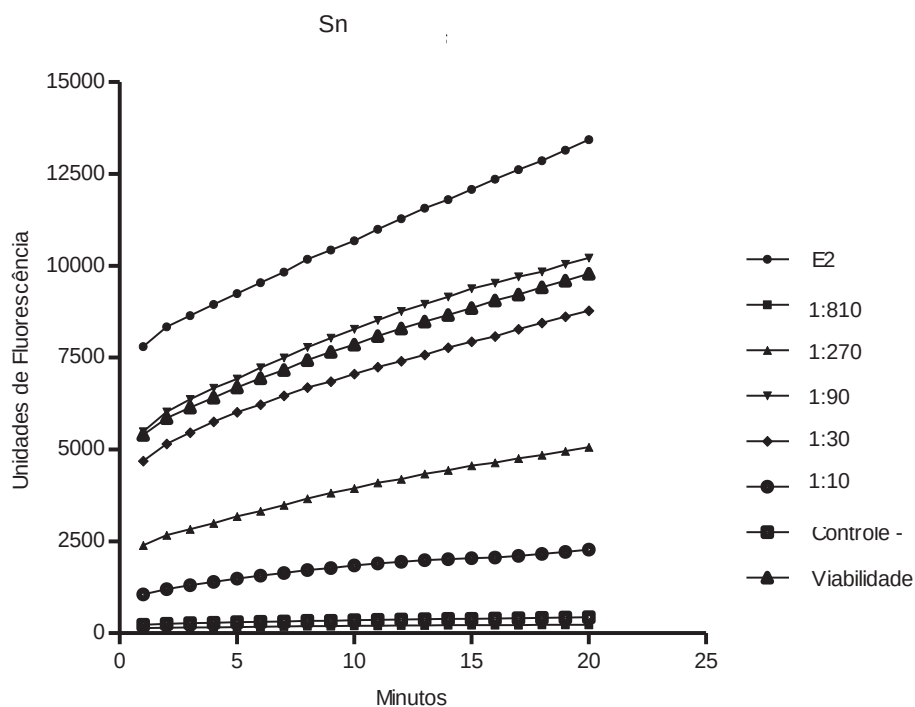


Gráfico 2. Valores de atividade estrogênica, em unidades de fluorescência, medida por 20 minutos, das cinco diluições do extrato metanólico dos capítulos de *S. nitens* (Sn) e de seus controles negativo (Controle-: DMSO), de viabilidade (Estradiol + a diluição de 1:30 do extrato) e positivo (Estradiol: E₂).

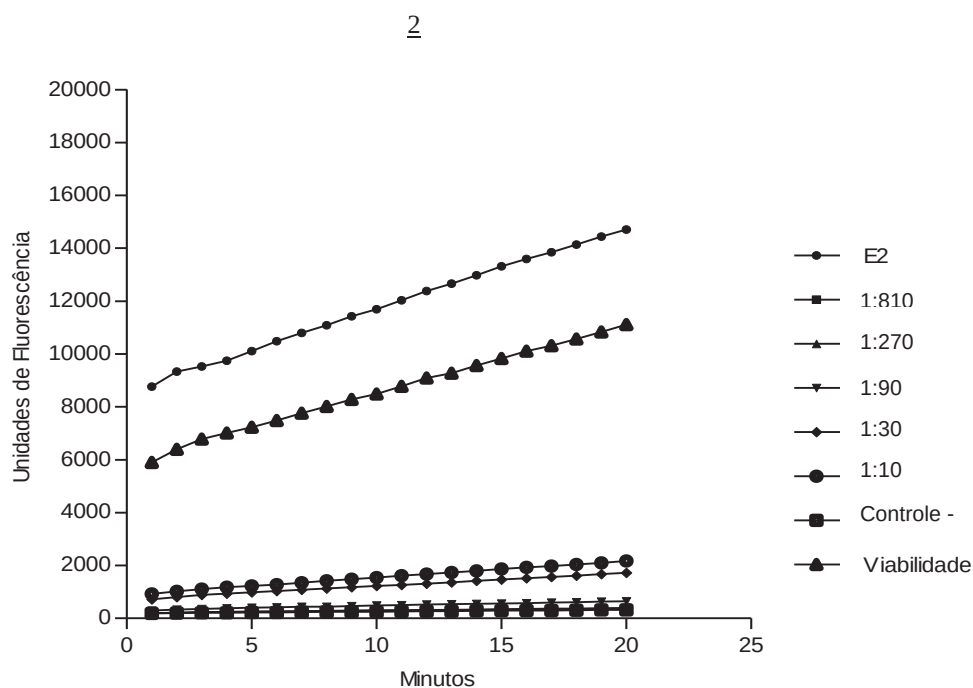


Gráfico 3. Valores de atividade estrogênica, em unidades de fluorescência, medida por 20 minutos, das cinco diluições da substância 2 (1,5,7-trihidroxi-3,6-dimetoxixantona) e de seus controles negativo (Controle-: DMSO), de viabilidade (Estradiol + a diluição de 1:30 do extrato) e positivo (Estradiol: E₂).

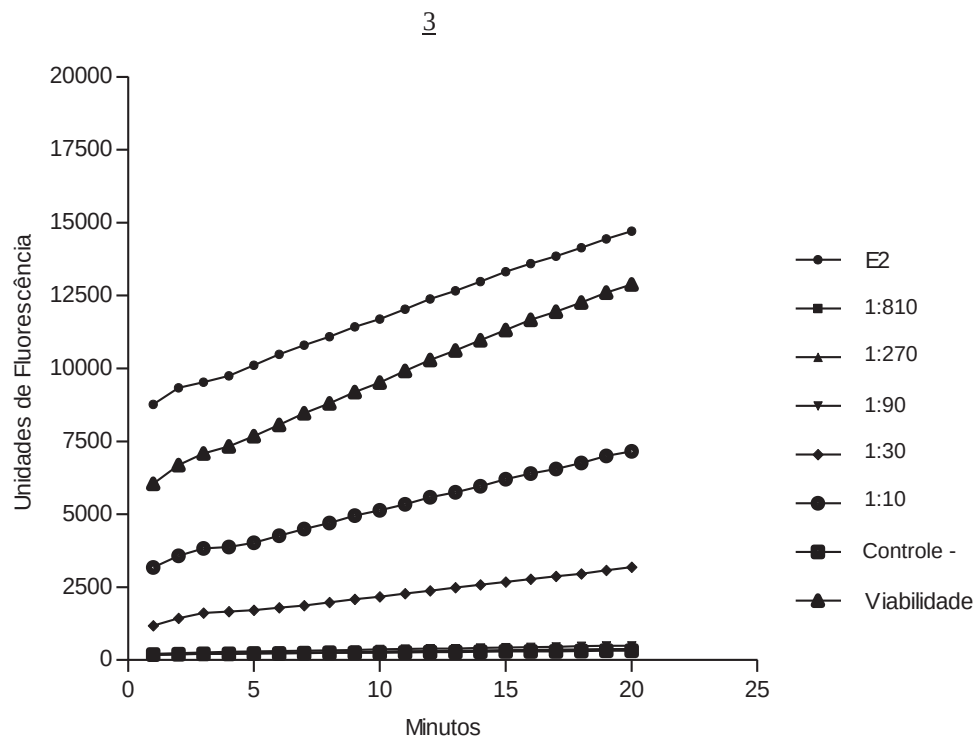


Gráfico 4. Valores de atividade estrogênica, em unidades de fluorescência, medida por 20 minutos, das cinco diluições da substância 3 (3,6,8-tetrahidroxi-2,5-dimetoxixantona) e de seus controles negativo (Controle-: DMSO), de viabilidade (Estradiol + a diluição de 1:30 do extrato) e positivo (Estradiol: E₂).

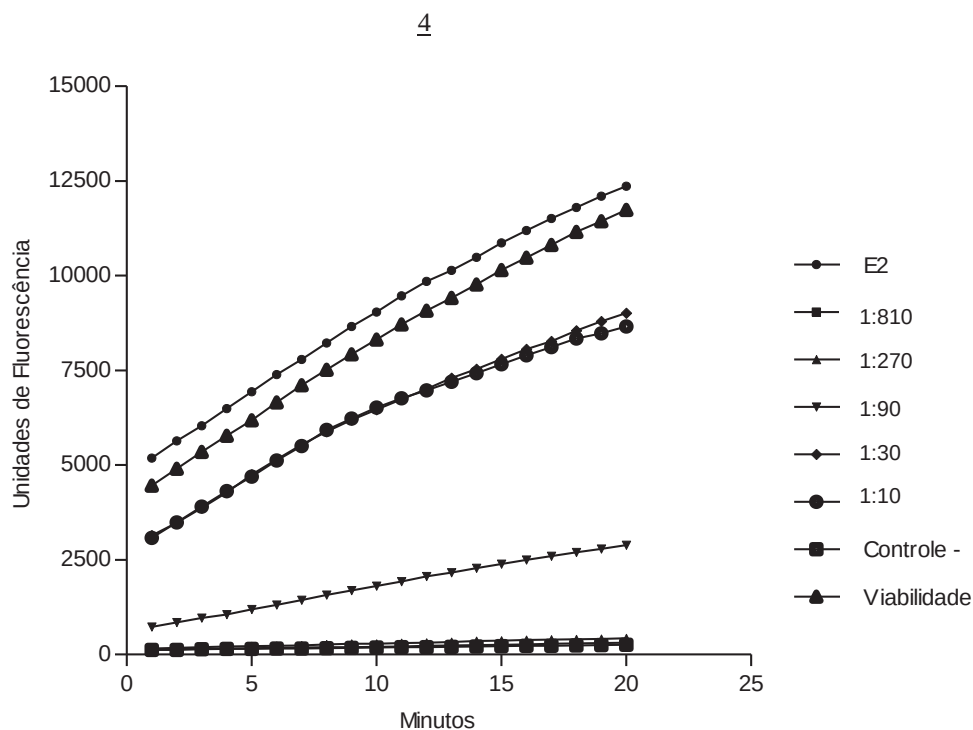


Gráfico 5. Valores de atividade estrogênica, em unidades de fluorescência, medida por 20 minutos, das cinco diluições da substância 4 (1,3,6,8-tetrahidroxi-5-metoxixantona) e de seus controles negativo (Controle-: DMSO), de viabilidade (Estradiol + a diluição de 1:30 do extrato) e positivo (Estradiol: E₂).

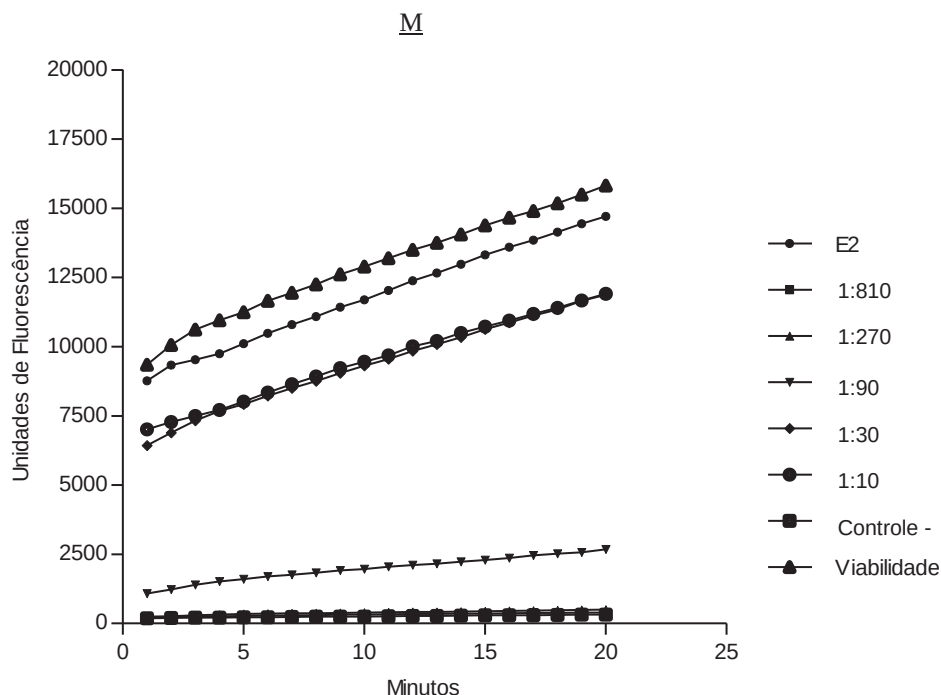


Gráfico 6. Valores de atividade estrogênica, em unidades de fluorescência, medida por 20 minutos, das cinco diluições da mistura M (A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona) e de seus controles negativo (Controle-: DMSO), de viabilidade (Estradiol + a diluição de 1:30 do extrato) e positivo (Estradiol: E₂).

4.6.2. Teste E-screen

Os resultados obtidos da análise da estrogenicidade por meio da proliferação das células MCF-7/BUS foram dispostos na Tabela 19. De acordo com os dados podemos verificar que nenhum dos extratos foi considerado estrogênico, nas concentrações utilizadas neste ensaio, pois todos eles mantiveram o efeito proliferativo relativo (EPR) abaixo de 25%, em todas as suas concentrações testadas.

Já entre as substâncias isoladas 1 a 8, os dados mostram que todos, exceto o composto 6, foram considerados agonistas parciais dos REs, ou seja, induziram a proliferação das células MCF-7/BUS entre 25 a 80%, em pelo menos uma de suas concentrações testadas, em relação aos controles negativo e positivo. O composto 6 foi considerado não estrogênico pois manteve o seu EPR abaixo de 25% em todas as suas concentrações testadas.

Acompanhando os resultados obtidos pelas substâncias isoladas, a mistura M também foi considerada estrogênica no ensaio do *E-screen* alcançando proliferação celular acima de 80%, em mais de uma de suas concentrações testadas e foi a única das amostras a ser considerada como agonista total dos receptores de estrógeno.

Tabela 19. Atividade estrogênica expressa pela média e desvio padrão (DP) das absorvâncias obtidas por cada concentração testada dos extratos (Sd, Sm, Sn e Ss), das substâncias isoladas (1 a 8) e da mistura M (A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona); pelo seu efeito proliferativo (EP) e pelo seu efeito proliferativo relativo (EPR), avaliados pelo ensaio *E-screen*.

Amostra (µg/mL)	Média	DP	EP	EPR (%)	Amostra (µg/mL)	Média	DP	EP	EPR (%)
Sd					3				
C+	0,188	0,032	2,01		C+	0,158	0,032	1,38	
Cm	0,093	0,017			Cm	0,115	0,018		
3,0	0,062	0,006	0,66		4,1	0,147	0,061	1,28	75 ^b
1,0	0,065	0,014	0,70		1,4	0,102	0,018	0,89	-
0,3	0,082	0,012	0,88		0,5	0,115	0,021	1,00	-
0,1	0,073	0,007	0,78		0,2	0,101	0,021	0,88	-
0,04	0,064	0,007	0,69		0,05	0,102	0,015	0,89	-
0,01	0,094	0,064	1,01	1 ^a	0,02	0,083	0,007	0,73	-
Sm					4				
C+	0,153	0,040	2,10		C+	0,172	0,039	2,09	
Cm	0,073	0,006			Cm	0,082	0,017		
0,9	0,068	0,015	0,93	-	37,5	0,097	0,013	1,18	17 ^a
0,3	0,057	0,009	0,79	-	12,5	0,081	0,009	0,99	-
0,1	0,072	0,005	1,00	-	4,2	0,127	0,011	1,54	49 ^b
0,03	0,066	0,006	0,91	-	1,4	0,087	0,018	1,06	6 ^a
0,01	0,060	0,007	0,83	-	0,5	0,080	0,017	0,98	-
0,004	0,075	0,016	1,03	3 ^a	0,2	0,070	0,006	0,85	-
Sn					5				
C+	0,158	0,014	1,80		C+	0,180	0,042	1,70	
Cm	0,088	0,011			Cm	0,106	0,013		
1,4	0,102	0,019	1,16	20 ^a	37,0	0,100	0,013	0,95	-
0,5	0,095	0,016	1,08	10 ^a	12,3	0,134	0,040	1,27	38 ^b
0,2	0,102	0,013	1,16	20 ^a	4,1	0,161	0,017	1,52	75 ^b
0,05	0,127	0,032	1,44	-	1,4	0,109	0,012	1,03	4 ^a
0,02	0,087	0,009	0,99	-	0,5	0,083	0,012	0,79	-
0,006	0,084	0,012	0,96	-	0,2	0,097	0,018	0,91	-
Ss					6				
C+	0,141	0,051	1,38		C+	0,186	0,019	1,67	
Cm	0,102	0,031			Cm	0,112	0,011		
8,8	0,069	0,018	0,68	-	111,1	0,116	0,026	1,04	6 ^a

2,9	0,081	0,016	0,79	-	37,0	0,096	0,019	0,86	-
1,0	0,067	0,011	0,65	-	12,3	0,125	0,007	1,12	18 ^a
0,3	0,067	0,013	0,66	-	4,1	0,116	0,031	1,04	6 ^a
0,1	0,077	0,013	0,75	-	1,4	0,087	0,011	0,78	-
0,04	0,040	0,001	0,39	-	0,5	0,089	0,019	0,80	-

1					8				
C+	0,147	0,030	1,59		C+	0,192	0,033	1,67	
Cm	0,092	0,003			Cm	0,115	0,009		
4,1	0,083	0,017	0,90	-	1,4	0,113	0,011	0,98	-
1,4	0,079	0,005	0,86	-	0,5	0,090	0,009	0,79	-
0,5	0,111	0,020	1,21	35 ^b	0,2	0,145	0,023	1,27	40 ^b
0,2	0,098	0,019	1,06	10 ^a	0,05	0,112	0,011	0,98	-
0,05	0,094	0,013	1,02	4 ^a	0,02	0,108	0,011	0,94	-
0,02	0,074	0,009	0,80	-	0,006	0,089	0,009	0,77	-

2					M				
C+	0,170	0,015	1,80		C+	0,157	0,011	2,13	
Cm	0,095	0,009			Cm	0,074	0,014		
12,3	0,081	0,004	0,86	-	75,0	0,054	0,001	0,73	-
4,1	0,075	0,010	0,79	-	25,0	0,114	0,030	1,55	49 ^b
1,4	0,128	0,009	1,36	44 ^b	8,3	0,118	0,024	1,60	53 ^b
0,5	0,099	0,008	1,04	5 ^a	2,7	0,173	0,040	2,34	119 ^c
0,2	0,078	0,003	0,83	-	0,9	0,143	0,031	1,93	83 ^c
0,05	0,065	0,003	0,68	-	0,3	0,160	0,036	2,18	104 ^c

C+: controle positivo, 17- β -estradiol a 10^{-8} M; Cm: controle de meio, meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino livre de hormônios (DMEM/ -H). a) não estrogênico; b) agonista parcial; c) agonista total.

4.7. Modulação da Expressão Gênica

4.7.1. Quantificação e pureza dos RNAs

Os dados de quantificação e de pureza dos RNAs, obtidos após extração, das células submetidas ao tratamento com a mistura M (Teste) e das células expostas somente ao meio DMEM (Controle), foram dispostos na Tabela 20.

Pode-se observar que as amostras estavam puras, pois a razão 260/280 estava acima de 1,8 para todas elas e que quantidade suficiente de RNA foi obtido das células tratadas (testes 1 a 3) e não tratadas (controles 1 a 3).

Tabela 20. Quantidade e pureza das amostras de RNA obtidas das células MCF-7/BUS tratadas (teste 1-3) e não tratadas (controles 1-3) com a mistura M (A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), obtida dos capítulos de *S. nitens*.

Amostras	Quantidade (ng/μL)	Razão 260/280
C1	37,2	2,214
C2	51,2	1,960
C3	198,8	2,124
T1	241,3	2,115
T2	226,8	2,069
T3	182,4	2,151

4.7.2. PCR Array

Os resultados da expressão gênica nas células de carcinoma mamário (MCF-7/BUS) tratadas com a mistura M, obtida dos capítulos de *S. nitens*, estão representados pelo número de vezes que diminuíram a expressão quando comparados às células controle (não tratadas). Os valores mostrados na Tabela 21 representam a média do aumento ou da diminuição na expressão do gene em triplicata. Foram considerados somente os genes que apresentaram alterações na expressão com nível de significância $p < 0,05$. Entre os 84 genes avaliados na via de câncer de mama, 23 (27,4%) apresentaram alterações na expressão quando comparados ao controle. Desses, 21 (91,3%) apresentaram a expressão diminuída (*ABCB1*, *AR*, *BCL2*, *ESR1*, *GATA3*, *GRB7*, *KRT18*, *KRT19*, *KRT8*, *MAPK3*, *MGMT*, *MUC1*, *PGR*, *PTGS2*, *PYCARD*, *SLIT2*, *SRC*, *TFF3*, *TGFB1*, *THBS1* e *TP53*) e 2 (8,7%) apresentaram a expressão aumentada (*ID1* e *VEGFA*).

Dos 23 genes que foram alterados, 11 deles (*AR*, *BCL2*, *ESR1*, *ID1*, *MAPK3*, *MGMT*, *MUC1*, *PGR*, *PTGS2*, *TP53* e *VEGFA*) estão ligados à inibição ou ao favorecimento de morte

das células cancerosas por apoptose. Desses, 7 estão favorecendo esse fenômeno e todos tiveram a sua expressão diminuída em relação ao controle: *BCL2* (-1,88), *ESR1* (-2,64), *MAPK3* (-2,64), *MGMT* (-1,96), *MUC1* (-6,10), *PGR* (-2,21) e *PTGS2* (-2,33). E 4 desses estão inibindo a apoptose e contribuiriam para a proliferação celular: *AR* (-2,29), *ID1* (1,79), *TP53* (-1,80) e *VEGFA* (1,91).

Para todas as placas de *PCR Array* realizadas, controles para contaminação com DNA genômico e de transcriptase reversa foram avaliados e os resultados estavam de acordo com as condições ótimas para o sucesso das reações (Anexo 3).

Tabela 21. Genes que tiveram a sua expressão modificada no ensaio do *PCR Array*. Média do aumento (itálico) ou diminuição (negrito) na expressão de diferentes genes em células MCF-7/BUS após tratamento de 24 horas com a mistura **M** (A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B-1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona).

Gene	Descrição do gene	Grupo funcional do gene	Aumento/ Diminuição na expressão do gene	Valor de p
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	Signal Transduction (Steroid Receptor-Mediated)/ Xenobiotic Transport	-2,83	0,001473
AR	Androgen receptor	Signal Transduction (Steroid Receptor-Mediated)/ Transcriptional Factors	-2,29	0,001462
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2	Signal Transduction (Hedgehog)/ Adhesion/ Apoptosis/ Cell Cycle	-1,88	0,000001
ESR1	Estrogen receptor 1	Tumor Classification Marker (Luminal A-C)/ Signal Transduction (Steroid Receptor-Mediated)/ Transcriptional Factors	-2,64	0,000890
GATA3	GATA binding protein 3	Tumor Classification Marker (Luminal A-C)/ Transcriptional Factors	-2,51	0,001309
GRB7	Growth factor receptor-bound protein 7	Tumor Classification Marker (HER2-like)	-2,09	0,010123
ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	Tumor Classification Marker (Metastasis to Lung)/ Angiogenesis	<i>1,79</i>	0,004912
KRT18	Keratin 18	Tumor Classification Marker (Luminal A-C)	-2,24	0,000025
KRT19	Keratin 19	Signal Transduction (Steroid Receptor-Mediated)	-2,26	0,000519
KRT8	Keratin 8	Tumor Classification Marker (Luminal A-C)	-3,39	0,002617
MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3	Signal Transduction (MAPK)	-2,64	0,015318
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	DNA Damage	-1,96	0,002842
MUC1	Mucin 1, cell surface associated	Apoptosis	-6,10	0,000435
PGR	Progesterone receptor	Transduction (Steroid Receptor-Mediated)/ Transcriptional Factors	-2,21	0,014797
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	Tumor Classification Marker (Metastasis to Lung)	-2,33	0,043799
PYCARD	PYD and CARD domain containing	Proteolysis	-3,21	0,001062
SLIT2	Slit homolog 2 (Drosophila)	Angiogenesis	-4,31	0,001466
SRC	V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)	Epithelial to Mesenchymal Transition	-1,94	0,024865
TFF3	Trefoil factor 3 (intestinal)	Tumor Classification Marker (Luminal A-C)	-1,97	0,007333
TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	Epithelial to Mesenchymal Transition/ Adhesion	-2,48	0,003388
THBS1	Thrombospondin 1	Angiogenesis/ Adhesion	-1,81	0,012512
TP53	Tumor protein p53	Apoptosis/ Cell Cycle/ DNA Damage/ Transcriptional Factors	-1,80	0,004724
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	Angiogenesis	<i>1,91</i>	0,002016

As placas de *PCR Array* contêm os controles endógenos *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1* e *RPLP0*. Os valores de Cts obtidos para gene controle endógeno, em cada reação realizada, podem ser observados na Tabela 22. Considerando-se que a variação dos valores de Ct de cada gene, entre os dois grupos avaliados (controle e teste) não foi crítica para quatro (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH* e *RPLP0*) dos cinco genes estudados, apenas esses quatro foram considerados adequados para serem usados como controles endógenos. O gene *HPRT1* teve variações críticas de Cts e foi desconsiderado da análise. A média de Ct dos quatro genes foi utilizada como controle endógeno, conforme sugestão do fabricante.

Tabela 22. Valores de Cts obtidos para cada controle endógeno em todos os *PCR Array* dos controles e testes.

Gene	Controle			Teste		
	C ₁	C ₂	C ₃	T ₁	T ₂	T ₃
<i>ACTB</i>	19,72	22,25	20,4	19,78	20,06	21,79
<i>B2M</i>	23,77	24,75	24,11	24,15	23,88	25,62
<i>GAPDH</i>	20,21	22,47	20,85	20,00	20,35	21,99
<i>RPLP0</i>	17,68	19,37	18,38	17,23	17,66	19,14
Média	20,35	22,21	20,94	20,29	20,49	22,13

C₁: placa 1 do controle; C₂: placa 2 do controle; C₃: placa 3 do controle; T₁: placa 1 do teste; T₂: placa 2 do teste e T₃: placa 3 do teste.

5. DISCUSSÃO

5.1. Composição da Mistura M

Uma vez que a mistura M apresentou resultados bastante pronunciados neste estudo, uma ressalva importante a respeito de sua composição deve ser feita. Apesar de ser uma mistura de duas xantonas, a mesma foi avaliada através de ensaios de HPLC e Espectrometria de massas e verificou-se que a xantona A está em maior proporção (95%) (CARDOSO *et al.*,

2012; PACIFICO *et al.*, 2011), sendo esta provavelmente a responsável pelas atividades encontradas na mistura.

5.2. Mutagenicidade e Antimutagenicidade

Numerosos estudos têm mostrado que a proporção de carcinógenos identificados como mutágenos varia de aproximadamente 50-90% dependendo da estrutura do composto químico que está sendo testado e dos critérios para sua seleção, e uma resposta positiva em *Salmonella* prediz possibilidade de 77-98% de causar câncer em roedores (KIER *et al.*, 2001; MORTELMANS e ZEIGER, 2000; ZEIGER, 2001). Apesar de o teste de Ames ser considerado simples e um antigo método de triagem apenas, esses dados afirmam a importância das avaliações de mutagenicidade através dessa metodologia.

Dados de avaliação da mutagenicidade de produtos naturais obtidos de plantas, através do teste de Ames, são recorrentes na literatura. Há um interesse grande na avaliação da sua toxicidade genética, a qual tem sido avaliada em diversas plantas medicinais. Certos flavonóides são considerados mutagênicos, enquanto outros inibem a mutagenicidade e carcinogenicidade de outros mutágenos (BEN-RHOUMA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2013; RESENDE *et al.*, 2012a; 2012b).

Dessa maneira, tornou-se relevante investigar também não somente as atividades biológicas, mas também avaliar o risco do uso, através das atividades mutagênica e antimutagênica dos extratos *S. dealbatus* (Sd), *S. macrolepsis* (Sm), *S. nitens* (Sn) e *S. suberosus* (Ss), de suas oito substâncias isoladas, 1 (luteolina), 2 (1,5,7-trihidroxi-3,6-dimetoxixantona), 3 (1,3,6,8-tetrahidroxi-2,5-dimetoxixantona), 4 (1,3,6,8-tetrahidroxi-5-metoxixantona), 5 (7-metoxiluteolina-8-c- β -glicopiranosídeo), 6 (7-metoxiluteolina-6-c- β -glicopiranosídeo), 7 (7,3'-dimetoxiluteolina-6-c- β -glicopiranosídeo), 8 (6-hidroxiluteolina) e da mistura M (A-1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B-1,3,6-triidroxi-2,5-dimetoxixantona),

já que os estudos são muito conflitantes. O dano e/ou a proteção dessas substâncias contra danos no DNA ainda não está completamente esclarecida (GULLUCE *et al.*, 2013; HALLIWELL *et al.*, 2003; RUSSO *et al.*, 2012; TAKEMURA *et al.*, 2013), provavelmente devido às diferentes características da estrutura química e da variação inter e intra-ensaio (CUSHNIE e LAMB, 2005).

De acordo com os resultados da avaliação da mutagenicidade, obtidos através do teste de Ames, verificou-se que os resultados foram todos negativos, ou seja, nenhum dos extratos e nem suas substâncias isoladas apresentam o potencial mutagênico, nas condições testadas. Para a realização dessa análise foram utilizadas as cepas TA100, TA98, TA97a e TA102 que permitem avaliar a mutagênese por substituição de pares de base, deslocamento do quadro de leitura por adição ou por deleção de bases e danos oxidativos, respectivamente.

O passo seguinte nesse estudo foi avaliar as concentrações não mutagênicas dos extratos e substâncias isoladas no mesmo Teste de Ames, mas agora utilizando a metodologia de antimutagenicidade, onde essas amostras foram incubadas juntamente com mutágenos diretos e indiretos conhecidos, e verificou-se que todas elas apresentaram atividade antimutagênica.

Os resultados mostram que os extratos Sd e Sn apresentaram um forte efeito antimutagênico contra a AFB₁, NPD, BaP e MMC e um efeito moderado contra a AS. Sm e Ss apresentaram forte efeito antimutagênico contra todos os mutágenos testados. Já dentre as isoladas, pode-se verificar que todas elas foram consideradas antimutagênicas e que inclusive todas, exceto 3, foram mais antimutagênicas na linhagem TA100, diminuindo em até 62% (1); 51% (2); 89% (4); 69% (5); 75% (6); 85% (7); 75% (8) e 55% (M) a taxa de revertência causada pela AFB₁. A substância 3 apresentou um efeito antimutagênico maior para linhagem TA98, na presença de metabolização, e diminuiu em até 54% a mutagenicidade causada pelo BaP.

Alguns autores também verificaram resultados semelhantes aos encontrados neste estudo. Choi *et al.* (1994) verificaram que a luteolina (300µg/placa) exerceu um forte efeito antimutagênico (>70%) contra a AFB₁ (1µg/placa). Em nossos resultados, pudemos verificar que a luteolina, encontrada em todos os extratos avaliados neste estudo, exerceu um efeito antimutagênico semelhante (62%) contra a AFB₁ (1x10⁻³µg/placa). Recentemente, Huang *et al.* (2013) verificaram a atividade antimutagênica frente ao mutágeno direto, 4-nitroquinolina-N-óxido, e ao mutágeno indireto, 2-aminoantraceno, nas linhagens TA100 e TA98, respectivamente, de um extrato aquoso de *Flos inulae*, que tinha como seu composto majoritário a luteolina.

Edenharder *et al.* (1997) verificaram que dentre vários grupos de flavonoides, as flavonas exerciam efeitos antimutagênicos maiores frente ao composto 2-amino-3-metilimidazo[4,5-*f*]quinolina (IQ), na linhagem TA98, comparados aos flavonóis. Dentre elas, foi verificada que a presença de grupos hidroxila em sua estrutura favorece a atividade antimutagênica e que a presença de radicais glicosilados diminui essa atividade. Ainda, verificaram que substituições nas flavonas por grupos hidroxilas nas posições 7, 3', 4' e 5 geraram compostos antimutagênicos; que hidroxilas no carbono 5' as tornava inefetivas; e ainda que hidroxilas nos carbonos 3 e 6 ou metoxilas em C3' e C4' as tornava comutagênicas, na linhagem TA98.

Em nossos resultados, verificamos que de todas as flavonas avaliadas, apenas a luteolina apresentou-se como um forte inibidor da mutagenicidade causada pelo BaP, na linhagem TA98. As demais flavonas são derivados glicosilados (5= 7-metoxiluteolina-8-C-β-glicopiranosídeo; 6= 7-metoxiluteolina-6-C-β-glicopiranosídeo; 7= 7,3'-dimetoxiluteolina-6-C-β-glicopiranosídeo) ou hidroxilados (8= 6-hidroxiluteolina) e apresentaram nenhum (5, 6 e 8, I<25%) ou moderado (7, I= 31%) efeito antimutagênico contra o BaP, na linhagem TA98, provavelmente devido a presença de açúcares nas posições 7 e 3', de hidroxila na posição 6,

fundamentais para que a atividade antimutagênica aconteça, e pela presença de grupos metoxilas como substituintes, que desfavorecem o acontecimento dessa atividade.

Adicionalmente, Edenharder e Tang (1997) verificaram a correlação entre a atividade antimutagênica e a polaridade das moléculas de vários polifenóis conhecidos e observaram que o padrão de hidroxilação parece ser importante para alguns, como as flavonas, e pouco importante para outros, como os flavonóis. Verificou-se que máxima antimutagenicidade foi encontrada para um derivado tetrahidroxilado da luteolina; que a metoxilação das hidroxilas fenólicas sempre diminuía a antimutagenicidade dessa molécula; que o grupo carbonila no C4 é essencial para sua atividade; e que a sua antimutagenicidade dependia da presença de grupos polares, como OH, NH₃ ou OCH₃, nos carbonos 3, 4 ou 7, mas que essa diminuía com interações com hidroxilas próximas ao C7. E ainda verificaram que xantoninas e xantonas exerceram forte atividade antimutagênica contra o 2-nitrofluoreno, o 3-nitrofluoranteno e o 1-nitropireno, em TA98.

Esses dados reforçam os obtidos neste estudo onde os derivados metoxilados de luteolina tiveram uma atividade antimutagênica marginal em relação ao BaP, na linhagem TA98, e que as xantonas A e B, da mistura M, mais as 2, 3 e 4, foram consideradas antimutagênicas para a linhagem TA100 e TA98.

Ainda, podemos discutir os resultados encontrados neste ensaio através do conhecimento a respeito dos mecanismos de ação dos agentes antimutagênicos, os quais são classificados em dois processos maiores, denominados desmutagênese e bio-antimutagênese. Na desmutagênese, os agentes protetores, ou antimutagênicos, atuam diretamente sobre os compostos que induzem mutações no DNA, inativando-os química ou enzimaticamente, inibindo a ativação metabólica de pró-mutagênicos ou sequestrando moléculas reativas. Na bio-antimutagênese, os antimutagênicos atuam sobre o processo que leva a indução de

mutações, ou no reparo das lesões causadas no DNA (ANGELI *et al.*, 2009; KADA *et al.*, 1978).

Em qualquer sistema-teste, o tratamento com os agentes mutagênicos, que induzem as mutações, e com o antimutagênico, que poderá inibir o aparecimento de lesões no DNA, pode ocorrer simultaneamente ou em momentos diferentes, por meio de pré- ou pós-tratamento. Os agentes antimutagênicos usados em pré-tratamento ou tratamento simultâneo podem atuar como agentes desmutagênicos. A efetividade do agente antimutagênico no pós-tratamento sugere que ele esteja atuando pelo mecanismo de bio-antimutagênese e está relacionado ao processo de reparo das mutações, como acontece com a vanilina (SASAKI *et al.*, 1987) e com o ácido tânico (SASAKI *et al.*, 1988).

Neste trabalho utilizamos o tratamento simultâneo com mutágenos conhecidos para avaliar a capacidade das amostras de inibir o processo mutacional. Verificou-se que os quatro extratos avaliados e as suas substâncias isoladas foram antimutagênicos nas linhagens TA100 e TA98, exercendo efeito protetor frente às mutações causadas pela AFB₁ e pelo BaP, respectivamente. Sugere-se que o mecanismo de ação que envolve essa proteção exercida pelas xantonas e flavonas seja o de desmutagenêse, provavelmente inibindo a ativação metabólica destes compostos pelas enzimas presentes na fração S9 ou até mesmo dificultando a ligação dos mutágenos ao DNA.

O BaP e a AFB₁ são agentes mutagênicos indiretos, que causam mutações do tipo *frameshift* e que precisam ser metabolizados para exercerem seus efeitos carcinogênicos (KU *et al.*, 2007). Neste caso, os extratos e consequentemente as substâncias isoladas de *Syngonanthus* parecem inibir enzimas que ativam e detoxificam metabolicamente esse mutágeno, impedindo que o mesmo exerça seus efeitos deletérios. Os CYP1A e CYP2B estão induzidos na fração S9 (KU *et al.*, 2007), dessa forma a inibição destas enzimas seria um dos possíveis mecanismos pelos quais as amostras exerceriam seu efeito antimutagênico.

Dados da literatura apontam para resultados semelhantes aos encontrados neste estudo e acabam corroborando nossos achados. Edenharder *et al.* (1997) verificaram que flavonas e flavonóis são geralmente mais potentes inibidores de enzimas oxidantes, as mono-oxigenases 1A1 e 1A2 do sistema P450, do que as flavanonas, isoflavonas e chalconas e que essa característica seria a responsável pelos seus resultados mais proeminentes em estudos de antimutagenicidade. Ainda, esses mesmos autores verificaram que a luteolina reduziu em 34,5% os revertentes causados pelo derivado nitro-hidroxilado do composto IQ (N-OH-IQ), enquanto que outros flavonóides como flavona, tangeritina, kaempferol, quercetina, flavanona, naringina e hesperitina foram inativas. Este resultado é sugestivo de uma penetração favorecida da luteolina nas células bacterianas, antes da exposição ao mutágeno, pois essa molécula interagiria com facilidade com membranas biológicas, e de uma inibição das reações de esterificação de fase II.

Bacon *et al.* (2003) demonstraram que o flavonoide quercetina (5–20µM) foi capaz de inibir a formação de aductos induzidos pelo 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-β]-piridina (PhIP) em hepatócitos humanos de maneira dose dependente. A redução da formação de aductos se deu através da inibição da enzima CYP1A2 (detectado por PCR em tempo real e ensaios enzimáticos), principal enzima de fase 1, responsável pela bioativação de PhIP.

Todos esses dados vêm contribuir para um conhecimento mais aprofundado a respeito do mecanismo de ação das moléculas encontradas nas espécies de *Syngonanthus* (Eriocaulaceae) e nos trazem mais segurança a respeito de um possível uso terapêutico delas.

5.3. Genotoxicidade e Antigenotoxicidade

Para se conhecer o potencial genotóxico e antigenotóxico de um determinado composto, existem testes de genotoxicidade bem definidos e internacionalmente reconhecidos pelas agências reguladoras como parte da bateria de testes recomendada para o registro de

novos produtos que entram no mercado mundial (HAYASHI *et al.*, 2000). O ensaio do cometa é amplamente usado para detecção de danos ao DNA e reparo em células e tecidos de animais e plantas (MOLLER *et al.*, 2010).

Os dados de avaliação da genotoxicidade neste estudo nos mostram que, apesar de existir um dano significativo verificado após 4 horas de tratamento com os extratos Sd, Sn e Ss e com as flavonas 1 e 5, esse dano é reparado pelas células, visto que nenhum dano foi observado em 24 horas de tratamento.

E ainda, os dados da avaliação da antigenotoxicidade mostraram que os extratos Sm, Sn e Ss e as isoladas 3, 4, 5, 6 e 7, além da mistura M, foram capazes de inibir os danos causados pelo MMS no tratamento simultâneo de 30 minutos. As substâncias 1 e 2 também foram consideradas antigenotóxicas, mas no pós tratamento com o MMS, de 4 horas.

Portanto, se compararmos os resultados de genotoxicidade com os de antigenotoxicidade, verificamos que dentre as isoladas, apenas 1 (luteolina) e 5 (7-metoxiluteolina-8-C- β -glicopiranosídeo) foram tanto capazes de induzir danos no DNA quanto de protegê-lo quanto aos danos causados pelo MMS. A luteolina induziu danos no DNA após 4 horas de tratamento, em baixas concentrações (0,1 μ g/ml), mas foi capaz de proteger o material genético a partir de concentrações um pouco maiores (2,5 μ g/ml). Já o seu derivado glicosilado foi capaz de, na mesma concentração (2,5 μ g/ml), induzir danos nas células tratadas por 4 horas e também de impedir a ação danosa do MMS em 30 minutos.

No sentido de contribuir para um maior entendimento a respeito das atividades genotóxicas e antigenotóxicas, seu mecanismo de ação e efeitos, exercidos por compostos obtidos de produtos naturais mais comuns, dados de pesquisas realizadas desde a última década até bem recentemente foram apresentados e discutidos.

O efeito genotóxico e genoprotetor dos flavonóides luteolina, kaempferol e apigenina em linfócitos periféricos humanos, expostos e não expostos ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), foram investigados através do Ensaio do Cometa por Rusak *et al.* (2010). Os flavonóides revelaram um efeito genoprotetor significativo em células expostas ao H_2O_2 e em células submetidas a longos períodos de incubação em meio de cultura. A luteolina, seguida pela apigenina e pelo kaempferol, mostrou ser a mais efetiva em proteger o DNA dos danos oxidativos gerados pelo peróxido de hidrogênio. Entretanto, os flavonóides pesquisados também induziram dano no DNA, indicando a sua capacidade pró-oxidante. O balanço entre a proteção do DNA contra o dano oxidativo e os efeitos pró-oxidantes foi fortemente dependente da concentração do flavonoide e do período de incubação. Esses dados apontam para o comportamento dúbio da luteolina e corroboram os resultados conflitantes obtidos neste estudo.

No mesmo contexto, Ferguson *et al.* (2005) e Marcarini *et al.* (2011) também descreveram evidências de que alguns compostos podem tanto induzir como prevenir danos no DNA. Por esta razão, antes de se estabelecer qualquer estratégia quimiopreventiva, faz-se necessário saber sob quais condições tal composto promove benefícios e previne danos no genoma.

Os resultados obtidos neste estudo nos fazem refletir acerca dos benefícios e malefícios de uma possível utilização desses compostos na terapêutica contra o câncer. É sabido que os danos no material genético causados por agentes mutagênicos tendem a ser reparados por enzimas de reparo, mas, caso a célula se divida antes que o reparo ocorra, este dano pode levar ao aparecimento de uma alteração permanente no DNA, que é dependente da quantidade e tipo do agente genotóxico.

Para o surgimento de um tumor, esta alteração deve ocorrer em determinadas regiões de genes que estimulam (proto-oncogenes) e/ou inibam (genes supressores tumorais) a proliferação celular, levando, assim, ao ganho ou perda da função desses genes. Essas alterações, invariavelmente, fazem com que a célula afetada tenha maior chance de adquirir novas alterações. Logo, os danos fixados no DNA, além de serem irreversíveis, são também cumulativos, e após um determinado número de alterações nesses genes, que variam entre 5 a 7, a célula torna-se neoplásica (PINTO e FELZENSWALB, 2003). Portanto, entre a exposição ao agente mutagênico/genotóxico e o início da carcinogênese existe uma tênue linha; logo, ao ultrapassar esta linha, estes agentes passam a ser carcinogênicos, sendo relevantes os mais variados estudos sobre o processo de mutagênese e carcinogênese.

Nesse sentido, o trabalho de Kozics *et al.* (2011) vem esclarecer alguns pontos cruciais a respeito de como a estrutura dos flavonoides influencia na inibição dos danos causados pelo BaP em células HepG2. Verificou-se que os flavonoides fisetina, kaempferol, galangina, quercetina e luteolina, que são hidroxilados nas posições 3' e 4', do anel B, na posição 3 do anel C e no anel A, foram capazes de inibir significativamente os efeitos genotóxicos induzidos pelo BaP em um grau muito maior do que os flavonoides crisina, 7-hidroxiflavona, 7,8-dihidroxiflavona e baicaleina (hidroxilada no anel A), que mostraram inibição da genotoxicidade estatisticamente significativa principalmente nas suas concentrações mais altas (10 a 25µM). Ainda, avaliaram a antigenotoxicidade da rutina, que contém a hidroxila da posição 3 no anel C substituída pelo açúcar rutinose, e verificaram que a mesma não foi capaz de inibir efetivamente as mudanças genotóxicas induzidas pelo BaP. Esses resultados mostram que o padrão de hidroxilação dos flavonóides é crucial para o aparecimento da atividade antigenotóxica e que a glicosilação a desfavorece. Portanto, esses dados apontam para uma característica positiva relativa à luteolina, também avaliada neste estudo frente às

células HepG2, onde foi observada a sua capacidade de proteger essas células, que tem intensa capacidade metabolizadora, contra danos no material genético.

Ainda, Rusak *et al.* (2010) descrevem os efeitos citotóxicos, genotóxicos e protetor do material genético que os flavonoides desempenham e por quais mecanismos isso acontece. Observou-se que os flavonoides desempenharam tais atividades através da influência que exercem nas atividades de algumas enzimas, como a proteína quinase dependente de fosfolípídeo de cálcio, a tirosina quinase, a fosforilase quinase, a fosfatidilinositol quinase e as topoisomerases, além de influenciar na expressão da citocromo 1A1 e nos níveis celulares de glutathione. E verificaram também que embora os flavonoides possam prevenir danos celulares, causados pelos radicais livres, pela formação menos danosa de complexos através da indução da enzima glutathione, os mesmos podem também atuar como pro-oxidantes pelo mesmo mecanismo.

Portanto, esse estudo com os extratos e substâncias isoladas de *Syngonanthus*, aliados aos dados da literatura, vem contribuir para um maior conhecimento acerca do potencial genotóxico e/ou protetor de danos no DNA dos polifenóis, e visto que as substâncias isoladas 2, 3, 4, 6 e 7, e a mistura M, não foram consideradas genotóxicas nas concentrações e protocolos avaliados e ainda foram capazes de proteger o material genético contra danos causados pelo agente alquilante MMS neste estudo, esses resultados, assim como os de mutagênese e antimutagênese, também apontam para uma maior segurança numa possível utilização terapêutica desses compostos.

5.4. Citotoxicidade

Ensaio de atividade citotóxica representam uma ferramenta na avaliação de compostos com potencial atividade terapêutica (PAILLARD *et al.*, 1999). A importância de

se realizar testes preliminares de citotoxicidade em compostos com atividades biológicas reside no fato desses testes detectarem se esses compostos causam morte das células ou outros efeitos negativos nas funções celulares, o que os impediria de serem utilizados para fins terapêuticos.

E no contexto do uso desses compostos frente a células cancerosas, a importância de se conhecer o potencial citotóxico de um composto se encontra na busca por compostos que causem morte celular significativa e, de preferência, seletiva.

Baseado nisso, os extratos Sd, Sm, Sn e Ss e suas oito substâncias isoladas, mais a mistura M, foram avaliados quanto a sua capacidade de causar a morte celular das células de hepatocarcinoma (HepG2) e de carcinoma mamário (MCF-7/BUS).

Os dados obtidos nos revelaram um maior potencial em causar a morte celular das células HepG2 do que das MCF-7/BUS, no tratamento de 24 horas. Adicionalmente, as células MCF-7/BUS foram avaliadas com os mesmos compostos por 144 horas, pois esses resultados foram utilizados para delinear as concentrações não tóxicas que foram utilizadas no ensaio de proliferação *E-screen*.

Para a linhagem de hepatocarcinoma, verificou-se que todos os extratos, exceto Sm, e todas as substâncias isoladas foram capazes de induzir morte celular acima de 20%. O extrato Sn e as xantonas 3 e 4 e a mistura M, alcançaram índices de morte celular maiores que 50% e seus IC_{50} foram estabelecidos. Verificou-se que as xantonas isoladas foram 5 vezes menos tóxicas que a doxorrubicina para as células de hepatocarcinoma. Já para a linhagem MCF-7/BUS foram encontrados valores de IC_{50} muito acima desse descrito para a doxorrubicina.

A doxorrubicina é um antibiótico antracíclico isolado da cultura do fungo *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, utilizado atualmente em várias neoplasias como carcinomas de mama, pulmões, tireoide e carcinomas ovarianos, por exemplo. Seu mecanismo de ação envolve a inibição da enzima topoisomerase II e RNA polimerases,

relacionadas à síntese de DNA. A doxorubicina também se liga aos ácidos nucleicos pela intercalação específica do núcleo planar da antraciclina com a dupla hélice do DNA, ocorrendo quebras uni ou bifilamentares. E ainda possui em sua estrutura um anel de quinona e de hidroquinona com potencial de formação de radicais livres que atuam como agentes alquilantes importantes como água oxigenada, ferro, hidroxila e cálcio (KALYANARAMAN *et al.*, 2002; MYERS, 1998). A presença de doxorubicina e dos radicais livres formados são responsáveis por danos importantes no DNA (TEWEY *et al.*, 1984). Possuindo também atividade sobre a membrana celular, a doxorubicina se liga tanto a ela como a proteínas plasmáticas, alterando suas funções (TRITTON *et al.*, 1978).

Mas apesar dessa terapêutica do câncer ser de grande valia, ao longo dos últimos anos, uma mudança de paradigma vem ocorrendo na área da oncologia. O foco no desenvolvimento de novas drogas antitumorais é o uso de terapias alvo, visando o controle de vias ativas na gênese tumoral. Atualmente existe mais de 4000 drogas em desenvolvimento através de estudos de fase I a IV no mundo e a uma parte importante delas pertence à classe de terapias alvo (CENTERWATCH, 2012). Esta linha de pesquisa é proveniente da melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento tumoral. Algumas drogas desenvolvidas através deste modelo já se mostraram efetivas inclusive em estudos clínicos e estão incorporadas na prática clínica atual como o uso de bloqueadores de EGFR, bloqueadores de mTOR e antagonistas de VEGF.

Nesse contexto, os dados deste estudo referentes ao potencial citotóxico dos extratos e substâncias isoladas, obtidos de plantas do gênero *Syngonanthus*, vem contribuir na busca de novos compostos que atuem contra as células cancerosas.

5.5. Estrogenicidade

Dados da literatura apontam que moléculas obtidas de plantas podem ter um papel benéfico nos cuidados da saúde humana (ANTER *et al.*, 2011; CUSHNIE e LAMB, 2005). Alguns autores descrevem que algumas moléculas que são estruturalmente semelhantes ao estradiol, podem atuar como interferentes endócrinos e apresentar efeitos semelhantes ou contrários aos do estrógeno, e assim, serem tanto benéficas quanto maléficas para o indivíduo que fizer uso (COLIN *et al.*, 2008; HAVSTEEN, 2002; PLISKOVA *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2008; ZAND *et al.*, 2002).

Embora alguns interferentes endócrinos apresentem papéis deletérios para o homem, existem relatos da literatura de que alguns deles, os fitoestrógenos, demonstram ter potencial terapêutico e preventivo na ginecologia. Tem-se observado desde a última década que, com interesse em maior segurança, os fitoestrógenos possam ser utilizados para substituir os estrógenos na terapia de reposição hormonal (HAYS *et al.*, 2003).

Dados epidemiológicos tem revelado que a ingestão de alimentos contendo fitoestrógenos pode prevenir o câncer de mama e outros cânceres hormônio-dependentes (INNOCENTI *et al.*, 2007; TAKEMURA *et al.*, 2013; VIRK-BAKER *et al.*, 2010). Apesar de décadas de estudos, os riscos e benefícios da terapia de reposição hormonal com estrógenos sintéticos em mulheres saudáveis na pós-menopausa permanece incerto (NAEYER *et al.*, 2004; INNOCENTI *et al.*, 2007). A deficiência de estrogênio durante a menopausa pode provocar muitos problemas de saúde, tais como ondas de calor, também chamadas de fogachos, insônia, secura vaginal, dores articulares, alterações do humor, redução da densidade óssea, doenças cardiovasculares e osteoporose (KANG *et al.*, 2006).

A terapia estrogênica é muito empregada na sintomatologia vasomotora e nas repercussões genitais do hipoestrogenismo. Por estes motivos, a ingestão de fitoestrógenos

pode melhorar a qualidade de vida da mulher na pós-menopausa (VIEIRA *et al.*, 2007). Contudo, por exemplo, na etiologia do câncer de mama, os estrógenos sintéticos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do tumor. Sugere-se que os mecanismos do estrógeno envolvidos na carcinogênese sejam estimulando a transformação e proliferação celular e/ ou agindo como iniciador do tumor através da indução de danos ao DNA pelos seus metabólitos.

A ação inicial do tumor pode ser devido à hidroxilação do principal estrógeno utilizado por mulheres na pré-menopausa, 17- β -estradiol em estrógeno catecol 2-hidroxiestradiol (2-OHE₂) e 4-hidroxiestradiol (4-OHE₂). Quando não inativado, o estrogênio catecol pode ser oxidado a quinonas reativas. Quinonas de 2-OHE₂ podem formar aductos de DNA que se mantêm estáveis no DNA, quando não reparado, mas quinonas de 4-OHE₂ podem formar aductos de DNA depurinados, um evento comum de iniciação de tumor em cânceres humanos (VAN DUURSEN *et al.*, 2004).

Takemura *et al.* (2013) descreveram o papel fundamental que a ingestão de flavonoides pode desempenhar na prevenção do câncer de mama. Através da sua capacidade quimiopreventiva, especialmente relacionada à regulação hormonal mediada por REs, ciclos de oxi-redução gerados pelos metabólitos do estrógeno e de sua inibição seletiva da enzima CYP1B1, já identificada como responsável pela formação das quinonas reativas e consequentes aductos de DNA, é que certos flavonoides estão sendo associados com a redução de câncer de mama.

Entretanto, é bem estabelecido que fitoestrógenos pertencem a diferentes classes de compostos, portanto, estruturas químicas sozinhas não são suficientes para predizerem a atividade estrogênica. Por essa razão, investigações químicas guiadas por ensaios biológicos podem acrescentar importantes informações a respeito da sua atividade estrogênica.

Dentro do propósito da contribuição para a busca de fitoestrógenos, avaliou-se a estrogenicidade, primeiramente utilizando a metodologia do Teste RYA e depois com o Ensaio *E-screen*, de quatro extratos metanólicos dos capítulos das espécies, pertencentes à Família Eriocaulaceae, *Syngonanthus dealbatus*, *S. macrolepis*, *S. nitens* e *S. suberosus*, oito substâncias isoladas (entre elas, flavonóides e xantonas) e mais a mistura (M) (A- 1,3,6-trihidroxi-2-metoxixantona e B- 1,3,6-trihidroxi-2,5-dimetoxixantona), isolada dos capítulos de *S. nitens*.

Os resultados obtidos na avaliação do teste RYA apontam o extrato metanólico de *S. nitens* (Sn) como uma possível fonte de fitoestrógenos, pois, foi o único dentre os extratos testados, que apresentou resultados expressivos e estatisticamente relevantes no ensaio. Foi verificado ainda que em seus capítulos e escapos foram encontrados flavonoides e xantonas, sendo essas últimas encontradas apenas no extrato metanólico dos capítulos (PACIFICO *et al.*, 2011). No extrato metanólico de escapos de Sn e nos extratos das demais espécies foram encontrados apenas flavonóides (CARDOSO *et al.*, 2012; PACIFICO *et al.*, 2011; DA SILVA, 2008).

Além dos extratos, as substâncias 1 a 8, juntamente com a mistura M, foram testadas no ensaio RYA. Os resultados apontam para a estrogenicidade das xantonas apenas (2, 3 e 4, e da mistura M). Os flavonóides 1, 5, 6, 7 e 8 não apresentaram resultados positivos.

Para explicar a estrogenicidade das xantonas encontradas nos capítulos de *S. nitens*, relembrar-se-á o mecanismo de interação de interferentes endócrinos com o RE, que foi descrito por Hubbard *et al.* (2000). Nesse mecanismo são verificadas as características necessárias para que haja a interação dos receptores com os interferentes e as características que a prejudicam. O centro do RE é constituído de uma cavidade hidrofóbica, a qual reconhece uma variedade de compostos estruturalmente distintos. O reconhecimento é

alcançado através da combinação de ligações de hidrogênio específicas e da complementaridade de resíduos hidrofóbicos que recobrem a cavidade do receptor com a natureza apolar dos ligantes. De acordo com essas características, provavelmente moléculas que apresentem hidroxilas livres, em posições estratégicas (ex. opostas, como na molécula do estradiol), e núcleos esteroidais como os do estradiol, apresentarão afinidade com o RE e consequentemente, atividade estrogênica.

As xantonas 2, 3 e 4, assim como as A e B, que compõem a mistura M, são moléculas que apresentam um núcleo semelhante ao esteroidal, hidroxilas livres e metoxilas como substituintes, ao invés das moléculas de açúcar presentes na maioria dos flavonóides avaliados neste estudo (Figura 9). Essas características são extremamente importantes e discutem a favor da interação dessas moléculas com o RE.

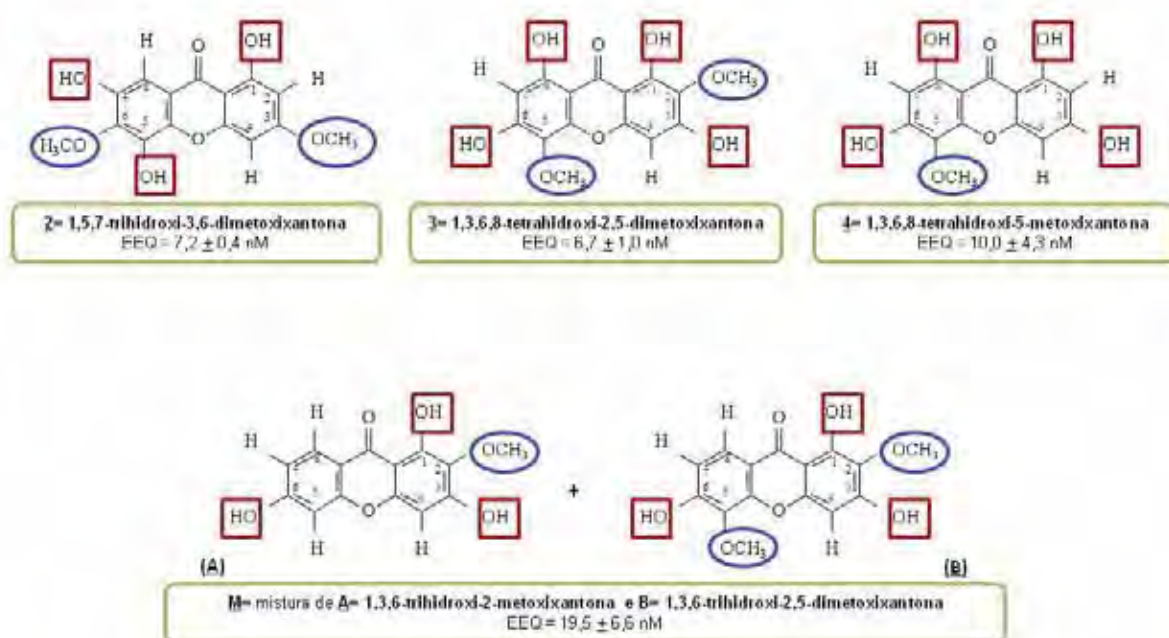


Figura 9. Estruturas das xantonas e seus valores EEQ encontrados no teste RYA. No detalhe, em vermelho, suas hidroxilas e, em azul, suas metoxilas.

A xantonas 2 e 3 apresentaram atividade estrogênica moderada, sendo seus valores de EEQ menores que os apresentados pela mistura M e pela xantona 4. E, ao comparar as estruturas químicas destas moléculas, verificou-se que 2 e 3 apresentavam 2 metoxilas em seu núcleo fundamental. Já as xantonas 4 e A apresentavam apenas uma metoxila na posição 2. Como 2 e 3, apresentaram resultados menos expressivos, sugere-se que a presença de duas metoxilas atrapalhe a interação com o RE e que apenas uma metoxila, presente, dificultaria menos essa interação.

Algumas pesquisas relevantes no assunto da estrogenicidade abordam a relação entre a estrutura dos compostos e a sua similaridade com a estrutura do estradiol e corroboram os dados encontrados no ensaio RYA. Choi *et al.* (2008) verificaram que a substituição de grupos hidroxila por grupos metoxila em flavonóides reduzia a afinidade de ligação com o RE, indicando, portanto, que os grupos hidroxila são cruciais para a atividade de ligação. Morito *et al.* (2002) verificaram que a análise por raios-X da ligação do receptor β com a genisteína (Figura 10) sugere que a hidroxila da posição 7 corresponde à hidroxila da posição 3 do 17- β -estradiol e a hidroxila da posição 4' corresponde à hidroxila da posição 17 do hormônio. Verificaram também que a metoxilação e a glicosilação desses sítios geralmente enfraquece a ligação com os REs e a indução de expressão gênica.

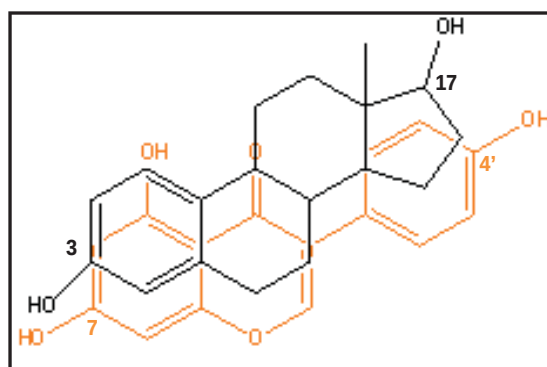


Figura 10. Comparação entre as estruturas da genisteína (laranja) e do 17- β -estradiol (preto).

As xantonas, isoladas de *S. nitens*, apesar de apresentarem metoxilas em sua estrutura, foram consideradas estrogênicas ao passo que as flavonas não, provavelmente devido à posição estratégica de suas hidroxilas e ao fato de a maioria das flavonas serem glicosiladas.

Ainda Choi *et al.* (2008) verificaram a afinidade de flavonas de se ligar ao RE e observaram que elas apresentaram atividades estrogênicas fracas. Eles compararam a sua atividade estrogênica com a de isoflavonas e avaliaram os seus aspectos estruturais, pois elas apresentam similaridades. Observaram que apesar da apigenina ter um anel bifênil que contém grupos hidroxilas nas posições 5 e 7, assim como a genisteína, a posição do anel B ligado ao anel C é diferente e essa diferença estrutural demonstrou diminuir a atividade estrogênica (Figura 11). Esses dados também vêm a corroborar os resultados obtidos, pois relatam a fraca estrogenicidade associada às flavonas.

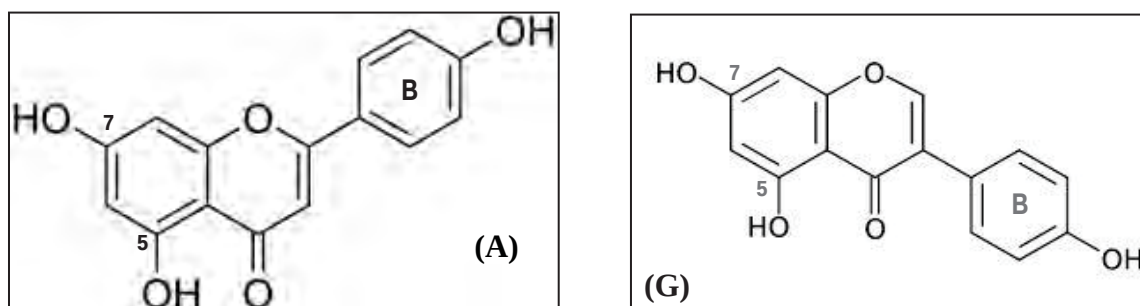


Figura 11. Estruturas de (A) apigenina e (G) genisteína.

No ensaio RYA, utiliza-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que foi geneticamente modificada através da inserção de dois plasmídeos. O primeiro, constitutivo, codifica o receptor de estrógenos humano (RE), sem que nenhum estímulo externo seja necessário. O segundo plasmídeo, carrega o gene *Lac-Z*, que codifica a enzima β -galactosidase, tem sua expressão controlada por ligantes do RE. Trata-se de um mecanismo

bastante simplificado, onde apenas a interação dos ditos interferentes endócrinos com os RE, e como essa pode ser facilitada ou dificultada, são abordados quando se busca uma explicação para a estrogenicidade encontrada. Já nos ensaios em que células, que possuem os RE em sua membrana e são responsivas a eles, outros mecanismos podem ser abordados para explicar a estrogenicidade encontrada através dessa metodologia.

Baseado nisso, discutem-se os resultados obtidos através do ensaio *E-screen*, onde células de carcinoma mamário (MCF-7/BUS) foram utilizadas. Essas células possuem os RE e são responsivas a eles, além de possuírem outros mecanismos pertinentes somente a si mesmas para contribuir para sua sobrevivência e proliferação.

Dos resultados do ensaio *E-screen*, pode-se verificar que nenhum dos extratos foi considerado estrogênico ou capaz de causar estímulo proliferativo nas células MCF-7/BUS acima de 25%, em relação aos controles negativo e positivo (EPR) (SOTO *et al.*, 1995). Já dentre as isoladas, todas, exceto a flavona 6, que foi inativa ou não estrogênica, foram consideradas agonistas parciais dos RE, mantendo seus EPR entre 25 a 80% e, portanto, causaram proliferação intermediária das células MCF-7/BUS. A única amostra, dentre todas avaliadas, a apresentar-se como agonista total dos RE foi a mistura M. Os dados de sua avaliação mostram que ela apresentou estímulo proliferativo nas células MCF-7/BUS acima de 80% em mais de uma de suas concentrações testadas.

A partir desses dados, explica-se estrogenicidade dessas moléculas por mecanismos que englobam os RE, mas também, permite-se abordar outros mecanismos de ação. A literatura reporta que, como mecanismos independentes dos REs, os fitoestrógenos podem agir por meio da inibição de aromatase (RICE *et al.*, 2007; VIRK-BAKER *et al.*, 2010), por estimulação da globulina que se liga aos hormônios sexuais, especificamente a testosterona e

o estradiol, por alterações no metabolismo do estrogênio e pela inibição da reciclagem entero-hepática de estrógenos endógenos e xenobióticos (PIERSEN, 2003).

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

Os dados destes ensaios de proliferação não nos permitiram estabelecer quais estruturas seriam as responsáveis pela atividade estrogênica encontrada, já que através desse ensaio verificou-se o caráter proliferativo tanto das xantonas como das flavonas, atestando inclusive que, dentre as duas classes, havia substâncias muito estrogênicas, como as xantonas que compunham a mistura M, com EPR acima de 80%; como a xantona 3, com EPR de 75%, em pelo menos uma de suas concentrações testadas; e a flavona 5, também com EPR de 75%. Mas também essa metodologia mostrou que tanto algumas xantonas quanto algumas flavonas tinham fraca capacidade estimulatória sobre as células de carcinoma mamário, mostrando que a luteolina (1) apresentou um EPR de 35%; as xantonas 2 e 4, EPRs de 44% e 49%, respectivamente, e ainda que a flavona 8 apresentou um EPR de 40%.

Portanto, de todos os dados de estrogenicidade apresentados, tanto no Teste RYA, como no Ensaio *E-screen*, podemos dizer que, dentre os extratos, Sn possui caráter

estrogênico, provavelmente devido à presença de xantonas em sua composição e que tanto esse extrato, quanto as suas xantonas, especialmente a 4 e a A, da mistura M, poderiam ser fonte de futuros estudos relacionados aos substituintes da terapia hormonal, depois que outros ensaios, inclusive os ensaios *in vivo* de estrogenicidade, confirmassem seu caráter estrogênico e que ensaios de toxicidade atestassem seu caráter não prejudicial.

5.6. Modulação da Expressão Gênica

A heterogeneidade celular e molecular dos tumores de mama e o grande número de genes potencialmente envolvidos no controle do crescimento, na morte e na diferenciação celular, enfatizam a importância de se estudar as múltiplas alterações genéticas que podem ocorrer nas células tumorais. A análise de expressão gênica tem demonstrado a capacidade de identificar as características que refletem a biologia molecular e o comportamento do tumor, podendo revelar novos marcadores genéticos, os que estão relacionados à recorrência e progressão da doença e com isso contribuir para a terapêutica antitumoral (ROSA, 2007).

No sentido de contribuir para maior conhecimento a respeito do mecanismo de ação pelo qual um composto pode agir na terapêutica antitumoral, foi empregada neste estudo a metodologia de *PCR Array* que nos permitiu analisar o padrão diferencial da expressão dos principais genes envolvidos em diferentes vias como angiogênese, ciclo celular, apoptose, adesão, entre outras.

Entre os 84 genes avaliados na via de câncer de mama, 23 (27,4%) apresentaram alterações na expressão quando comparados ao controle. Desses, 21 (91,3%) apresentaram a expressão diminuída (*ABCB1*, *AR*, *BCL2*, *ESR1*, *GATA3*, *GRB7*, *KRT18*, *KRT19*, *KRT8*, *MAPK3*, *MGMT*, *MUC1*, *PGR*, *PTGS2*, *PYCARD*, *SLIT2*, *SRC*, *TFF3*, *TGFB1*, *THBS1* e *TP53*) e 2 (8,7%) apresentaram a expressão aumentada (*ID1* e *VEGFA*).

No sentido de contribuir para um maior entendimento a respeito do mecanismo molecular exercido pela mistura M, os possíveis efeitos da expressão alterada dos 23 genes, identificados neste estudo, dados de pesquisas realizadas desde a última década até bem recentemente foram apresentados, discutidos e relacionados com os nossos resultados.

É conhecido que células de câncer de mama frequentemente dependem de estrógeno para se proliferar. Com isso, o tratamento desse tipo de câncer com compostos antiestrogênicos leva a alterações no ciclo celular ou apoptose. O efeito proliferativo do estradiol é mediado por RE α que regula múltiplos fatores envolvidos no ciclo celular (FRASOR *et al.*, 2003). Em nosso estudo, a mistura M foi capaz de inibir em 2,64 vezes a expressão do gene *ESR1*, que codifica o receptor de estrógeno alfa (RE α). Essa característica seria responsável por diminuir a capacidade proliferativa das células MCF-7/BUS, porém os resultados do ensaio do *E-screen* mostraram que essa mistura foi capaz de proliferar a célula, evidenciando-a como um agonista total dos RE.

Os nossos resultados de *PCR Array* então, apesar de parecerem conflitantes com os resultados obtidos nos ensaios de estrogenicidade, nos fazem refletir a respeito do mecanismo de ação das moléculas que constituem a mistura. Devemos considerar a hipótese de que a proliferação celular, encontrada no ensaio *E-screen*, pode ter vindo de outras vias, que não a que englobam o RE, pois algumas substâncias isoladas que foram consideradas proliferativas no *E-screen*, apresentaram resultados negativos no RYA.

No teste RYA, utiliza-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que possui um plasmídeo constitutivo onde o gene *HEO*, o qual codifica para o receptor de estrógeno humano (RE), está presente. Trata-se de um mecanismo bastante simplificado, onde apenas a interação da substância-teste com os RE e a percepção dessa interação pelo elemento responsivo ERE, que está num segundo plasmídeo, é que explica a estrogenicidade encontrada. Portanto, a expressão do gene do RE independe da quantidade ou da concentração de amostra utilizada e

o mecanismo de detecção de estrogenicidade necessariamente engloba esse receptor. Já nos ensaios em que são utilizadas as células MCF-7/BUS, que possuem os RE em sua membrana e são responsivas a eles, além da expressão do gene (*ESR1*), que codifica para o RE, outros mecanismos explicam a capacidade proliferativa encontrada para essa mistura.

A literatura reporta que a formação de neoplasias se dá pelo desequilíbrio entre a proliferação celular (ciclo celular) e a apoptose (morte celular programada). Estes eventos são controlados por uma grande quantidade de genes, que, ao sofrerem mutações, podem ter seus produtos expressos de maneira alterada, iniciando a formação de um tumor. As mutações em duas grandes classes de genes – oncogenes e genes supressores de tumores – têm papel fundamental na indução do câncer. Esses genes codificam vários tipos de proteínas que controlam o crescimento e a proliferação celulares (SILVA *et al.*, 2013).

Os genes supressores de tumores atuam como freios das células; eles codificam proteínas que retardam o crescimento celular e impedem as células de tornarem-se malignas. Os oncogenes, por outro lado, codificam proteínas que promovem a perda do controle do crescimento e a conversão de uma célula normal para um estado maligno; como resultado, os oncogenes atuam como aceleradores da proliferação celular e tumorigênese. São proto-oncogenes que sofreram mutações ativadoras, ou seja, que passaram a ter ganho de função ou hiper-expressão. Esses genes são responsáveis por aumentar a proliferação celular, ao mesmo tempo em que inibem a apoptose, eventos que dão início a uma neoplasia (SILVA *et al.*, 2013).

Dentre os genes que tiveram a expressão alterada neste estudo, sem dúvida o mais reportado na literatura é o *TP53*. Esse gene codifica uma proteína supressora de tumor que contém domínios responsáveis por ativação transcricional, ligação com DNA e oligomerização. A proteína codificada responde a diversos estresses celulares ao regular a

expressão de genes alvo, induzindo, assim, parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo no DNA ou alterações no metabolismo. As mutações neste gene estão associadas com uma variedade de cânceres humanos, como a síndrome de Li-Fraumeni (NCBI, 2013).

A ativação da via de transdução de sinal dependente de p53 é uma das respostas das células cancerosas aos danos causados pela radiação ionizante (KASTAN *et al.*, 1991). Ela regula a indução de apoptose induzida por radiação (LOWE *et al.*, 1993). Muitos estudos recentes mostram que os cânceres de mama que possuem mutações em p53 são mais susceptíveis a recorrência, tem um fenótipo mais agressivo, pior sobrevivência (JANSEN *et al.*, 1998) e estão associados com o aumento de falha em pacientes tratados com radioterapia pós-mastectomia (ZELLARS *et al.*, 2000). Em nossos experimentos, a mistura M causou a diminuição da expressão do gene *TP53* (-1,80) e isso se relaciona fortemente com a diminuição da susceptibilidade das células MCF-7/BUS a apoptose e pode ser um dos fatores que contribuiu para a proliferação dessas células.

Outro gene avaliado neste estudo foi o *ID1*, que é um gene inibidor da diferenciação e da ligação com DNA e que tem se mostrado estimulador da proliferação celular e expresso em células-tronco embrionárias, adultas e cancerosas (BARRETT *et al.*, 2012; NAM *et al.*, 2009; PERK *et al.*, 2005). Tem-se visto ainda que *ID1* desempenha um papel importante na angiogênese tumoral (LYDEN *et al.*, 1999). *ID1* está mais expresso em células-tronco neuronais e de gliomas (BARRET *et al.*, 2012; NAM *et al.*, 2009). A mistura M foi capaz de aumentar a expressão do gene *ID1* em 1,79 vezes, fato que pode ter contribuído para aumentar a proliferação das células MCF-7/BUS.

A mistura M ainda foi capaz de aumentar a expressão do gene *VEGFA* em 1,91 vezes. Esse gene é um membro da família de fatores do crescimento PDGF/VEGF e codifica uma proteína que especificamente atua nas células endoteliais e possui vários efeitos, incluindo a

mediação do aumento da permeabilidade vascular, a indução de angiogênese, a vasculogênese e o crescimento celular endotelial, promovendo migração celular e inibindo a apoptose. Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de redes de capilares existentes. Esse vaso sanguíneo que cresce e se modela, que é uma parte normal do crescimento de órgãos e da fisiologia adulta, pode ser recrutado para suprir tumores pela estimulação do crescimento de novos ramos de vascularização no órgão hospedeiro (BENDER e MAC-GABHANN, 2013). A expressão aumentada desse gene, causada pela mistura M, desfavorece a apoptose e aumenta a proliferação celular.

O receptor de androgênios, um membro da superfamília de receptores nucleares, regula seus genes alvo através de elementos específicos responsivos a androgênios (ARE) em regiões promotoras. O gene *AR* tem sido extensamente estudado como um oncogene em câncer de próstata e tem um papel estabelecido na carcinogênese de próstata. Entretanto, evidências sugerem que o *AR* possa ter um efeito anti-tumorigênico em câncer de mama. A manutenção da função do *AR* em tumores de mama de pacientes tem sido relatada como significativamente associada com aumento da sobrevida e bom prognóstico (AGOFF *et al.*, 2003; LOIBL *et al.*, 2011; OGAWA *et al.*, 2008). Estudos anteriores sugerem que os androgênios também podem induzir apoptose em células de câncer da mama (KAMPA *et al.*, 2005; KANDOUZ *et al.*, 1999). Até agora, o mecanismo de como androgênios suprimem a proliferação e induzem a apoptose no câncer da mama não é completamente compreendido. A mistura M causou a inibição da expressão desse gene em 2,29 vezes, o que também pode ter contribuído para a proliferação das células MCF-7/BUS.

Os genes *GATA3* e *THBS1* tiveram a sua expressão diminuída pela mistura M em 2,51 e 1,81 vezes, respectivamente. A função desses genes não está relacionada com apoptose ou, conseqüentemente, proliferação celular, portanto a sua expressão diminuída não se relaciona aos resultados obtidos nos outros testes aplicados à mistura M, mas como esses genes estão

associados à angiogênese e metástase, seus dados serviram para compreendermos melhor o mecanismo de ação das xantonas que compõem a mistura M.

Na glândula mamária adulta, *GATA3* atua sobre epitélio ductal para manter a diferenciação de células epiteliais luminais (ASSELIN-LABAT *et al.*, 2007; KOUROS-MEHR *et al.*, 2008a; 2006); portanto, *GATA3*, é reconhecido como um regulador chave do desenvolvimento do tecido mamário e a formação da glândula mamária. Estudos com técnicas de expressão diferencial de genes têm mostrado que *GATA3* é mais expresso em cânceres de mama RE-positivo de fase inicial do que em outros cânceres invasivos de mama RE-negativo, que estão associados a piores resultados (BERTUCCI *et al.*, 1999; 2000; GARCIA-CLOSAS *et al.*, 2007; HOCH *et al.*, 1999; MEHRA *et al.*, 2005; SORLIE *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 1999). De acordo com esses dados, há um estudo que mostra uma correlação significativa entre elevados níveis de *GATA3* e capacidade de resposta do câncer de RE-positivo à terapia hormonal (PARIKH *et al.*, 2005). Em conjunto, esses dados indicam que *GATA3* emerge como um forte preditor de diferenciação do câncer de mama, da capacidade de resposta ao estrogênio, e do resultado clínico favorável. Ainda, *GATA3* tem sido associado ao aumento da diferenciação de células cancerosas e posterior supressão de metástases, através da reversão de um evento conhecido como transição epitelial-mesenquimal (EMT), do inglês, *epithelial-mesenchymal transition* (KOUROS-MEHR *et al.*, 2008b). Portanto, a diminuição da expressão desse gene (-2,51), causado pela mistura M, desfavorece a terapia hormonal no câncer RE-positivo e aumenta a ocorrência de metástases.

O gene *THBS1* codifica a proteína trombospondina, que é uma proteína anti-angiogênica (REN *et al.*, 2006). A expressão do gene *THBS1* está basalmente inibida em células cancerosas, mas substâncias podem estimular a sua expressão (GLINSKII *et al.*, 2009) e tal atividade é uma via contrária à sobrevivência das células cancerosas, pois a angiogênese

permanece inibida. A mistura M diminui a expressão desse gene (-1,81) e pode favorecer o aumento da angiogênese.

Mas ao contrário das funções deletérias descritas anteriormente, ocasionadas pela alteração da expressão dos genes *TP53*, *ID1*, *VEGFA*, *AR*, *GATA3* e *THBS1*, a mistura M foi capaz inibir funções deletérias de alguns genes ou de estimular a função benéfica de outros.

A expressão do proto-oncogene *BCL2* foi inibida pela mistura M (-1,88). Esse gene é capaz de proteger a célula cancerosa da apoptose, permitindo que células danificadas geneticamente continuem a se replicar (CHEN *et al.*, 2000). A presença de altos níveis da proteína bcl-2, aumentando a sobrevivência da célula pode facilitar a aquisição de mutações em outros genes supressores tumorais e oncogenes resultando numa expansão clonal atípica (KANNAN *et al.*, 1998). Drachenberg *et al.* (1997) afirmaram ser possível também a expressão nuclear da proteína bcl-2, mais em tumores malignos. A localização nuclear da proteína bcl-2 está relacionada provavelmente a sua função na proteção do DNA contra a ação das endonucleases, inibindo a apoptose. Portanto, a inibição desse proto-oncogene pela mistura M seria um facilitador da apoptose e um ponto positivo no que diz respeito ao seu possível uso com antitumoral.

MGMT é um gene que está associado ao reparo de lesões no DNA, através da indução da enzima O6-metilguanina-DNA metiltransferase. Diminuições na expressão desse gene causam diminuição no reparo e acúmulo de danos, induzindo a célula à apoptose (JI *et al.*, 2012). A mistura M diminuiu a expressão desse gene (-1,96) e isso pode explicar a morte celular induzida pelos compostos que compõem a mistura.

A glicoproteína humana tipo mucina, *MUC1*, é encontrada na membrana plasmática de células secretoras epiteliais normais. O gene *MUC1* é expresso em níveis elevados em toda a superfície das células de carcinoma. A alta expressão de *MUC1* encontrada em carcinomas

humanos e certas malignidades hematológicas induz a transformação e a resistência à apoptose induzida por agentes genotóxicos, espécies reativas de oxigênio e de hipóxia. Estudos demonstram que a MUC1 se liga diretamente a caspase-8 e, assim, impede a ativação da via do receptor de morte apoptótica por via extrínseca (AGATA *et al.*, 2008). *MUC1* foi o gene mais negativamente regulado pela mistura M (-6,10), o que indica um aumento da suscetibilidade à apoptose.

A via de MAPK/ERK (proteína-quinase ativada por mitógeno) é uma das vias de sinalização mais importantes e estudadas, pois, regula o crescimento, a proliferação, diferenciação e sobrevivência de muitos tipos de células (ORTON *et al.*, 2005). As MAPK abrangem grande número de proteínas, tais como ERK1-ERK3 (quinase regulada por sinal extracelular), codificadas pelos genes *MAPK1(ERK2)* e *MAPK3(ERK1)*. A ativação da via de ERK1/2 é normalmente associada à proliferação e à sobrevivência celular (BACUS *et al.*, 2001; YEH *et al.*, 2004, ZHENG *et al.*, 2007). A mistura M regulou negativamente a expressão do gene *MAPK3* (-2,64), mais um ponto que desfavorece a sobrevivência da célula cancerosa.

A prostaglandina-endoperóxido sintase-2 (*PTGS2*) codifica a enzima COX-2, que catalisa a conversão do ácido araquidônico a prostaglandinas (PGs) e outros eicosanoides. A expressão de *PTGS2*, que não é detectável na maioria dos tecidos normais, é induzida em resposta à hipóxia, a citocinas inflamatórias, a promotores de tumores, a fatores de crescimento e outros fatores de stress (LIU *et al.*, 1999; SCHMEDTJE *et al.*, 1997). O gene *PTGS2* está envolvido na carcinogênese, na supressão da resposta imune, na inibição da apoptose, na angiogênese e na invasão das células tumorais e metástases. Estudos recentes têm indicado que a variação genética de *PTGS2* está associada à suscetibilidade ao câncer de mama (DOSSUS *et al.*, 2010; LANGSENLEHNER *et al.*, 2006). A mistura M foi capaz de diminuir a expressão do gene *PTGS2* (-2,33) e com isso pode estar favorecendo a apoptose.

O gene *TFF3* (*trefoil factor 3*), é um oncogene e media a resistência anti-estrogênica em carcinomas mamários humanos. Expressões aumentadas desse gene em células de carcinoma mamário aumentam proliferação e sobrevivência, aumentam o crescimento independente de ancoragem e promovem migração e invasão. Por outro lado, a neutralização desse gene por anticorpos, promove apoptose, diminui o crescimento celular *in vitro* e para o crescimento de tumores xenográficos de mama. Ainda, a expressão aumentada de *TFF3* está significativamente relacionada com a diminuição da sobrevivência de pacientes, com câncer de mama RE-positivo, tratados com tamoxifeno. A expressão forçada de *TFF3* em carcinomas mamários aumentou a atividade transcricional do RE, promoveram o crescimento independente de estrógeno e produziram resistência ao tamoxifeno e ao fulvestranto *in vitro*. O antagonismo funcional de *TFF3*, portanto, merece consideração como uma nova estratégia terapêutica para o carcinoma mamário (KANNAN *et al.*, 2010). A mistura M foi capaz de diminuir a expressão desse gene em 1,97 vezes, sendo mais uma característica positiva a ser agregada ao seu mecanismo de ação.

Os genes *TGFB1*, *SRC*, *ABCB1*, *PGR* e *KRT19* também tiveram a sua expressão alterada e, mesmo não estando relacionados com o aumento da susceptibilidade à apoptose, merecem ser ressaltados pois são pontos favoráveis a respeito do mecanismo de ação da mistura M.

A expressão do gene *TGFB1* foi regulada negativamente (-2,48) pela mistura M. Esse gene é o maior responsável pela indução de EMT. EMT é um processo estritamente controlado e é geralmente induzido por sinais extracelulares. Membros da família de fatores β de transformação do crescimento estão entre os principais e melhor caracterizados indutores de EMT durante o processo de embriogênese e na patogênese do câncer (POLYAK e WEINBERG, 2009). A metástase tumoral é um processo que começa com a migração da célula tumoral e invasão. Estas propriedades muitas vezes requerem a transição epitelial-

mesenquimal (EMT), durante o qual as células epiteliais bem polarizadas e adesivas perdem a polaridade e a adesão intercelular mediada por caderinas, e adquirem um fenótipo fibroblastóide ou mesenquimal de alta motilidade (POLYAK e WEINBERG, 2009; THIERY e SLEEMAN, 2006). Com a expressão diminuída desse gene, ocorre o desfavorecimento das metástases.

Outro gene associado ao desfavorecimento de metástases é o *SRC*, que também foi regulado negativamente (-1,94) pela mistura M. Esse gene está envolvido na regulação de EMT induzida por TGF- β 1 em células sem o gene nm23-H1. Os resultados de Zhang *et al.* (2011) implicam que a SRC quinase tem um efeito direto sobre a EMT induzida por TGF- β 1 e é regulado negativamente por NM23.

Já o gene *ABCB1*, que também foi regulado negativamente (-2,83) pela mistura M, tem sua expressão associada à resistência a quimioterapia. As resistências intrínseca e adquirida a drogas quimioterápicas são uma barreira para o sucesso da quimioterapia do câncer, e proteínas ABC (*ATP binding cassette*), que funcionam como bombas de efluxo de drogas, estão fortemente relacionadas a um mecanismo importante da resistência à quimioterapia (SZAKÁCS *et al.*, 2006). A superexpressão de *ABCB1* [P-glicoproteína (Pgp); MDR1] e *ABCG2* [proteína de resistência a câncer de mama (BCRP); proteína de resistência mitoxantrona (MXR)] está associada a resultados ruins no tratamento de quimioterapia na leucemia mieloide aguda (LMA) (BENDERRA *et al.*, 2004; DAMIANI *et al.*, 2006) e em outras doenças malignas. Dada a forte associação da superexpressão de *ABCB1* e *ABCG2* com falha do tratamento em LMA, a exploração de inibidores de ambas as proteínas e de novas abordagens para a superação da resistência a drogas mediadas por ambas as proteínas se justifica. A mistura M, por inibir significativamente a expressão do gene *ABCB1*, estaria então associada à diminuição da resistência à quimioterapia.

O gene *PGR* que codifica receptores de progesterona é um importante gene que tem sua transcrição diretamente regulada pelo $RE\alpha$. Para confirmar a importância do 17- β -estradiol na expressão de *PGR* através de $RE\alpha$, Won Jeong *et al.* (2012) trataram células MCF-7 com o antagonista de $RE\alpha$ ICI 182.780 e esse tratamento inibiu a expressão de *PGR*. Por outro lado, células $RE\alpha$ - (RE-negativo) não alteraram níveis de expressão de *PGR* após tratamento com o estradiol, isso mostra a relação entre a diminuição da expressão de *PGR* (-2,21) e *ESR1*($RE\alpha$) (-2,64), causadas pela mistura M.

Outro exemplo de que o estrógeno regula a proliferação e propriedades invasivas de células de câncer de mama que apresentam receptor de estrógeno foi relatado por Choi *et al.* (2000), que identificaram que a queratina 19 (K19), codificada pelo gene *KRT19*, um dos principais filamentos intermediários celulares, está sob regulação rápida e direta do estrogênio em células MCF-7. O acúmulo maior de proteína K19 é observada por 8 horas após exposição ao estradiol e esses níveis continuam aumentando em até 24-48 horas após o tratamento. A supressão do gene *KRT19* após a adição de ICI 182.780 (antiestrogênico) sugere que receptores estrogênicos são responsáveis por essa regulação. A K19 é uma das principais proteínas do citoesqueleto das células epiteliais e representa um marcador para células tumorais epiteliais. Além disso, está relacionada à disseminação metastática precoce devido a sua liberação na corrente sanguínea. Essa proteína pode ser encontrada na medula-óssea de pacientes com câncer mama levando a metástase (ALIX-PANABIÈRES *et al.*, 2009). A mistura M foi capaz de inibir a expressão do gene *KRT19* (-2,26) e por isso pode estar também associado à diminuição de metástases.

Portanto, dessa avaliação, verificamos que dos 23 genes que foram alterados, 11 deles (*AR*, *BCL2*, *ESR1*, *ID1*, *MAPK3*, *MGMT*, *MUC1*, *PGR*, *PTGS2*, *TP53* e *VEGFA*) estão ligados à inibição ou ao favorecimento de morte das células cancerosas por apoptose. Desses 11, 7 estão favorecendo esse fenômeno e todos tiveram a sua expressão diminuída em relação

ao controle: *BCL2* (-1,88), *ESR1* (-2,64), *MAPK3* (-2,64), *MGMT* (-1,96), *MUC1* (-6,10), *PGR* (-2,21) e *PTGS2* (-2,33). Ainda como ponto positivo do mecanismo de ação da mistura M, essa foi capaz de diminuir a expressão de 3 genes [*TGFB1* (-2,48), *SRC* (-1,94) e *KRT19* (-2,26)] relacionados com a disseminação de metástases. Essa inibição desfavoreceria esse processo. E, ainda, foi capaz de diminuir a expressão de 2 genes [*TFF3* (-1,97) e *ABCB1* (-2,83)], relacionados como estimuladores de resistência a drogas. Essa inibição, portanto, favoreceria o sucesso na quimioterapia.

Mas por outro lado, a mistura M foi capaz de alterar a expressão de genes que inibem a apoptose e contribuiriam para a proliferação celular: *AR* (-2,29), *ID1* (1,79), *TP53* (-1,80) e *VEGFA* (1,91). E também alterou a expressão do gene *GATA3* (-2,51), relacionado com a disseminação de metástases, e do gene *THBS1* (-1,81), que aumentaria a angiogênese.

No balanço entre a estimulação de genes relacionados à progressão do tumor e a inibição desses, a mistura M, que foi capaz de inibir a maioria dos genes, mostrou ter um bom potencial antitumoral. Ainda, essa avaliação dos genes envolvidos na tumorigênese do câncer de mama vem contribuir para um maior entendimento a respeito do mecanismo molecular exercido pela mistura M, que foi isolada dos capítulos de *Syngonanthus nitens*, e nos permite conhecer melhor as funções e as consequências de seu uso na terapêutica, caso seus compostos venham a ser utilizados.

6. CONCLUSÕES

Através do Teste de Ames, verificou-se que nenhum dos extratos e nem suas substâncias isoladas apresentaram potencial mutagênico, mas que os extratos e substâncias isoladas apresentaram um efeito antimutagênico de forte a moderado contra todos os mutágenos testados.

Da avaliação da genotoxicidade, podemos concluir que, apesar de existir um dano significativo verificado após 4 horas de tratamento com os extratos Sd, Sn e Ss e com as flavonas 1 e 5, esse dano é reparado pelas células, visto que nenhum dano foi observado em 24 horas de tratamento. E ainda que os extratos Sm, Sn e Ss e todas as isoladas, exceto 8, foram capazes de inibir os danos causados pelo MMS.

Os dados da avaliação da citotoxicidade nos revelaram um bom potencial dos extratos e substâncias isoladas de *Syngonanthus* sp em causar a morte celular das células HepG2 e MCF-7/BUS. Na HepG2, todos extratos, exceto Sm, e todos as substâncias isoladas foram capazes de induzir morte celular significativamente. Já para a linhagem MCF-7/BUS foram encontrados valores menores de atividade citotóxica, mostrando a menor susceptibilidade à morte dessas células.

Os resultados obtidos pelo teste RYA apontam o extrato metanólico de *S. nitens* (Sn) como uma possível fonte de fitoestrógenos, pois, ele foi o único, dentre os extratos testados, que apresentou resultados expressivos e estatisticamente relevantes no ensaio. Os resultados também apontam para a estrogenicidade das xantonas (2, 3 e 4, e da mistura M). Já dos resultados do ensaio *E-screen*, pode-se verificar que nenhum dos extratos foi considerado estrogênico. Dentre as isoladas, todas, exceto a flavona 6, que foi inativa ou não estrogênica, foram consideradas agonistas parciais dos RE. Ainda, verificou-se que a mistura M causou o maior estímulo proliferativo nas células MCF-7/BUS. Portanto, podemos dizer que, dentre os extratos, Sn possui caráter estrogênico, provavelmente devido à presença de xantonas em sua

composição e que tanto esse extrato, quanto as suas xantonas, especialmente a 4 e a A, da mistura M, poderiam ser fonte de futuros estudos relacionados aos substituintes da terapia hormonal, depois que outros ensaios, inclusive os ensaios *in vivo* de estrogenicidade, confirmassem seu caráter estrogênico e que ensaios de toxicidade atestassem seu caráter não prejudicial.

E por fim, da avaliação da modulação da expressão gênica, verificou-se que dentre os 84 genes avaliados na via de câncer de mama, 23 (27,4%) apresentaram alterações na expressão quando comparados ao controle. Desses, 21 (91,3%) apresentaram a expressão diminuída (*ABCB1*, *AR*, *BCL2*, *ESR1*, *GATA3*, *GRB7*, *KRT18*, *KRT19*, *KRT8*, *MAPK3*, *MGMT*, *MUC1*, *PGR*, *PTGS2*, *PYCARD*, *SLIT2*, *SRC*, *TFF3*, *TGFB1*, *THBS1* e *TP53*) e 2 (8,7%) apresentaram a expressão aumentada (*ID1* e *VEGFA*). Desses, a maioria está relacionada com susceptibilidade à apoptose, favorecimento ou inibição de metástases, com a regulação dos hormônios sexuais e susceptibilidade aos danos no DNA. No balanço entre a estimulação de genes relacionados à progressão do tumor e a inibição desses, a mistura M, que foi capaz de inibir a maioria dos genes, mostrou ter um bom potencial antitumoral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGATA, N.; AHMAD, R.; KAWANO, T.; RAINA, D.; KHARBANDA, S.; KUFÉ, D. MUC1 oncoprotein blocks death receptor-mediated apoptosis by inhibiting recruitment of caspase-8. **Cancer Research**, v. 68, n. 15, p. 6136-6144, 2008.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochemical Pharmacology**, v.71, p. 1397-1421, 2006.

AGOFF, S. N.; SWANSON, P. E.; LINDEN, H.; HAWES, S. E.; LAWTON, T. J. Androgen receptor expression in estrogen receptor-negative breast cancer. Immunohistochemical, clinical, and prognostic associations. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 120, p. 725–731, 2003.

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

- AKIYAMA, T.; ISHIDA, J.; NAKAGAWA, S.; OGAWARA, H.; WATANABE, S.; ITOH, N.; SHIBUYA, M.; FUKAMI, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 5592 – 5595, 1987.
- ALIX-PANABIÈRES, C.; VENDRELL, J. P.; SLIJPER, M.; PELLÉ, O.; BARBOTTE, E.; MERCIER, G.; JACOT, W.; FABBRO, M.; PANTEL, K. Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 11, n. 3, p. R39, 2009.
- ALVES, C.; FLORES, L. C.; CERQUEIRA, T. S.; TORALLES, M. B. P. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 5, p. 1005-1014, 2007.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; JÚNIOR, A. S.; ZANI, C. L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373, 2000.
- ANGELI, J. P.; RIBEIRO, L. R.; BELLINI, M. F.; MANTOVANI, M. S. Beta-glucan extracted from the medicinal mushroom *Agaricus blazei* prevents the genotoxic effects of benzo[a]pyrene in the human hepatoma cell line HepG2. **Archives of Toxicology**, v. 83, n. 1, p. 81-86, 2009.
- ANTER, J.; FERNÁNDEZ-BEDMAR, Z.; VILLATORO-PULIDO, M.; DEMYDA-PEYRAS, S.; MORENO-MILLÁN, M.; ALONSO-MORAGA, A.; MUÑOZ-SERRANO, A.; CASTRO, M. D. L. A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts. **Mutation Research**, v. 723, p. 165– 170, 2011.
- AOUATIF, C.; LOOTEN, P.; PARVATHI, M. V.; RAJA-GANESH, S.; PARANTHAMAN, V. Genotoxicological Evaluation of NUTRALYS Pea Protein Isolate. **ISRN Toxicology**, 2013. [E-pub ahead of print].
- ARORA, R.; MALHOTRA, P.; CHAWLA, R.; GUPTA, D.; JUNEJA, M.; KUMAR, R.; SHARMA, A.; BALIGA, M. S.; SHARMA, P. K.; TRIPATHI, R. P. Herbal drugs for oncology: current status and future directions in cancer chemoprevention. In: ARORA, R. Herbal medicine a cancer chemopreventive and therapeutic perspective. **Jaypee Brothers Medical Publishers**, 2010. p. 2-41.
- ASSELIN-LABAT, M. L.; SUTHERLAND, K. D.; BARKER, H.; THOMAS, R.; SHACKLETON, M.; FORREST, N. C.; HARTLEY, L.; ROBB, L.; GROSVELD, F. G.; VAN DER WEES, J.; LINDEMAN, G. J.; VISVADER, J. E. GATA-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. **Nature Cell Biology**, v. 9, p. 201–209, 2007.
- BACON, J. R.; WILLIAMSON, R.; COLIN-GARNER, R.; LAPPIN, G.; LANGOUET, S.; BAO, Y. Sulforaphane and quercetin modulate PhIP-DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 12, p. 1903-1911, 2003.
- BACUS, S. S.; GUDKOV, A. V.; LOWE, M.; LYASS, L.; YUNG, Y.; KOMAROV, A. P. KEYOMARSI, K. L.; YARDEN, Y.; SEGER, R. Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. **Oncogene**, v. 20, n. 2, p. 147-55, 2001.
- BAE, E. A.; HAN, M. J.; CHOO, M. K.; PARK, S. Y.; KIM, D. H. Metabolism of 20(S)- and 20(R)-ginsenoside R-g3 by human intestinal bacteria and its relation to *in vitro* biological activities. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 158, p. 58–63, 2002.
- BALUCHAMY, S.; ZHANG, Y.; RAVICHANDRAN, P.; RAMESH, V.; SODIPE, A.; HALL, J. C.; JEJELOWO, O.; GRIDLEY, D. S.; WU, H.; RAMESH, G. T. Differential oxidative stress gene expression profile in mouse brain after proton exposure. **In Vitro Cellular & Development Biology. Animal.**, v. 46, n. 8, p. 718-725, 2010.

- BARRETT, L. E.; GRANOT, Z.; COKER, C.; IAVARONE, A.; HAMBARDZUMYAN, D.; HOLLAND, E. C.; NAM, H. S.; BENEZRA, R. Self-renewal does not predict tumor growth potential in mouse models of high-grade glioma. **Cancer Cell**, v. 21, n. 1, p. 11–24, 2012.
- BARNES, S. The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. **Lymphatic Research and Biology**, v. 8, n. 1, p. 89 – 98, 2010.
- BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; PIETRO-MAGRI, L.; TOMA, W.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Gastric Antiulcer Activity of *Syngonanthus arthrotrichus* SILVEIRA. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 3, p. 328-332, 2004.
- BECK, V.; ROHR, U.; JUNGBAUER, A. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 94, n. 5, p. 499–518, 2005.
- BENASSAYAG, C.; PERROT-APPALANAT, M.; FERRE, F. Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. **Journal of Chromatography**, v. 777, n. 1-2, p. 233-248, 2002.
- BENDER, R. J.; MAC-GABHANN, F. Expression of VEGF and semaphorin genes define subgroups of triple negative breast cancer. **PLoS One**, v. 8, p. 5, 2013.
- BENDERRA, Z.; FAUSSAT, A. M.; SAYADA, L.; PERROT, J. Y.; CHAOUI, D.; MARIE, J. P. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 7896-7902, 2004.
- BEN RHOUMA, G.; CHEBIL, L.; KRIFA, M.; GHOUL, M.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of oligorutin and oligoesculin. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1700-1707, 2012.
- BENZ, C. C. Transcription factors and breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 5, p. 271-282, 1998.
- BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutation Research**, v. 97, p. 267–281, 1982.
- BERTUCCI, F.; VAN HULST, S.; BERNARD, K.; LORIOD, B.; GRANJEAUD, S.; TAGETT, R.; STARKEY, M.; NGUYEN, C.; JORDAN, B.; BIRNBAUM, D. Expression scanning of an array of growth control genes in human tumor cell lines. **Oncogene**, v. 18, p. 3905–3912, 1999.
- BERTUCCI, F.; HOULGATTE, R.; BENZIANE, A.; GRANJEAUD, S.; ADÉLAÏDE, J.; TAGETT, R.; LORIOD, B.; JACQUEMIER, J.; VIENS, P.; JORDAN, B.; BIRNBAUM, D.; NGUYEN, C. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 20, p. 2981–2991, 2000.
- BOLZANI, V. S.; YOUNG, C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S.; LOPES, M. N. Search for antifungal and anticancer compounds from native plants species of Cerrado and Atlantic Forest. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, p. 181-187, 1999.
- BORSTAD, G. C.; BRYANT, L. R.; ABEL, M. P.; SCROGGIE, D. A.; HARRIS, M. D.; ALLOWAY, J. A. Colchicine for prophylaxis of acute flares when initiating allopurinol for chronic gouty arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 12, p. 2429-2432, 2004.
- BRASIL, 2006. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006, 60 p.

- BREINHOLT, V.; LARSEN, J. C. Detection of weak strogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, p. 622-629, 1998.
- BURLINSON, B.; TICE, R. R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S. Y.; COLLINS A. R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T. S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y. F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the *in vivo* Comet assay workgroup. **Mutation Research**, v. 627, n. 1, p. 31-35, 2007.
- BUSHMAN, J.; VAUGHN, A.; SHEIHET, L.; ZHANG, Z.; COSTACHE, M.; KOHN, J. Functionalized Nanospheres for Targeted Delivery of Paclitaxel. **Journal of Controlled Release**, 2013. [Epub ahead of print].
- CÁLGARO-HELENA, A. F.; DEVIENEE, K. F.; RODRIGUES, T.; DORTA, D. J.; RADDI, M. S.; VILEGAS, W.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; CURTI, C. Effects of isocoumarins isolated from *Paepalanthus bromelioides* on mitochondria: uncoupling, and induction/inhibition of mitochondrial permeability transition. **Chemico-Biological Interactions**, v. 161, n. 2, p. 155-164, 2006.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.
- CÂNDIDO-BACANI, P. DE M.; MORI, M. P.; CALVO, T. R.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A.; CÔLUS, I. M. *In vitro* assessment of the cytotoxic, apoptotic, and mutagenic potentials of isatin. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A**, v. 76, n. 6, p. 354-362, 2013.
- CARDOSO, C. A. L.; ZANUTTO, F. V.; VARANDA, E. A.; SANO, P. T.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Quantification of Flavonoids, Naphthopyranones and Xanthonenes in Eriocaulaceae Species by LC-PDA. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 138-146, 2012.
- CARRARA, D. **O pensamento médico popular**. Rio de Janeiro: Ed. Ribro Soft, 1995.
- CENTERWATCH, 2012. **Drugs in Clinical Trials Database**. Disponível em: <www.centerwatch.com>. Acesso no dia 30 de Dezembro de 2012.
- CÉSPEDES, R.; LACORTE, S.; RALDÚA, D.; GINEBREDÀ, A.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain). **Chemosphere**, v. 61, n. 11, p. 1710 – 1719, 2005.
- CÉSPEDES, R.; PETROVIC, M.; RALDUA, D.; SAURA, U.; PINA, B.; LACORTE, S.; VIANA, P.; BARCELO, D. Integrated procedure for determination of endocrinedisrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC–ESI-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 3, p. 697 – 708, 2004.
- CHEN, Y.; KAYANO, T.; TAKAGI, M. Dysregulated expression of bcl-2 and bax in oral carcinomas: evidence of post-transcriptional control. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 29, n. 2, p. 63-69, 2000.
- CHOI, S. Y.; HA, T. Y.; AHN, J. Y.; KIM, S. R.; KANG, K. S.; HWANG, I. K.; KIM, S. Estrogenic activities of isoflavones and flavones and their structure-activity relationships. **Planta Medica**, v. 74, n. 1, p. 25 - 32, 2008.
- CHOI, I.; GUDAS, L. J.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Regulation of keratin 19 gene expression by estrogen in human breast cancer cells and identification of the estrogen responsive gene region. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 164, n. 1-2, p. 225-237, 2000.

CHOI, J. S.; PARK, K. Y.; MOON, S. H.; RHEE, S. H.; YOUNG, H. S. Antimutagenic effect of plant flavonoids in the *Salmonella* assay system. **Archives of Pharmacal Research**, v. 17, n. 2, p. 71-75, 1994.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 179-204, 2010.

COLIN, D.; LANCON, A.; DELMAS, D.; LIZARD, G.; ABROSSINOW, J.; KAHN, E.; JANNIN, B.; LATRUFFE, N. Antiproliferative activities of resveratrol and related compounds in human hepatocyte derived HepG2 cells are associated with biochemical cell disturbance revealed by fluorescence analyses. **Biochimie**, v. 90, n. 11-12, p. 1674-1684, 2008.

COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; SANO, P. T. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1-2, p. 89-97, 2008.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. **Phytochemistry Reviews**, v. 8, n. 2, p. 313-331, 2009.

CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DAMIANI, D.; TIRIBELLI, M.; CALISTRI, E.; GEROMIN, A.; CHIARVESIO, A.; MICHELUTTI, A.; CAVALLIN, A.; FANIN, R. The prognostic value of P-glycoprotein (ABCB) and breast cancer resistance protein (ABCG2) in adults with de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype. **Haematologica**, v. 91, n. 6, p. 825-828, 2006.

DANG, Z. C.; AUDINOT, V.; PAPAPOULOS, S. E.; BOUTIN, J. A.; LOWIK, C. W. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 2, p. 962-967, 2003.

DA SILVA, M. A.; CARDOSO, C. A.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C. High-Performance Liquid Chromatographic Quantification of Flavonoids in Eriocaulaceae Species and Their Antimicrobial Activity. **Molecules**, v. 16, n. 14, p. 4644-4654, 2009.

DA SILVA, M. A. Estudo químico e biológico de plantas da família Eriocaulaceae. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Instituto de Química de Araraquara. **Tese de doutorado** (Doutor em Química). 157f. 2008.

DA SILVA, M. A.; OLIVEIRA, A. P. S.; SANNOMIYA, M.; SANO, P. T.; VARANDA, E. A.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Flavonoids and a Naphthopyranone from *Eriocaulon ligulatum* and Their Mutagenic Activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n.11, p. 1635-1639, 2007.

DA SILVA, I. S. B. Efeitos de andrôgenos sobre a proliferação celular e a expressão de *c-myc*, *c-jos*, *c-jun*, receptor de andrôgenio e TGFβ em células epiteliais prostáticas humanas não transformadas. **Tese de Doutorado**. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

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

DEVIENCE, K. F.; CÁLGARO-HELENA, A. F.; DORTA, D. J.; PRADO, I. M.; RADDI, M. S.; VILEGAS, W.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; CURTI, C. Antioxidant activity of isocoumarins

isolated from *Paepalanthus bromelioides* on mitochondria. **Phytochemistry**, v. 68, n. 7, p. 1075-1080, 2007.

DICKSON, R. B.; STANCEL, G. M. Estrogen receptor-mediated processes in normal and cancer cells. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, v. 27, p. 135-145, 1999.

DI STASI, L. C.; CAMUESCO, D.; NIETO, A.; VILEGAS, W.; ZARZUELO, A.; GALVEZ, J. Intestinal anti-inflammatory activity of paepalantine, an isocoumarin isolated from the capitula of *Paepalanthus bromelioides* in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. **Planta Medica**, v. 70, n. 4, p. 315-320, 2004.

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

DOSSUS, L.; KAAKS, R.; CANZIAN, F.; ALBANES, D.; BERNDT, S. I.; BOEING, H.; BURING, J.; CHANOCK, S. J.; CLAVEL-CHAPELON, F.; FEIGELSON, H. S.; GAZIANO, J. M.; GIOVANNUCCI, E.; GONZALEZ, C.; HAIMAN, C. A.; HALLMANS, G.; HANKINSON, S. E.; HAYES, R. B.; HENDERSON, B. E.; HOOVER, R. N.; HUNTER, D. J.; KHAW, K. T.; KOLONEL, L. N.; KRAFT, P.; MA, J.; LE MARCHAND, L.; LUND, E.; PEETERS, P. H.; STAMPFER, M.; STRAM, D. O.; THOMAS, G. *et al.* PTGS2 and IL6 genetic variation and risk of breast and prostate cancer: results from the Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium (BPC3). **Carcinogenesis**, v. 31, p. 455-461, 2010.

DRACHENBERG, C. B.; IOFFE, O. B.; CASTELLANI, R. J.; PAPADIMITRIOU, J. C. Nuclear bcl-2 staining in tumors. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 108, p. 479, 1997.

DUONG, H. H.; YUNG, L. Y. Synergistic co-delivery of doxorubicin and paclitaxel using multi-functional micelles for cancer treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, n. 1, p. 486-495, 2013.

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

EDENHARDER, R.; TANG, X. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 3-4, p. 357-372, 1997.

FANG, J. J.; YE, G.; CHEN, W. L.; ZHAO, W. M. Antibacterial phenolic components from *Eriocaulon buergerianum*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 5, p. 1279-1286, 2008.

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

FARO, A. M.; DALECK, C. R.; SANTANA, A. E.; NARDI, A. B.; MOTTA, F. R.; EURIDES, D. Haematological assesment in dogs undergoing antineoplastic treatment with vincristine sulphate, prednisone and cyclophosphamide – experimental study. **ARS Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 2009.

FELLOWS, L. E. **Pharmaceuticals from traditional medical plants and other future prospects**: In: COOMBERS, J. D. New drugs from natural sources. London: IBC Technical Services, 1992.

FERGUSON, L. R.; BRONZETTI, G.; DE FLORA, S. Mechanistic approaches to chemoprevention of mutation and cancer. **Mutation Research**, v. 591, p. 3-7, 2005.

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

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

FIELD MUSEUM, 2013. **Neotropical Herbarium Specimens, Eriocaulaceae family**. Disponível em: <www.fieldmuseum.org>. Acesso no dia 20 de Junho de 2013.

FIGUEIREDO, I. B. Estudo do fogo em populações de capim dourado (*Syngonanthus nitens* Eriocaulaceae) no Jalapão, TO. **Dissertação** (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. 2007, 73f.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar**. Campinas, SP: Multiciência. Outubro, 2006. 8p.

FONTENOT, K.; NARAGONI, S.; CLAVILLE, M.; GRAY, W. Characterization of Bizzzy Nut extracts in estrogen-responsive MCF-7 breast cancer cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 220, n. 1, p. 25 – 32, 2007.

FRASOR, J.; DANES, J. M.; KOMM, B.; CHANG, K. C.; LYTTLE, C. R.; ATZENELLENBOGEN, B. S. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. **Endocrinology**, v. 144, p. 4562-4574, 2003.

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

GARCÍA-CAÑAS, V.; SIMÓ, C.; LEÓN, C.; CIFUENTES, A. Advances in nutrigenomics research: novel and future analytical approaches to investigate the biological activity of natural compounds and food functions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 2, p. 290-304, 2010.

GARCIA-CLOSAS, M.; TROESTER, M. A.; QI, Y.; LANGEROD, A.; YEAGER, M.; LISSOWSKA, J.; BRINTON, L.; WELCH, R.; PEPLONSKA, B.; GERHARD, D. S.; GRAM, I. T.; KRISTENSEN, V.; BORRESEN-DALE, A. L.; CHANOCK, S.; PEROU, C. M. Common genetic variation in GATA-binding protein 3 and differential susceptibility to breast cancer by estrogen receptor alpha tumor status. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 16, n. 11, p. 2269–2275, 2007.

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

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

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

GELLER, S. E., KRONENBERG, F. Toward optimal health: the experts discuss the use of botanicals by women. **Journal of Women's Health**, v. 12, p.847–852, 2003.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, p. 695-706, 2007.

- GIULIETTI, A. M.; WANDERLEY, M. G. L.; LONGHI-WAGNER, H. M.; PIRANI, J. R.; PARRA, L. R. Estudos em sempre-vivas: taxonomia com ênfase nas espécies de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 329-377, 1996.
- GIULIETTI, A. M.; HENSOLD, N. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae. **Acta Botânica Brasileira**, v. 4, n. 1, p. 133-159, 1990.
- GIULIETTI, N.; GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R.; MENEZES, N. L. Estudos em sempre-vivas: importância econômica do extrativismo em Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 179-193, 1988.
- GLINSKII, A. B.; GLINSKY, G. V.; LIN, H. Y.; TANG, H. Y.; SUN, M.; DAVIS, F. B.; LUIDENS, M. K.; MOUSA, S. A.; HERCBERGS, A. H.; DAVIS, P. J. Modification of survival pathway gene expression in human breast cancer cells by tetraiodothyroacetic acid (tetrac). **Cell Cycle**, v. 8, n. 21, p. 3554-3562, 2009.
- GOHIL, K.; CHAKRABORTY, A. A. Applications of microarray and bioinformatics tools to dissect molecular responses of the central nervous system to antioxidant micronutrients. **Nutrition**, v. 20, n. 1, p. 50-5, 2004.
- GREEN, S.; CHAMBON, P. **The oestrogen receptor: from perception to mechanism**. In: PARKER, M. G. (Ed.). Nuclear hormone receptors. London: Academic Press, 1991. p. 15-38.
- GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: Mutações, Câncer e Reprodução**. Brasília: Editora da UnB, 2005, 392p.
- GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R. C.; GELBART, W. M.; WESSLER, S. R. **Introdução à Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 764p.
- GULLUCE, M.; ORHAN, F.; YANMIS, D.; ARASOGLU, T.; GUVENALP, Z.; DEMIREZER, L. O. Isolation of a flavonoid, apigenin 7-O-glucoside, from *Mentha longifolia* (L.) Hudson subspecies *longifolia* and its genotoxic potency. **Toxicology and Industrial Health**, 2013. Feb 13. [Epub ahead of print].
- GUSTAFSSON, J.A. Estrogen receptor β : a new dimension in estrogen mechanism of action. **Journal of Endocrinology**, v. 163, p. 379 - 383, 1999.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? **FEBS Letters**, v. 540, p. 3-6, 2003.
- HAN, D. H.; DENISON, M. S.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 7, p. 1479 - 1487, 2002.
- HANSEN, R. K.; BISSELL, M. J. Tissue architecture and breast cancer: the role of extracellular matrix and steroid hormones. **Endocrine-Related Cancer**, v. 7, n. 2, p. 95-113, 2000.
- HARLOW, B. L.; SIGNORELLO, L. B. Factors associated with early menopause. **Maturitas**, v. 35, p. 3-9, 2000.
- HARTMANN, A. A.; ARGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. 4TH International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v.18, p. 45-51, 2003.
- HASENBRINK, G.; SIEVERNICH, A.; WILDT, L.; LUDWIG, J.; LICHTENBERG-FRATÉ, H. Estrogenic effects of natural and synthetic compounds including tibolone assessed in *Saccharomyces*

cerevisiae expressing the human estrogen alpha and beta receptors. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 9, p. 1552-1554, 2006.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, n. 2/3, p. 67– 202, 2002.

HAYASHI, M.; MACGREGOR, J. T.; GATEHOUSE, D. G.; ADLER, I. D.; BLAKEY, D. H.; DERTINGER, S. D.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A. N.; SUTOU, S. *In vivo* rodent micronucleus assay II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 28, p. 334-341, 2000.

HAYS, J.; OCKENE, J. K.; BRUNNER, R. L.; KOTCHEN, J. M.; MANSON, J. E.; PATTERSON, R. E.; ARAGAKI, A. K.; SHUMAKER, S. A.; BRZYSKI, R. G.; LACROIX, A. Z.; GRANEK, I. A.; VALANIS, B. G. Effects of estrogen plus progestin on health related quality of life. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 19, p. 1839–1854, 2003.

HOCH, R. V.; THOMPSON, D. A.; BAKER, R. J.; WEIGEL, R. J. GATA-3 is expressed in association with estrogen receptor in breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 84, n. 2, p. 122–128, 1999.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores**. Série de textos da Escola de Verão em Química IV, São Carlos, SP: EdUFSCar, 2003, 152p.

HUANG, M. H.; TAI, H. M.; WANG, B. S.; CHANG, L. W. Inhibitory effects of water extract of *Flos inulae* on mutation and tyrosinase. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 1015-1020, 2013.

HUBBARD, R. E.; PIKE, A. C. W.; BRZOZOWSKI, A. M.; WALTON, J.; BONN, T.; GUSTAFSSON, J. A.; CARLQUIST, M. Structural insights into the mechanisms of agonism and antagonism in oestrogen receptor isoforms. **European Journal of Cancer**, v. 36, p. S13-S23, 2000.

IBAMA, 2004. **Parque nacional de sempre-vivas**. Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=/natural/snuc/index.html&conteudo=/natural/snuc/sudeste/pn/semprevivas.html>>. Acesso no dia 02 de Maio de 2004.

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

ISPn, 2013. **Capim Dourado: Sabendo usar, nunca vai faltar**. Disponível em: <<http://www.ispn.org.br/capim-dourado-sabendo-usar-nunca-vai-faltar/>>. Acesso no dia 26 de Junho de 2013.

JANSEN, R. L.; JOOSTEN-ACHJANIE, S. R.; VOLOVICS, A.; ARENDS, J. W.; HUPPERETS, P. S.; HILLEN, H. F. et al. Relevance of the expression of bcl-2 in combination with p53 as a prognostic factor in breast cancer. **Anticancer Research**, v. 18, p. 4455–4462, 1998.

Ji, B. C.; YU, C. C.; YANG, S. T.; HSIA, T. C.; YANG, J. S.; LAI, K. C.; KO, Y. C.; LIN, J. J.; LAI, T. Y.; CHUNG, J. G. Induction of DNA damage by deguelin is mediated through reducing DNA repair genes in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells. **Oncology Reports**, v. 27, n. 4, p. 959-964, 2012.

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

- KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, N. **Environmental desmutagens and antimutagens**. In: KLEKOWSKI, E. J. (Ed.). New York: Environmental Mutagenesis and Plant Biology, 1982. pp. 137-151.
- KADA, T.; MORITA, K.; INOUE, T. Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. **Mutation Research**, v. 53, n. 3, p. 351-353, 1978.
- KAIVALYA, M.; NAGESHWAR-RAO, B.; SATISH-RAO, B. S. Mangiferin: A xanthone attenuates mercury chloride induced cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 25, n. 2, p. 108-116, 2011.
- KALYANARAMAN, B.; JOSEPH, J.; KALIVENDI, S.; WANG, S.; KONOREV, E.; KOTAMRAJU, S. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 234-235, n. 1-2, p. 119-124, 2002.
- KAMATA, R.; SHIRAISHI, F.; NAKAJIMA, D.; KAGEYAMA, S. Estrogenic effects of leachates from industrial waste landfills measured by a recombinant yeast assay and transcriptional analysis in Japanese medaka. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 2, p. 430–437, 2011.
- KAMPA, M.; NIFLI, A. P.; CHARALAMPOPOULOS, I.; ALEXAKI, V. I.; THEODOROPOULOS, P. A.; STATHOPOULOS, E. N.; GRAVANIS, A.; CASTANAS, E. Opposing effects of estradiol- and testosterone-membrane binding sites on T47D breast cancer cell apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 307, n. 1, p. 41– 51, 2005.
- KANNAN, N.; KANG, J.; KONG, X.; TANG, J.; PERRY, J. K.; MOHANKUMAR, K. M.; MILLER, L. D.; LIU, E. T.; MERTANI, H. C.; ZHU, T.; GRANDISON, P. M.; LIU, D. X.; LOBIE, P. E. Trefoil factor 3 is oncogenic and mediates anti-estrogen resistance in human mammary carcinoma. **Neoplasia**, v. 12, n. 12, p. 1041-1053, 2010.
- KANNAN, K.; LAKSHMI-LATHA, P. N.; SHANMUGAM, G. Expression of bcl-2 oncoprotein in Indian oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**, v. 34, p. 373-377, 1998.
- KANDOUZ, M.; LOMBET, A.; PERROT, J. Y.; JACOB, D.; CARVAJAL, S.; KAZEM, A.; ROSTENE, W.; THERWATH, A.; GOMPEL, A. Proapoptotic effects of antiestrogens, progestins and androgen in breast cancer cells. The **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, n. 1-6, p. 463–471, 1999.
- KANG, S. C.; LEE, C. M.; CHOI, H.; LEE, J. H.; OH, J. S.; KWAK, J. H.; ZEE, O. P. Evaluation of oriental medicinal herbs for estrogenic and antiproliferative activities. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 11, p. 1017-1019, 2006.
- KASTAN, M. B.; ONYEKWERE, O.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; CRAIG, R. W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Research**, v. 51, p. 6304–6311, 1991.
- KASTAN, B. M.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, p. 316-323, 2004.
- KHALED, M.; JIANG, Z. Z.; ZHANG, L. Y. Deoxypodophyllotoxin: A promising therapeutic agent from herbal medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 24-34, 2013.
- KIER, L. D.; BRUSICK, D. J.; AULETTA, A. E.; VON HALLE, E. S.; SIMMON, V. F.; BROWN, M. M.; DUNKEL, V. C.; MCCANN, J.; ZEIGER, K. E. **Mutation Research**, v. 492, p. 29–38, 2001.
- KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. A new cytotoxic naphthoquinone from *Paepalanthus latipes*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 12, p. 1487-1488, 2004.

- KITANI, K.; KANAI, S.; IVY, G. O.; CARRILLO, M. C. Pharmacological modifications of endogenous antioxidant enzymes with special reference to the effects of deprenyl: a possible antioxidant strategy. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 111, n. 2-3, p. 211 - 221, 1999.
- KLONIS, N.; XIE, S. C.; MCCAWE, J. M.; CRESPO-ORTIZ, M. P.; ZALOUMIS, S. G.; SIMPSON, J. A.; TILLEY, L. Altered temporal response of malaria parasites determines differential sensitivity to artemisinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 110, n. 13, p. 5157-5162, 2013.
- KNASMÜLLER, S.; HOLLAND, N.; WULTSCH, G.; JANDL, B.; BURGAS, S.; MISÍK, M.; NERSESYAN, A. Use of nasal cells in micronucleus assays and other genotoxicity studies. **Mutagenesis**, v. 26, p. 231-8, 2011.
- KNIGHT, D. C.; EDEN, J. A. Phyto-oestrogens – a short review. **Maturitas**, v. 22, p. 167 - 175, 1995.
- KORACH, K. S.; MCLACHLAN, J. A. Techniques for detection of estrogenicity. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 5-8, 1995.
- KOUROS-MEHR, H.; KIM, J. W.; BECHIS, S. K.; WERB, Z. GATA-3 and the regulation of the mammary luminal cell fate. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 20, n. 2, p. 164–170, 2008a.
- KOUROS-MEHR, H.; BECHIS, S. K.; SLORACH, E. M.; LITTLEPAGE, L. E.; EGEGLAD, M.; EWALD, A. J.; PAI, S. Y.; HO, I. C.; WERB, Z. GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model. **Cancer Cell**, v. 13, n. 2, p. 141–152, 2008b.
- KOUROS-MEHR, H.; SLORACH E, M.; STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. **Cell**, v. 127, n. 5, p. 1041–1055, 2006.
- KOZICS, K.; VALOVICOVA, Z.; SLAMENOVA, D. Structure of flavonoids influences the degree inhibition of Benzo(a)pyrene - induced DNA damage and micronuclei in HepG2 cells. **Neoplasma**, v. 58, n. 6, p. 516-524, 2011.
- KU, W. W.; BIGGER, A.; BRAMBILLA, G.; GLATT, H.; GÖCKE, E.; GUZZIE, P. J.; HAKURA, K.; HONMA, M.; MARTUS, H. J.; OBACH, R. S.; ROBERTS, S. Strategy for genotoxicity testing – Metabolic considerations. **Mutation Research**, v. 627, p. 59-77, 2007.
- KUCH, B.; KERN, F.; METZGER, J. W.; VON DER TRECK, K. T. Effect-related monitoring: estrogen-like substances in groundwater. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 17, n. 2, p. 250 – 260, 2010.
- KUREPINA, N.; KREISWIRTH, B. N.; MUSTAEV, A. Growth-inhibitory activity of natural and synthetic isothiocyanates against representative human microbial pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, 2013. [Epub ahead of print].
- KURODA, Y.; JAIN, K. A.; TEZUKA, H.; KADA, T. Anmutagenicity in cultured mammalian cells. **Mutation Research**, v. 267, p. 201-209, 1992.
- KURZER, M. S. Phytoestrogen supplement use by women. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 6, p. 1983S-1986S, 2003.
- LANGSENLEHNER, U.; YAZDANI-BIUKI, B.; EDER, T.; RENNER, W.; WASCHER, T. C.; PAULWEBER, B.; WEITZER, W.; SAMONIGG, H.; KRIPPL, P. The cyclooxygenase-2 (PTGS2) 8473T>C polymorphism is associated with breast cancer risk. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 1392–1394, 2006.
- LAXMINARAYAN, R.; ARROW, K.; JAMISON, D.; BLOOM, B. R. Public health. From financing to fevers: lessons of an antimalarial subsidy program. **Science**, v. 338, n. 6107, p. 615-616, 2012.

- LAZZARI, L. R. P. Redelimitação e Revisão de *Syngonanthus* sect. *Eulepis* (Bong. ex Koern.) Ruhland – Eriocaulaceae. 2000. 129 f. **Tese (Doutorado em Botânica)** – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- LEHMANN, L., ESCH, H.L., WAGNER, J., ROHNSTOCK, L., METZLER, M. Estrogenic and genotoxic potential of equol and two hydroxylated metabolites of daidzein in cultured human Ishikawa cells. **Toxicology Letters**, v. 369, 2005.
- LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W. G. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 49, p. 46-53, 2009.
- LIMA, J. C.; DOS SANTOS, M. R. M.; PASSETI, T. A. Avaliação da expressão gênica e proteica das células do tumor transplantável de Ehrlich. **Revista da I Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica da Uniban**, 2013.
- LIRA, W. M.; SANTOS, F. V.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 1, p. 111-119, 2008.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-8, 2001.
- LIVIERO, L.; VON BORSTEL, R. C. The 4th International Conference on Mechanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesis: a summary. **Mutation Research**, v. 350, p. 287-293, 1996.
- LIU, X. H.; KIRSCHENBAUM, A.; YAO, S.; STEARNS, M. E.; HOLLAND, J. F.; CLAFFEY, K.; LEVINE, A. C. Upregulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell line. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 17, n. 8, p. 687–694, 1999.
- LOH, D.S.; ER, H. M.; CHEN, Y. S. Mutagenic and antimutagenic activities of aqueous and methanol extracts of *Euphorbia hirta*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 406–414, 2009.
- LOIBL, S.; MULLER, B. M.; VON MINCKWITZ, G.; SCHWABE, M.; ROLLER, M.; DARB-ESFAHANI, S.; ATASEVEN, B.; DU BOIS, A.; FISSLER-ECKHOFF, A.; GERBER, B. *et al.* Androgen receptor expression in primary breast cancer and its predictive and prognostic value in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 130, n. 2, p. 477 –487, 2011.
- LOWE, S. W.; SCHMITT, E. M.; SMITH, S. W. p53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes. **Nature**, v. 362, p. 847–849, 1993.
- MANGELSDORF, D. J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHÜTZ, G.; UMESONO, K.; BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P.; EVANS, R. M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835-839, 1995.
- MARCARINI, J. C.; TSUBOY, M. S. F.; LUIZ, R. C.; RIBEIRO, L. R.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MANTOVANI, M. S. Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, p. 459–465, 2011.
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, n. 3-4, p. 173 - 215, 1983.
- MASEK, T.; VOPALENSKY, V. P.; SUCHOMELOVA, P.; POSPISEK, M. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. **Analytical Biochemistry**, v. 336, n. 1, p. 46-50, 2005.

- MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P. V.; DECORDER, I.; KIRSCHVOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1515 – 1531, 2006.
- MEHRA, R.; VARAMBALLY, S.; DING, L.; SHEN, R.; SABEL, M. S.; GHOSH, D.; CHINNAIYAN, A. M.; KLEER, C. G. Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis. **Cancer Research**, v. 65, n. 24, p. 11259–11264, 2005.
- MENEZES, N. L.; GIULIETTI, A. M. Campos rupestres: paraíso botânico na serra. **Ciência Hoje**, v. 5, n. 25, p. 38-44, 1986.
- MERK, O.; SPEIT, G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 33, p. 167-172, 1999.
- MIKSICEK, R. J. Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular**, v. 49, n. 2-3, p. 153-160, 1994.
- MIKSICEK, R. J. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. **Molecular Pharmacology**, v. 44, n. 6, p. 37-43, 1993.
- MOL, M. C. N.; MONTALBÁN, E. B. Fitoestrógenos: possibilidades terapêuticas. **Revista de Fitoterapia**, v. 1, n. 3, p. 165 - 180, 2001.
- MOLLER, P.; MÖLLER, L.; GODSCHALK, R.W.; JONES, G.D. Assessment and reduction of comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group. **Mutagenesis**, v. 25, n. 2, p. 109-111, 2010.
- MORITO, K.; AOMORI, T.; HIROSE, T.; KINJO, J.; HASEGAWA, J.; OGAWA, S.; INOUE, S.; MURAMATSU, M.; MASAMUNE, Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors α and β (II). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 2, p. 48-52, 2002.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 29 - 60, 2000.
- MULAUDZI, R. B.; NDHLALA, A. R.; KULKARNI, M. G.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Anti-inflammatory and mutagenic evaluation of medicinal plants used by Venda people against venereal and related diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 1, p. 173-179, 2013.
- MYERS, C. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. **Seminars in Oncology**, v. 25, p. 10-14, 1998.
- NAEYER, A.; VANDEN BERGHE, W.; POCOCK, V.; MILLIGAN, S.; HAEGEMAN, G.; DE KEUKELEIRE, D. Estrogenic and anticarcinogenic properties of kurarinone, a lavandulyl flavanone from the roots of *Sophora flavescens*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1829 – 1832, 2004.
- NAM, H. S.; BENEZRA, R. High levels of Id1 expression define B1 type adult neural stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 5, n. 5, p. 515–526, 2009.
- NCBI, 2013. **TP53 tumor protein p53** [*Homo sapiens* (human)]. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>>. Acesso no dia 01 de Julho de 2013.
- NOGUEROL, T. N.; BORONAT, S.; CASADO, M.; RALDÚA, D.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 6, p. 1012-1019, 2006.

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

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

OGAWA, Y.; HAI, E.; MATSUMOTO, K.; IKEDA, K.; TOKUNAGA, S.; NAGAHARA, H.; SAKURAI, K.; INOUE, T.; NISHIGUCHI, Y. Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinicopathological factors and biomarkers. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 13, n. 5, p. 431–435, 2008.

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

O JORNAL, 2013. **Artesanato tocantinense em capim dourado é exposto no Rio de Janeiro**.

Disponível em:

<http://www.ojornal.net/horaemhora/index.php?option=com_content&task=view&id=11928>. Acesso no dia 26 de Junho de 2013.

OLIVEIRA, G. A.; FERRAZ, E. R.; SOUZA, A. O.; LOURENÇO, R. A.; OLIVEIRA, D. P.; DORTA, D. J. Evaluation of the mutagenic activity of chrysin, a flavonoid inhibitor of the aromatization process. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A**, v. 75, n. 16-17, p. 1000-1011, 2012.

ORTON, R. J.; STURM, O. E.; VYSHEMIRSKY, V.; CALDER, M.; GILBERT, D. R.; KOLCH, W. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. **The Biochemical Journal**, v. 392, Pt. 2, p. 249-61, 2005.

OZKAN, H.; GULTEKIN, D. D.; SEZEN, S.; OZGERIS, B.; GULLUCE, M.; TÜMER, F. Mutagenic assessment of three synthetic pyridine-diaryl ketone derivatives. **Toxicology and Industrial Health**, 2013. [Epub ahead of print].

PACIFICO, M.; NAPOLITANO, A.; MASULLO, M.; HILARIO, F.; VILEGAS, W.; PIACENTE, S.; SANTOS, L. C. Metabolite fingerprint of “capim dourado” (*Syngonanthus nitens*) a basis of Brazilian handicrafts. **Industrial Crops & Products**, v. 33, n. 2, p. 488–496, 2011.

PAILLARD, F.; FINOT, F.; MOUCHE, I.; PRENEZ, A.; VERICAT, J. A. Use of primary cultures of rat hepatocytes to predict toxicity in the early development of new chemical entities. **Toxicology In Vitro**, v. 13, p. 693-700, 1999.

PANA, M. H.; HO, C. T. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. **Chemical Society Reviews**, v. 37, p. 2558-2574, 2008.

PARIKH, P.; PALAZZO, J. P.; ROSE, L. J.; DASKALAKIS, C.; WEIGEL, R. J. GATA-3 expression as a predictor of hormone response in breast cancer. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 200, p. 705–710, 2005.

PARRA, L. R. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: *Syngonanthus* Ruhland (Eriocaulaceae). **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 17, p. 219-254, 1998.

PARRELLA, A.; LAVORGNA, M.; CRISCUOLO, E.; ISIDORI, M. Mutagenicity, Genotoxicity, and Estrogenic Activity of River Porewaters. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 2013. [Epub ahead of print].

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

- PFUHLER, S.; WOLF, H. U. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 27, p. 196-201, 1996.
- PIERSEN, C. E. Phytoestrogens in botanical dietary supplements: implications for cancer. **Integrative Cancer Therapies**, v. 2, n. 2, p. 120 - 138, 2003.
- PINTO, B.; BERTOLI, A.; NOCCIOLI, C.; GARRITANO, S.; REALI, D.; PISTELLI, L. Estradiol-antagonistic activity of phenolic compounds from leguminous plants. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 3, p. 362-366, 2008.
- PINTO, L. R. F.; FELZENSWALB, I. **Genética do câncer humano**. In: Mutagênese Ambiental. Org: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Canoas: Ed. Ulbra, 2003.
- PLISKOVA, M.; VONDRACEK, J.; KREN, V.; GAZAK, R.; SEDMERA, P.; WALTEROVA, D.; PSOTOVA, J.; SIMANEK, V.; MACHALA, M. Effects of silymarin flavonolignans and synthetic silybin derivatives on estrogen and aryl hydrocarbon receptor activation. **Toxicology**, v. 215, n. 1-2, p. 80-89, 2005.
- POLYAK, K.; WEINBERG, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. **Nature Reviews. Cancer**, v. 9, n. 4, p. 265-273, 2009.
- RAJAPAKSE, N.; SILVA, E.; SCHOLZE, M.; KORTENKAMP, A. Deviation from additivity with estrogenic mixtures containing 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol detected in the *E-screen* assay. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 23, p. 6343 - 6352, 2004.
- RAMOS, A. A.; MARQUES, F.; FERNANDES-FERREIRA, M.; PEREIRA-WILSON, C. Water extracts of tree *Hypericum* sps. protect DNA from oxidative and alkylating damage and enhance DNA repair in colon cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 80-86, 2013.
- RASMUSSEN, T. H.; NIELSEN, J. B. Critical parameters in the MCF-7 cell proliferation bioassay (*E-screen*). **Biomarkers**, v. 7, n. 4, p. 322-336, 2002.
- REN, B.; YEN, K. O.; LAWLER, J.; KHOARAVI-FAR, R. Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1765, n. 2, p. 178-188, 2006.
- RESENDE, F. A.; MUNARI, C. C.; MONTEIRO-NETO, M. A. B.; TAVARES D. C.; BASTOS, J. K.; DA SILVA FILHO, A. A.; VARANDA, E. A. Comparative studies of the (anti) mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and artemisinin C by the bacterial reverse mutation test. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 2335-2350, 2012a.
- RESENDE, F. A.; BARBOSA, L. C.; TAVARES, D. C.; DE CAMARGO, M. S.; DE SOUZA-REZENDE, K. C.; E SILVA, M. L.; VARANDA, E. A. Mutagenicity and antimutagenicity of hinokinin a trypanosomicidal compound measured by *Salmonella* microsome and comet assays. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 203, 2012b.
- RIBEIRO, D. A.; SCOLASTICI, C.; DE LIMA, P. L.; MARQUES, M. E.; SALVADORI, D. M. Genotoxicity of antimicrobial endodontics compounds by single cell gel (comet) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 99, n. 5, p. 637-640, 2005.
- RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. **A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana**. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Canoas: Ed. ULBRA, Mutagênese Ambiental, 2003, 356p.
- RICE, S.; AMON, A.; WHITEHEAD, S. A. Ethanolic extracts of black cohosh (*Actaea racemosa*) inhibit growth and oestradiol synthesis from oestrone sulphate in breast cancer cells. **Maturitas**, v. 56, n. 4, p. 359 - 367, 2007.

- RODRIGUES, H. G.; DINIZ, Y. S.; FAINE, L. A.; ALMEIDA, J. A.; FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI, E. L. B. Nutritional supplementation with natural antioxidants: effect of rutin on HDL-cholesterol concentration. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 3, p. 315-320, 2003.
- ROSA, F. E. Perfil da expressão gênica na predição fenotípica dos carcinomas mamários. **Tese de doutorado** (Doutor em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista). UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA Instituto de Biociências. 218f. 2007.
- ROTHFUSS, A. *et al.* Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. **Mutation Research**, v. 723, n. 2, p. 108-120, 2011.
- RUSAK, G.; PIANTANIDA, I.; MASIC, L.; KAPURALIN, K.; DURGO, K.; KOPJAR, N. Spectrophotometric analysis of flavonoid-DNA interactions and DNA damaging/protecting and cytotoxic potential of flavonoids in human peripheral blood lymphocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 1, p. 181-189, 2010.
- RUSSO, P.; DEL BUFALO, A.; CESARIO, A. Flavonoids acting on DNA topoisomerases: recent advances and future perspectives in cancer therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 31, p. 5287-5293, 2012.
- SANO, P. T. Revisão de *Actinocephalus* (Koern.) Sano – Eriocaulaceae. 241 f. **Tese (Doutorado em Botânica)** – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- SANTOS, F. J.; MOURA, D. J.; PÉRES, V. F.; SPEROTTO, A. R.; CAMARÃO, E. B.; CAVALCANTE, A. A.; SAFFI, J. Genotoxic and mutagenic properties of *Bauhinia platyptala* extract, a traditional Brazilian medicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 474-482, 2012.
- SANTOS, D. E.; SILVA, D. T.; TOLEDO-PINTO, E. A.; LOT, R. F. E. Tumor venéreo transmissível (TVT): Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 10, 2008.
- SANTOS, F. V.; COLUS, I. M.; SILVA, M. A.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Assessment of DNA damage induced by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 9, p. 1585-1589, 2006.
- SASAKI, Y. F.; IMANISHI, H.; OHTA, T.; SHIRASU, Y.; WATANABE, M.; MATSUMOTO, K.; SHIRASU, Y. Suppressing effect of tannic acid on UV and chemically induced chromosome aberrations in cultured mammalian cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2423-2428, 1988.
- SASAKI, Y. F.; IMANISHI, H.; OHTA, T.; SHIRASU, Y. Effects of vanillin on sister chromatid exchanges and chromosome aberrations induced by mitomycin C in cultured Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**, v. 191, n. 3/4, p. 193-200, 1987.
- SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials—advantages and limitations. **Journal of Dentistry**, v. 22, spl. 2, p. S6-S11, 1994.
- SCHMEDTJE, J. F.; JI, Y. S.; LIU, W. L.; DUBOIS, R. N.; RUNGE, M. S. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 1, p. 601-608, 1997.
- SCHILIRÒ, T.; GORRASI, I.; LONGO, A.; COLUCCIA, S.; GILLI, G. Endocrine disrupting activity in fruits and vegetables evaluated with the *E-screen* assay in relation to pesticide residues. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, n. 1-2, p. 139-146, 2011.

- SERPELONI, J. M. Atividade antigenotóxica de compostos da dieta e sua influência na expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo. **Tese de doutorado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, Ribeirão Preto, SP, 2012.
- SETCHELL, K. D. Soy isoflavones benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20, spl. 5, p. 354S-362S, 2001.
- SHEN, P.; GUO, B. L.; GONG, Y.; HONG, D. Y.; HONG, Y.; YONG, E. L. Taxonomic, genetic, chemical and estrogenic characteristics of *Epimedium* species. **Phytochemistry**, v. 68, n. 10, p. 1448-1458, 2007.
- SHILOH, Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. **Nature reviews**, v. 3, p. 155-168, 2003.
- SHIN, I. S.; SEO, C. S.; LEE, M. Y.; HA, H. K.; HUH, J. I.; SHIN, H. K. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the genotoxicity of *Gumiganghwaltang*, a traditional herbal prescription. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 14, n. 1, p. 350-356, 2012.
- SHOKER, B. S.; JARVIS, C.; CLARKE, R. B.; ANDERSON, E.; HEWLETT, J.; DAVIES, M. P.; SIBSON, D. R.; SLOANE, J. P. Estrogen receptor-positive proliferating cells in the normal and precancerous breast. **The American Journal of Pathology**, v. 155, n. 6, p. 1811-1815, 1999a.
- SHOKER, B. S.; JARVIS, C.; SIBSON, D. R.; WALKER, C.; SLOANE, J. P. Oestrogen receptor expression in the normal and pre-cancerous breast. **The Journal of Pathology**, v. 188, n. 3, p. 237-244, 1999b.
- SILVA, A.; TAVARES, L.; PIRAINÉ, R.; SCHUCH, R. Interpretando a Base Genética do Câncer. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. 55f. 2013.
- SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. Plantas Medicinais: In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos. Antiinflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, 2004, 480 p.
- SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STERHMANN, J. R. **Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul**. 5ª ed. Porto Alegre-RS: Ed. Universidade, UFRGS, 1998, 173p.
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.
- 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. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.
- SOHNI, Y. R.; MUTANGADURA-MHLANGA, T.; KALE, P. G. Bacterial mutagenicity of eight medicinal herbs from Zimbabwe. **Mutation Research**, v. 322, n. 2, p. 133-140, 1994.
- SORLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; EYSTEIN-LONNING, P.; BORRESEN-DALE, A. L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, 2001.

SOULE, H. D.; VASQUEZ, J.; LONG, A.; ALBERT, S.; BRENNAN, M. J. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **Journal of National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, p. 1409-1416, 1973.

SOTO, A. M.; SONNENSCHN, C. Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 6, n. 7, p. 363 – 370, 2010.

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

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

STORHOFF, J. J.; LUCAS, A. D.; GARIMELLA, V.; BAO, Y. P.; MÜLLER, U. R. Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 883-887, 2004.

SU, Q. G.; LIU, Y.; CAI, Y. C.; SUN, Y. L.; WANG, B.; XIAN, L. J. Anti-tumour effects of xanthone derivatives and the possible mechanisms of action. **Investigational New Drugs**, v. 29, n. 6, p. 1230-1240, 2011.

SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature Reviews. Cancer**, v. 3, n. 10, p. 768-780, 2003.

SZAKÁCS, G.; PATERSON, J. K.; LUDWIG, J. A.; BOOTH-GENTHE, C.; GOTTESMAN, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 219–234, 2006.

TACHINO, N.; GUO, D.; DASHWOOD, W. M.; YAMANE, S.; LARSEN, R.; DASHWOOD, R. Mechanisms of the *in vitro* antimutagenic action of chlorophyllin against benzo(a)pyrene: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen. **Mutation Research**, v. 308, n. 2, p. 191-203, 1994.

TAKEMURA, H.; SAKAKIBARA, H.; YAMAZAKI, S.; SHIMOI, K. Breast cancer and flavonoids - A role in prevention. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 34, p. 6125-6132, 2013.

TEWEY, K. M.; ROWE, T. C.; YANG, L.; HALLIGAN, B. D.; LIU, L. F. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. **Science**, v. 226, n. 4673, p. 466-468, 1984.

THIERY, J. P.; SLEEMAN, J.P. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 131–142, 2006.

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*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TRITTON, T. R.; MURPHREE, S. A.; SARTORELLI, A. C. Adriamycin: a proposal on the specificity of drug action. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 84, n. 3, p. 802-808, 1978.

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

- VAN DUURSEN, M. B.; SANDERSON, J. T.; DE JONG, P. C.; KRAAIJ, M.; VAN DEN BERG, M. Phytochemicals inhibit catechol-O-methyltransferase activity in cytosolic fractions from healthy human mammary tissues: implications for catechol estrogen-induced DNA damage. **Toxicology Sciences**, v. 81, n. 2, p. 316 – 324, 2004.
- VIEGAS-JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- VIEIRA, M. L. T.; DUARTE, R. F.; CAMPOS, L. M. M.; NUNAN, E. A. Comparison of the estrogenic potencies of standardized soy extracts by immature rat uterotrophic bioassay. **Phytomedicine**, v. 15, n. 1, p. 31–37, 2008.
- VIEIRA, L. H. L.; SOARES JÚNIOR, J. M.; NUNES, M. G.; SIMÕES, R. S.; KAARI, C.; HAIDAR, M. A.; BARACAT, E. C. Efeitos da isoflavona e dos estrogênios conjugados equinos sobre a qualidade de vida na pós-menopausa. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 5, p. 248-252, 2007.
- VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112-1116, 2006.
- VILLALOBOS, M.; OLEA, N.; BROTONS, J. A.; OLEA-SERRANO, M. F.; RUIZ DE ALMODOVAR, J. M.; PEDRAZA, V. The *E-screen* assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, n. 9, p. 844 – 850, 1995.
- VIRK-BAKER, M. K.; NAGY, T. R.; BARNES, S. Role of phytoestrogens in cancer therapy. **Planta Medica**, v. 76, n. 11, p. 1132 – 1142, 2010.
- WANDA, G. J.; NJAMEN, D.; YANKEP, E.; FOTSING, M. T.; FOMUM, Z. T.; WOBER, J.; STARCKE, S.; ZIERAU, O.; VOLLMER, G. Estrogenic properties of isoflavones derived from *Millettia griffoniana*. **Phytomedicine**, v. 13, n. 3, p. 139 – 145, 2006.
- WARD, H. A.; KUHNLE, G. G. Phytoestrogen consumption and association with breast, prostate and colorectal cancer in EPIC Norfolk. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, n.1, p. 170 – 175, 2010.
- WARGOVICH, M. J.; WOODS, C.; HOLLIS, D. M.; ZANDER, M. E. Herbals, cancer prevention and health. **The Journal of Nutrition**, v. 131, spl. 11, p. 3034S-3036S, 2001.
- WATTENBERG, L.W. Chemoprevention of Cancer. **Cancer Research**, v. 45, n. 1, p. 1-8, 1985.
- WEI, H.; BOWEN, R.; CAI, Q; BARNES, S.; WANG, Y. Antioxidant and promotional effects of soybean isoflavone genistein. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 208, n. 1, p. 124 - 130, 1995.
- WEINOEHL, S.; FEISTEL, B.; PISCHEL, I.; KOPP, B.; BUTTERWECK, V. Comparative evaluation of two different *Artemisia dracunculoides* L. cultivars for blood sugar lowering effects in rats. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 4, p. 625-629, 2012.
- XIN, W. B.; MAO, Z. J.; JIN, G. L.; QIN, L. P. Two New Xanthones from *Hypericum sampsonii* and Biological Activity of the Isolated Compounds. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 4, p. 536-539, 2011.
- WINK, M.; ALFERMANN, A. W.; FRANKE, R.; WETTERAUER, B.; DISTL, M.; WINDHOVEL, J.; KROHN, O.; FUSS, E.; GARDEN, H.; MOHAGHEGHZADEH, A.; WILDI, E.; RIPPLINGER, P. Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant *in vitro* cultures: anticancer agents. **Plant Genetic Resources**, v. 3, n. 2, p. 90-100, 2005.

WITTE, I; PLAPPERT, U.; WALL, H.; HARTMANN, A. Genetic Toxicity Assessment: Employing the Best Science for Human Safety Evaluation Part III: The Comet Assay as an Alternative to *In Vitro* Clastogenicity Test for Early Drug Candidate Selection. **Toxicological Sciences**, v. 97, n. 1, p. 21-26, 2007.

WON JEONG, K.; CHODANKAR, R.; PURCELL, D. J.; BITTENCOURT, D.; STALLCUP, M. R. Gene-specific patterns of coregulator requirements by estrogen receptor- α in breast cancer cells. **Molecular Endocrinology**, v. 26, n. 6, p. 955-966, 2012.

YANG, G. P.; ROSS, D. T.; KUANG, W. W.; BROWN, P. O.; WEIGEL, R. J. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 6, p. 1517-1523, 1999.

YEH, P. Y.; CHUANG, S. E.; YEH, K. H.; SONG, Y. C.; CHANG, L. L.; CHENG, A. L. Phosphorylation of p53 on Thr55 by ERK2 is necessary for doxorubicin-induced p53 activation and cell death. **Oncogene**, v. 23, n. 20, p. 3580-3588, 2004.

YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. **Breve análise histórica da química de plantas medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental:** In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó-SC: Argus, 2001, 523 p.

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

ZACHAREWSKI, T. *In vitro* bioassays for assessing estrogenic substances. **Environmental Sciences and Technology**, v. 31, p. 613 – 623, 1997.

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, n. 2, p. 330-335, 2008.

ZAND, R. S. R.; JENKINS, D. J. A.; DIAMANDIS, E. P. Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. **Journal of Chromatography**, v. 777, n. 1-2, p. 219-232, 2002.

ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: Faulty theory or fault tests? **Mutation Research**, v. 492, n. 1-2, p. 29 - 38, 2001.

ZELLARS, R. C.; HILSENBECK, S. G.; CLARK, G. M.; ALLRED, D. C.; HERMAN, T. S.; CHAMNESS, G. C.; ELLEDGE, R. M. Prognostic value of p53 for local failure in mastectomy-treated breast cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 9, p. 1906-1913, 2000.

ZHANG, X. H.; CHENG, Y.; SHIN, J. Y.; KIM, J. O.; OH, J. E.; KANG, J. H. A CDK4/6 inhibitor enhances cytotoxicity of paclitaxel in lung adenocarcinoma cells harboring mutant KRAS as well as wild type KRAS. **Cancer Biology & Therapy**, v. 14, n. 7, p. 597-605, 2013.

ZHANG, Q.; MCCORKLE, J. R.; NOVAK, M.; YANG, M.; KAETZEL, D. M. Metastasis suppressor function of NM23-H1 requires its 3'-5' exonuclease activity. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 1, p. 40-50, 2011.

ZHENG, A.; KALLIO, A.; HÄRKÖNEN, P. Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. **Endocrinology**, v. 148, n. 6, p. 2764-2777, 2007.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1. Tabela de genes avaliados na técnica do *PCR Array*.

Símbolo	Descrição	Nome do Gene
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	ABC20, CD243, CLCS, GP170, MDR1, MGC163296, P-GP, PGY1
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	ABC15, ABCP, BCRP, BCRP1, BMDP, CD338, CDw338, EST157481, MGC102821, MRX, MXR, MXR1
ADAM23	ADAM metalloproteinase domain 23	MDC3
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	AKT, MGC99656, PKB, PKB-ALPHA, PRKBA, RAC, RAC-ALPHA
APC	Adenomatous polyposis coli	BTPS2, DP2, DP2.5, DP3, GS
AR	Androgen receptor	AIS, DHTR, HUMARA, HYSP1, KD, NR3C4, SBMA, SMAX1, TFM
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	AT1, ATA, ATC, ATD, ATDC, ATE, DKFZp781A0353, MGC74674, TEL1, Telo1
BAD	BCL2-associated agonist of cell death	BBC2, BCL2L8
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Bcl-2
BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5	API4, EPR-1
BRCA1	Breast cancer 1, early onset	BRCA1, BRCC1, BROVCA1, IRIS, PNCA4, PSCP, RNF53
BRCA2	Breast cancer 2, early onset	BRCC2, BROVCA2, FACD, FAD, FAD1, FANCB, FANCD, FANCD1, GLM3, PNCA2
CCNA1	Cyclin A1	-
CCND1	Cyclin D1	BCL1, D11S287E, PRAD1, U21B31
CCND2	Cyclin D2	KIAK0002, MGC102758
CCNE1	Cyclin E1	CCNE
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	Arc-1, CD324, CDHE, ECAD, LCAM, UVO
CDH13	Cadherin 13, H-cadherin (heart)	CDHH, P105
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	p33(CDK2)
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CAP20, CDKN1, CIP1, MDA-6, P21, SDI1, WAF1, p21CIP1
CDKN1C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	BWCR, BWS, KIP2, WBS, p57
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	ARF, CDK4I, CDKN2, CMM2, INK4, INK4A, MLM, MTS-1, MTS1, P14, P14ARF, P16, P16-INK4A, P16INK4, P16INK4A, P19, P19ARF, TP16
CSF1	Colony stimulating factor 1	MCSF, MGC31930

	(macrophage)	
CST6	Cystatin E/M	-
CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	CTNNB, DKFZp686D02253, FLJ25606, FLJ37923
CTSD	Cathepsin D	CLN10, CPSD, MGC2311
EGF	Epidermal growth factor	HOMG4, URG
EGFR	Epidermal growth factor receptor	ERBB, ERBB1, HER1, PIG61, mENA
ERBB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	CD340, HER-2, HER-2, neu, HER2, MLN 19, NEU, NGL, TKR1
ESR1	Estrogen receptor 1	DKFZp686N23123, ER, ESR, ESRA, Era, NR3A1
ESR2	Estrogen receptor 2 (ER beta)	ER-BETA, ESR-BETA, ESRB, ESTRB, Erb, NR3A2
FOXA1	Forkhead box A1	HNF3A, MGC33105, TCF3A
GATA3	GATA binding protein 3	HDR, MGC2346, MGC5199, MGC5445
GLI1	GLI family zinc finger 1	GLI
GRB7	Growth factor receptor-bound protein 7	-
GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1	DFN7, FAEES3, GST3, GSTP, PI
HIC1	Hypermethylated in cancer 1	ZBTB29, ZNF901, hic-1
ID1	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	ID, bHLHb24
IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF-I, IGF1A, IGFI
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	CD221, IGFIR, IGFR, JTK13, MGC142170, MGC142172, MGC18216
IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3	BP-53, IBP3
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)	BSF2, HGF, HSF, IFNB2, IL-6
JUN	Jun proto-oncogene	AP-1, AP1, c-Jun
KRT18	Keratin 18	CYK18, K18
KRT19	Keratin 19	CK19, K19, K1CS, MGC15366
KRT5	Keratin 5	CK5, DDD, EBS2, K5, KRT5A
KRT8	Keratin 8	CARD2, CK8, CYK8, K2C8, K8, KO
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	ERK, ERK2, ERT1, MAPK2, P42MAPK, PRKM1, PRKM2, p38, p40, p41, p41mapk
MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3	ERK1, HS44KDAP, HUMKER1A, MGC20180, P44ERK1, P44MAPK, PRKM3
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	JNK, JNK1, JNK1A2, JNK21B1, 2, PRKM8, SAPK1
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	-

MKI67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	KIA
MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)	COCA2, FCC2, HNPCC, HNPCC2, MGC5172, hMLH1
MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	CLG4, CLG4A, MMP-II, MONA, TBE-1
MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	CLG4B, GELB, MANDP2, MMP-9
MUC1	Mucin 1, cell surface associated	CD227, EMA, H23AG, KL-6, MAM6, MUC-1, MUC-1, SEC, MUC-1, X, MUC1, ZD, PEM, PEMT, PUM
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	MRTL, bHLHe39, c-Myc
NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	AWD, GAAD, NB, NBS, NDKA, NDPK-A, NDPKA, NM23, NM23-H1
NOTCH1	Notch 1	TAN1, hN1
NR3C1	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	GCCR, GCR, GR, GRL
PGR	Progesterone receptor	NR3C3, PR
PLAU	Plasminogen activator, urokinase	ATF, UPA, URK, u-PA
PRDM2	PR domain containing 2, with ZNF domain	HUMHOXY1, KMT8, MTB-ZF, RIZ, RIZ1, RIZ2
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	10q23del, BZS, DEC, GLM2, MGC11227, MHAM, MMAC1, PTEN1, TEP1
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	COX-2, COX2, GRIPGHS, PGG, HS, PGHS-2, PHS-2, hCox-2
PYCARD	PYD and CARD domain containing	ASC, CARD5, MGC10332, TMS, TMS-1, TMS1
RARB	Retinoic acid receptor, beta	HAP, NR1B2, RRB2
RASSF1	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1	123F2, NORE2A, RASSF1A, RDA32, REH3P21
RB1	Retinoblastoma 1	OSRC, RB, p105-Rb, pRb, pp110
SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	PAI, PAI-1, PAI1, PLANH1
SFN	Stratifin	YWHAS
SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1	FRP, FRP-1, FRP1, FrzA, SARP2
SLC39A6	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6	LIV-1
SLIT2	Slit homolog 2 (Drosophila)	FLJ14420, SLIL3, Slit-2
SNAI2	Snail homolog 2 (Drosophila)	MGC10182, SLUG, SLUGH1, SNAI2, WS2D
SRC	V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2)	ASV, SRC1, c-SRC, p60-Src

	viral oncogene homolog (avian)	
TFF3	Trefoil factor 3 (intestinal)	ITF, P1B, TFI
TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	CED, DPD1, LAP, TGFB, TGFbeta
THBS1	Thrombospondin 1	THBS, THBS-1, TSP, TSP-1, TSP1
TP53	Tumor protein p53	FLJ92943, LFS1, P53, TRP53
TP73	Tumor protein p73	P73
TWIST1	Twist homolog 1 (Drosophila)	ACS3, BPES2, BPES3, CRS1, SCS, TWIST, bHLHa38
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	MGC70609, MVCD1, VEGF, VPF
XBP1	X-box binding protein 1	TREB5, XBP2
ACTB	Actin, beta	PS1TP5BP1
B2M	Beta-2-microglobulin	-
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD, GAPD, MGC88685
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HGPRT, HPRT
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	L10E, LP0, MGC111226, MGC88175, P0, PRLP0, RPP0
HGDC	Human Genomic DNA Contamination	HIGX1A
RTC	Reverse Transcription Control	RTC
PPC	Positive PCR Control	PPC

8.2. Anexo 2. Tabela com a disposição dos genes na placa do *PCR Array*.

ABCB1 A01	ABCG 2 A02	ADAM2 3 A03	AKT1 A04	APC A05	AR A06	ATM A07	BAD A08	BCL2 A09	BIRC5 A10	BCRA1 A11	BCRA 2 A12
CCNA1 B01	CCND 1 B02	CCND2 B03	CCNE 1 B04	CDH1 B05	CDH13 B06	CDK2 B07	CDKN1 A B08	CDKN1 C B09	CDKN2A B10	CSF1 B11	CST6 B12
CTNNB 1 C01	CTSD C02	EGF C03	EGFR C04	ERBB 2 C05	ESR1 C06	ESR2 C07	FOXA1 C08	GATA3 C09	GLI1 C10	GRB7 C11	GSTP1 C12
HIC1 D01	ID1 D02	IGF1 D03	IGF1R D04	IGFBP 3 D05	IL6 D06	JUN D07	KRT18 D08	KRT19 D09	KRT5 D10	KRT8 D11	MAPK 1 D12
MAPK3 E01	MAPK 8 E02	MGMT E03	MKI6 7 E04	MLH1 E05	MMP2 E06	MMP9 E07	MUC1 E08	MYC E09	MME1 E10	NOTCH 1 E11	NR3C1 E12
PGR F01	PLAU F02	PRDM2 F03	PTEN F04	PTGS2 F05	PYCAR D F06	RARB F07	RASSF1 F08	RB1 F09	SERPINE 1 F10	SFN F11	SFRP1 F12
SLC39A 6 G01	SLIT2 G02	SNAI2 G03	SRC G04	TFF3 G05	TGFB1 G06	THBS 1 G07	TP53 G08	TP73 G09	TWIST1 G10	VEGFA G11	XBP1 G12
ACTB H01	B2M H02	GAPDH H03	HPRT 1 H04	RPLP0 H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

8.3. Anexo 3. Resultado dos controles de *PCR Array* para contaminação com DNA genômico e transcriptase reversa.

Overview of the *PCR Array* Performance and Quality Control

PCR Array Catalog Number:	PAHS-131
This data analysis template now accommodates all of the following cDNA Synthesis Kits:	RT ² First Strand cDNA Synthesis Kit (C-03)
	RT ² Nano PreAMP cDNA Synthesis Kit (C-06)
	RT ² FFPE PreAMP cDNA Synthesis Kit (C-07)
Choose Your cDNA Synthesis Kit:	RT ² First Strand cDNA Synthesis Kit (C-03)

1. *PCR Array* Reproducibility:

Test Sample												
Well	exp1	exp2	exp3	exp 4	exp 5	exp 6	exp 7	exp 8	exp 9	exp1 0	AVG exp(1 -10)	ST DEV exp(1 -10)
Average C _t (PPC)	18,3 2	18,8 5	18,8 7								18,68	0,31
ST DEV C _t (PPC)	0,12	0,07	0,08								0,09	--
Average C _t (RTC)	21,3 9	21,4 7	21,7 6								21,54	0,20
ST DEV C _t (RTC)	0,07	0,04	0,01								0,04	--
Control Sample												
Well	exp1	exp2	exp3	exp 4	exp 5	exp 6	exp 7	exp 8	exp 9	exp1 0	AVG exp(1 -10)	ST DEV exp(1 -10)
Average C _t (PPC)	18,2 5	18,7 8	18,6 6								18,56	0,28
ST DEV C _t (PPC)	0,07	0,17	0,09								0,11	--
Average C _t (RTC)	21,3 3	23,5 8	21,4 6								22,12	1,27
ST DEV C _t (RTC)	0,04	2,66	0,03								0,91	--

2. Reverse Transcription Control (RTC):

Test Sample											
Well	exp1	exp2	exp3	exp4	exp5	exp6	exp7	exp8	exp9	exp10	
ΔC _t (AVG RTC - AVG PPC)	3,07	2,62	2,89								
RT Efficiency	Pass	Pass	Pass								
Control Sample											
Well	exp1	exp2	exp3	exp4	exp5	exp6	exp7	exp8	exp9	exp10	
ΔC _t (AVG RTC - AVG PPC)	3,07	4,80	2,80								
RT Efficiency	Pass	Pass	Pass								

3. Genomic DNA Contamination (GDC):

Test Sample										
Well	exp1	exp2	exp3	exp4	exp5	exp6	exp7	exp8	exp9	exp10
C _t (GDC)	35,00	35,00	35,00							
Genomic DNA:	Pass	Pass	Pass							
Control Sample										
Well	exp1	exp2	exp3	exp4	exp5	exp6	exp7	exp8	exp9	exp10
C _t (GDC)	35,00	33,39	35,00							
Genomic DNA:	Pass	Inquiry	Pass							

CAPÍTULO II



Estrogenic and chemopreventive activities of xanthenes and flavones of *Syngonanthus* (Eriocaulaceae)



Ana Paula Siqueira de Oliveira^a, Juliana Ferreira de Sousa^a, Marcelo Aparecido da Silva^b, Felipe Hilário^b, Flávia Aparecida Resende^{a,*}, Mariana Santoro de Camargo^a, Wagner Vilegas^b, Lourdes Campaner dos Santos^b, Eliana Aparecida Varanda^a

^a Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara, São Paulo State University, UNESP, Rodovia Araraquara-Juiz de Fora, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

^b Organic Chemistry Department, Institute of Chemistry, São Paulo State University, UNESP, Rua Professor Francisco Dagni, 130, CP 355, 14801-970 Araraquara, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 March 2013

Received in revised form 12 July 2013

Accepted 16 July 2013

Available online 25 July 2013

Keywords:

Eriocaulaceae

Estrogenicity

Mutagenicity

Antimutagenicity

Phytoestrogens

ABSTRACT

The possible benefits of some bioactive flavones and xanthenes present in plants of the genus *Syngonanthus* prompted us to screen them for estrogenic activity. However, scientific research has shown that such substances may have undesirable properties, such as mutagenicity, carcinogenicity and toxicity, which restrict their use as therapeutic agents. Hence, the aim of this study was to assess the estrogenicity and mutagenic and antimutagenic properties. We used recombinant yeast assay (RYA), with the strain BY4741 of *Saccharomyces cerevisiae*, and Ames test, with strains TA100, TA98, TA97a and TA102 of *Salmonella typhimurium*, to evaluate estrogenicity, mutagenicity and antimutagenicity of methanolic extracts of *Syngonanthus dealbatus* (S.d.), *Syngonanthus macrolepis* (S.m.), *Syngonanthus nitens* (S.n.) and *Syngonanthus suberosus* (S.s.), and of 9 compounds isolated from them (1 = luteolin, 2 = mix of A-1,3,6-trihydroxy-2-methoxyxanthone and B-1,3,6-trihydroxy-2,5-dimethoxyxanthone, 3 = 1,5,7-trihydroxy-3,6-dimethoxyxanthone, 4 = 1,3,6,8-tetrahydroxy-2,5-dimethoxyxanthone, 5 = 1,3,6,8-tetrahydroxy-5-methoxyxanthone, 6 = 7-methoxyluteolin-8-C- β -glucopyranoside, 7 = 7-methoxyluteolin-6-C- β -glucopyranoside, 8 = 7,3'-dimethoxyluteolin-6-C- β -glucopyranoside and 9 = 6-hydroxyluteolin). The results indicated the estrogenic potential of the *S. nitens* methanol extract and four of its isolated xanthenes, which exhibited, respectively, 14.74 ± 1.63 nM; 19.54 ± 6.61 ; 7.20 ± 0.37 ; 6.71 ± 1.02 e 10.01 ± 4.26 nM of estradiol-equivalents (EEQ). None of the extracts or isolated compounds showed mutagenicity in any of the test strains and all of them showed antimutagenic potential, in particular preventing mutations caused by aflatoxin B₁ (AFB₁) and benzo[a]pyrene (B[a]P). The results show that the xanthenes, only isolated from the methanol extract of *S. nitens* capitula, probably were the responsible for its estrogenic activity and could be useful as phytoestrogens, providing a new opportunity to develop hormonal agents. In addition, flavones and xanthenes could also be used as a new antimutagenic agent. Since, the mutagens are involved in the initiation and promotion of several human diseases, including cancer, the significance of novel bioactive phytochemicals in counteracting these pro-mutagenic and carcinogenic effects is now gaining credence.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: RYA, recombinant yeast assay; S.d., methanolic extract of capitula of *Syngonanthus dealbatus*; S.m., methanolic extract of capitula of *Syngonanthus macrolepis*; S.n., methanolic extract of capitula of *Syngonanthus nitens*; S.s., methanolic extract of capitula of *Syngonanthus suberosus*; 1, luteolin; 2, mix of A-1,3,6-trihydroxy-2-methoxyxanthone and B-1,3,6-trihydroxy-2,5-dimethoxyxanthone; 3, 1,5,7-trihydroxy-3,6-dimethoxyxanthone; 4, 1,3,6,8-tetrahydroxy-2,5-dimethoxyxanthone; 5, 1,3,6,8-tetrahydroxy-5-methoxyxanthone; 6, 7-methoxyluteolin-8-C- β -glucopyranoside; 7, 7-methoxyluteolin-6-C- β -glucopyranoside; 8, 7,3'-dimethoxyluteolin-6-C- β -glucopyranoside; 9, 6-hydroxyluteolin; EEQ, estradiol equivalent; SERMs, selective estrogen receptor modulators; ER, estrogen receptor; HRT, hormone replacement therapy; SA, sodium azide; 2-AA, 2-anthraniline; MMC, mitomycin C; NPD, 4-nitro-O-phenylenediamine; B[a]P, benzo[a]pyrene; AFB₁, aflatoxin B₁; Ex-Hex, hexane extract; Ex-DCM, methylene chloride extract; Ex-MeOH, methanol extract; BAW, n-butanol, acetic acid and water solution; UV, ultraviolet light; HSCCC, high speed counter current chromatography; DMSO, dimethylsulfoxide; MI, mutagenic index; +S9, with metabolism; -S9, without metabolism; DES, estrogen diethylstilbestrol; E₂, 17 β -estradiol; ER-RBA, estrogen receptor relative binding affinity; FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; SD, Standard Deviation; I₅₀, percent of inhibition of reversion in bacterial strains.

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3301 4672; fax: +55 16 3301 6940.

E-mail address: flaviarende@yahoo.com.br (F.A. Resende).

0029-128X/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2013.07.002>

1. Introduction

As postmenopausal hormone replacement has become an ever more complex issue, women have sought non estrogen alternatives to treat their menopausal symptoms and improve their overall health. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) have been developed to preserve the benefits of traditional hormone therapy while avoiding unwanted side effects. Phytoestrogens may be added to the list of SERMs, given their agonist/antagonist properties at estrogen sensitive tissues. The ideal SERM would treat such symptoms as hot flashes, vaginal dryness, and mood changes while protecting women from osteoporosis and heart disease. These benefits would be met without substantially increasing the risk of breast or endometrial cancer [1].

Phytoestrogens are plant-derived compounds with estrogenic or antiestrogenic properties [2]. The chemical structure of phytoestrogens is similar to that of steroid hormones and they have been found to interact directly with estrogen receptors (ERs), though the binding affinity of ERs is only 1/500–1/1000 that of estradiol [2,3]. The scientific interest in phytoestrogens derives from the hope of a medical application such as hormone replacement therapy (HRT). Phytoestrogens could thus be beneficial for relieving a variety of symptoms of menopause and helping to prevent bone resorption.

In this study we used the functional recombinant yeast assay (RYA) to assess the presence of phytoestrogens and the potential estrogenic activity of the plant material. The RYA is based on an engineered yeast strain in which the transcription of a reporter gene depends upon the presence in the medium of compounds capable of binding to the human estrogen receptor (ER) [4]. This is a simplified version of the mechanism by which natural estrogens operate in vertebrates; the fundamental similarity of all eukaryote cells ensures that it also works in yeast in a similar way [5].

Although an herb may have been used to treat disease in accordance with experience accumulated over a long time, scientific research has shown that some substances present in such a plant may have undesirable properties, such as mutagenicity, carcinogenicity and toxicity, which may restrict its use as a therapeutic agent.

The *Salmonella typhimurium*/microsome assay (Ames test) is a widely accepted rapid bacterial assay to identify substances that may cause genetic damage that leads to mutations. This test is used worldwide for the initial screening of the mutagenic potential of new chemicals and drugs [6] and it is also used to assess the mutagenicity of many existing compounds, including those extracted from commonly used medicinal plants, those arising from the metabolism of synthetic and herbal drugs and food derivatives [7–10].

The Ames test may also be used to assess the antimutagenic potential of extracts and isolated compounds. The protective effect of flavonoids and xanthenes against the mutagenicity caused by known mutagens has been reported widely [11–16], but very little is known about the antimutagenic properties of some compounds isolated from *Syngonanthus* species. The genus *Syngonanthus* of the family Eriocaulaceae, has been reported to be rich in flavonoids and xanthenes in the capitula and scapes (flower heads and stalks) [17].

The aim of this study was to assay the methanol extracts of the capitula of four species of *Syngonanthus*, *Syngonanthus dealbatus* (S.d.), *Syngonanthus macrolepis* (S.m.), *Syngonanthus nitens* (S.n.) and *Syngonanthus suberosus* (S.s.), and their isolated compounds (1–9), for potential estrogenic, mutagenic and antimutagenic properties.

2. Experimental

2.1. Plant material

Capitula of several Brazilian everlasting flowers (immortelles) were collected as follows: *S. nitens* (Bong, Ruhland), popularly

known as “capim dourado” (voucher SPF 189975), in December 2008 in Jalapão city, Tocantins State; *S. dealbatus* Silv., popularly known as “roxinha” (voucher CFCR 8161), and *S. suberosus* Guil., “margarida” (voucher CFCR 4463), in May 1999 and *S. macrolepis* (voucher SANO 2978) in February of 2002, all in Diamantina, Minas Gerais State, Brazil. The species were authenticated by Professor Dr. Paulo Takeo Sano of the São Paulo University, SP. Voucher specimens were deposited in the Herbarium of the Department of Botany of the Institute of Biosciences, University of São Paulo, Brazil (Fig. 1).

2.2. Extraction

Capitula and scapes of *S. dealbatus* (300 g), *S. macrolepis* (500 g), *S. nitens* (410 g) and *S. suberosus* (300 g) were dried in an oven at 60 °C for 4 d and then powdered. The resulting material was macerated sequentially, at room temperature, with 20 mL of hexane, dichloromethane and methanol, for one week with each solvent, resulting in the hexanic (Ex-Hex), dichloromethane (Ex-DCM) and methanolic (Ex-MeOH) extracts. The extracts were filtered and the filtrates evaporated under reduced pressure. The methanol extracts were selected for this study because, according Sonaglio et al. [18], when it is intended to use the product, derived from the extraction process, in pharmaceutical formulations, we must choose the most appropriate solvent and toxicologically safe and methanol is considered less toxic than other solvents and is able to provide good chromatographic profile.

2.3. Fractionation by gel filtration

3.5 g of flowers extract and 3.0 g of scapes extract were separately dissolved in methanol (20 mL) and each mixture was centrifuged for 5 min at 3200 rpm. This step was repeated 3 times for flowers extract, and 2 times for scapes extract. After collection of relative supernatants, each solution was filtered through an Iso-Disk P-34, 3 mm diameter PTFE membrane, 0.45 µm pore size (Supelco, Bellefonte, PA, USA), and dried in vacuo, yielding 3.0 g from flowers filtrate and 2.6 g from scapes filtrate, respectively. 3.0 g of flowers dried filtrate and 2.6 g of scapes dried filtrate were separately fractionated on a Sephadex LH-20 column (57 × 3 cm), using MeOH as mobile phase, affording 190 and 260 fractions (8 mL), respectively.

2.4. HSCCC analysis

The Sephadex fractions 69–88 (400 mg) of the scapes were fractionated by HSCCC, in ethyl acetate–*n*-butanol–water (3.5:1.5:5.0, v/v/v), using (H → T), triple coil, 1.6, 130 mm (large coil), flow rate 1 mL/min. The lower aqueous phase was used as stationary phase. The retention of the stationary phase for this solvent system was 87.7% at 850 rpm. 84 fractions (3 mL) were obtained.

2.5. HPLC-UV analysis

HSCCC fractions 16–19 were analyzed by HPLC-UV, on a C₁₈ reversed-phase column (Bondapak C₁₈, 300 × 7.6 mm i.d., 10 µm), using H₂O + TFA (0.1%) and CH₃CN + TFA (0.1%) as mobile phases, at a flow rate of 2 mL/min, and detecting at 280 nm. Elution was performed according to the following conditions: after a 3 min hold at 5% B, from 5% B to 42% B in 12 min; to 44% B in 2 min, hold to 44% B for 10 min; to 50% B in 6 min. The chromatographic separation yielded two compounds, that, on the basis of ESI-MSn and NMR experiments, were identified as compounds 6 (3.8 mg, t_R = 16.1 min). HSCCC fractions 68–72 were analyzed by HPLC-UV, according to the previous conditions. The chromatographic separation yielded five compounds identified, on the basis of ESI-MSn and NMR experiments, as 7 (2.8 mg, t_R = 15.9 min).

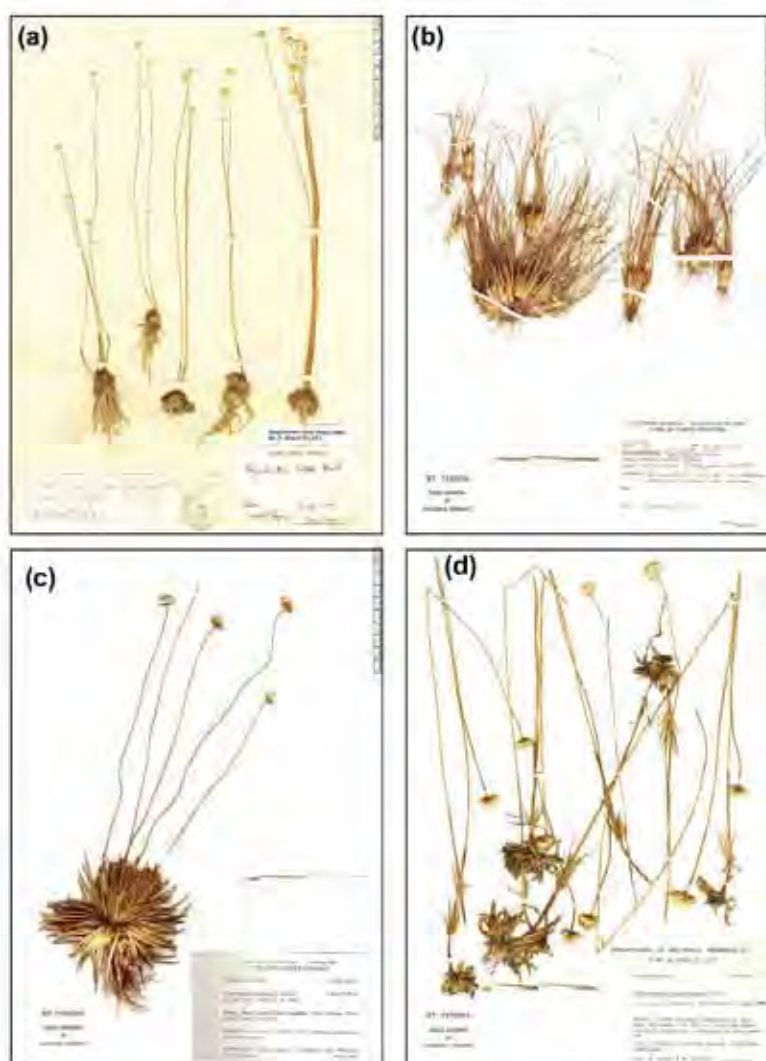


Fig. 1. Herbarium specimens of the species used in this study. [a] *S. niemi*; [b] *S. douglasii*; [c] *S. suberosus* and [d] *S. macrocephalus*. (Available in www.fieldmuseum.org, neotropical herbarium specimens, ericaulaceae family [60]).

2.6. HPLC-IR analysis

Scapes Sephadex fractions 131–253 (240 mg) were isocratically analyzed by HPLC-IR, on a Bondapak C_{18} column (250×10 mm i.d., $10 \mu\text{m}$), using $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (58:42) as eluents, and a flow rate of 2 ml/min. The chromatographic separation yielded three compounds, that, on the basis of ESI-MSn and NMR experiments, were identified as compounds **8** (4.2 mg, $t_R = 16.2$ min), **1** (11.1 mg, $t_R = 19.3$ min), and **9** (11.2 mg, $t_R = 23.6$ min).

2.7. HPLC-DAD analysis

Flowers Sephadex fractions 129–134 (129 mg) were analyzed by HPLC-DAD, on a C_{18} reversed-phase column (Bondapak C_{18} , 300×7.6 mm i.d., $10 \mu\text{m}$), using $\text{H}_2\text{O} + \text{TFA}$ (0.05%) and $\text{MeOH} + \text{T-}$

FA (0.1%) as mobile phases, at a flow rate of 2.5 ml/min. Elution was performed according to the following conditions: from 30% B to 70% B in 20 min; to 90% B in 20 min; and to 100% B in 5 min. The chromatographic separation yielded five compounds identified, on the basis of ESI-MSn and NMR experiments, as compounds **2A** (11.2 mg, $t_R = 18.0$ min), **2B** (6.8 mg, $t_R = 18.5$ min), **3** (5.0 mg, $t_R = 19$ min), **4** (10.2 mg, $t_R = 21.5$ min), and **5** (5.3 mg, $t_R = 22.0$ min) (Fig. 2).

2.8. Recombinant yeast assay (RYA)

Saccharomyces cerevisiae BY4741 strain, transformed with plasmids pH5HE0 (expressing human ER) and pVTB2x (reporter plasmid encompassing the β -galactosidase gene under control of ER), has been described elsewhere [19,20]. RYA tests were performed

essentially as in Garcia-Reyero et al. [20] in 96-well polypropylene microtiter plates (NUNC, Roskilde, Denmark). The concentrations of the extracts and isolated compounds used in this assay were found by a preliminary toxicity test, where the higher concentrations of each sample were selected according to their solubility limit and they were incubated with *Saccharomyces*. The resulting fluorescence was read, compared with negative control and, after this, non-toxic doses were selected and used for the estrogenic evaluation. The initial concentrations used effectively in the test were: S.d.: 1.5 mg/mL; S.m.: 0.5 mg/mL; S.n.: 1.0 mg/mL; S.s.: 1.4 mg/mL; 1: 1.5 mg/mL; 2: 0.2 mg/mL; 3: 2.0 mg/mL; 4: 0.1 mg/mL; 5: 0.1 mg/mL; 6: 2.0 mg/mL; 7: 3.0 mg/mL; 8: 2.0 mg/mL and 9: 4.0 mg/mL. Aliquots of 10 μ L of the initial concentrations of extracts and compounds dissolved in methanol were added to 90 μ L aliquots of yeast culture and these initial inoculations (1:10) were used for subsequent serial dilutions (1:30; 1:90; 1:270 and 1:810) across the microplate. Maximum induction and background readings were estimated by a comparison with 10 μ L of methanol or 10 nM estradiol in methanol as negative and positive controls, respectively. Plates were incubated for 6 h at 30 °C under mild shaking. Yeast cells were then lysed with Y-PER (Pierce, Rockford, IL, USA) and β -galactosidase activity measured with 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (MuGal). The fluorescence was measured for 20 min (one measurement per minute) and the β -galactosidase activity was assayed by the rate of increase in fluorescence (in arbitrary units). RYA does not provide a direct measurement of the molar (or mass) concentration of endocrine disruptors, but of their estrogenic activity. For simplification, results were calculated as estradiol equivalents (EEQ), defined as the amount of estradiol that should be present to account for the observed response in a given sample. These equivalents were calculated from the lowest dilution in which the β -galactosidase activity was indistinguishable from that of the control (only vehicle).

To translate results from serial dilutions to EEQ, we assumed that hormonal dose–response curves follow a sigmoidal function.

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

In which R_0 , R , and R_{max} represent β -galactosidase units obtained without ligand (or extract) addition, at a given ligand concentration $[L]$, and at a saturating ligand concentration, respectively. K_d represents the dissociation constant of the ligand–hormone complex; its value coincides with EC_{50} , the ligand concentration giving 50% of the maximal response. For extract serial dilutions, plotting dilution factors versus relative response followed an inverse sigmoidal function, in which the apparent EC_{50} correspond to the dilution (actual or theoretical) giving 50% the response for 10 nM estradiol. Apparent EC_{50} values for each sample (a minimum of two replicas with at least four points each) were calculated using standard non-linear regression methods. These values were converted to EEQ by assuming they correspond to the EC_{50} of estradiol, 40 ng/L⁻¹ in our assay. Three independent experiments were done with the methanol extracts and isolated compounds, all of them in triplicate [5,19–21].

2.9. Salmonella mutagenicity and antimutagenicity assay

2.9.1. Chemicals

Dimethylsulfoxide (DMSO), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt, D-glucose-6-phosphate disodium salt, L-histidine monohydrate and D-biotin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and the S9 fraction from Aroclor 1254-treated rats from Molecular Toxicology, Inc. (USA).

2.9.2. Standard mutagens

Sodium azide (SA), 2-anthramine (2-AA), mitomycin C (MMC), 4-nitro-O-phenylenediamine (NPD), benzo[a]pyrene (B[a]P) and aflatoxin B₁ (AFB₁) were also obtained from Sigma. Oxoid Nutrient Broth No. 2 (Oxoid, England) and Difco Bacto Agar (Difco, USA) were used for the preparation of bacterial growth media. All other

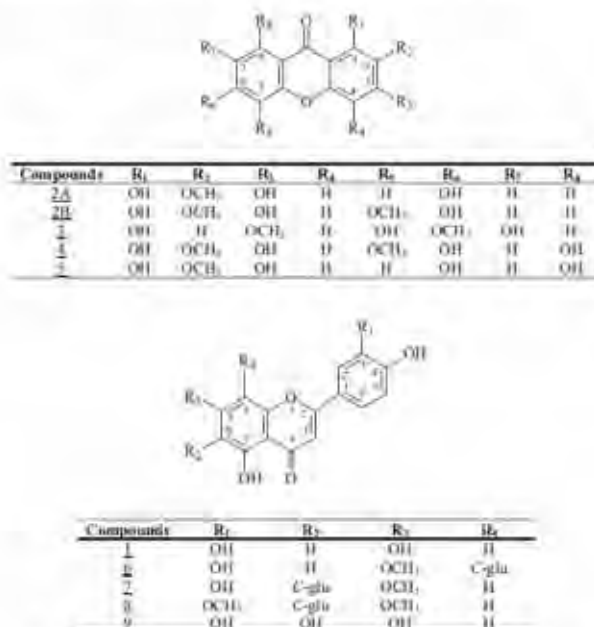


Fig. 2. Structure of the xanthones and flavones identified in *Syngnathus* species.

reagents used to prepare buffers and media were from Merck (Whitehouse Station, NJ, USA) and Sigma.

2.9.3. Experimental procedure

The *Salmonella* mutagenicity assay was performed with *S. typhimurium* strains TA100, TA98, TA97a and TA102, preincubated for 20–30 min with the test samples and standard mutagens, with and without metabolic activation [22]. The S9-mix (Molecular Toxicology, Inc., USA) was freshly prepared before each test with an Aroclor-1254-induced rat liver fraction. *S. typhimurium* strains were kindly provided by Dr. B. Ames, University of California (Berkeley, CA, USA). In the same way as in the RYA assay, the concentrations of the extracts and isolated compounds used were found by a preliminary toxicity test, when the higher concentrations of each sample were selected according to their solubility limit and they were incubated with the strains of *Salmonella*. The reverting colonies were counted, compared with negative control and, after this, non-toxic doses were selected and used for the mutagenic evaluation. The methanol extract concentrations of *S. dealbatus* varied from 4.5 to 54.0 mg/plate, *S. macrolepis* from 1.2 to 14.0 mg/plate, *S. nitens* from 0.8 to 9.0 mg/plate and *S. suberosus* from 4.4 to 53.0 mg/plate, the plates being seeded with TA100, TA98, TA97a and TA102. Isolated compounds 1–9 were tested at 25.0–100.0 µg/plate on TA100 and TA98 strains of *S. typhimurium*. The standard mutagens used as positive controls in experiments without S9-mix were NPD (10.0 µg/plate) for TA98 and TA97a, SA (1.25 µg/plate) for TA100 and MMC (0.5 µg/plate) for TA102. In tests with metabolic activation, 2-AA (1.25 µg/plate) was used for all tested strains in the methanolic extracts evaluation. For the isolated compounds evaluation, B[a]P (0.5 µg/plate) was used for TA98 and AFB₁ (1.0 µg/plate), for TA100, DMSO (100 µl/plate) served as the negative (solvent) control. The statistical analysis was performed with the Salanal computer program, adopting the Bernstein model [23]. The mutagenic index (MI), defined as the average number of revertants per plate divided by the average number of revertants per plate in the negative (solvent) control, was calculated for each dose. A sample was considered mutagenic when MI was equal to or greater than 2 for at least one of the tested doses and there was also a reproducible dose–response curve. Three independent experiments were done with the methanol extracts and isolated compounds, all of them in triplicate.

For antimutagenicity assays, the procedure was the same as for the mutagenicity assay, with some modifications. Cell viability, as a preliminary test, was also determined for each antimutagenesis experiment to assess the potential bactericidal effect of the muta-

gens. The extracts and isolated compounds were incubated with the specific mutagen, for any tested strain of *Salmonella*, in saline solution. Serial dilutions were done (1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵ and 1:10⁶) and 100 µl of the last three dilutions were spread on Petri dishes containing nutrient agar (agar + nutrient medium Oxoid). The colonies were counted after 24 h and a substance was considered cytotoxic when the bacterial survival was less than 60% of that observed for the negative control [24,25].

The antimutagenicity assay was performed with *S. typhimurium* strains and they were preincubated for 20–30 min with mixtures of the sample and standard mutagens. The non-toxic methanol extract concentrations of *S. dealbatus* varied from 0.1 to 36.0 mg/plate, *S. macrolepis* from 1.2 to 9.4 mg/plate, *S. nitens* from 0.3 to 17.4 mg/plate and *S. suberosus* from 2.2 to 35.4 mg/plate, with plates inoculated with TA100, TA98 and TA102. Isolated compounds 1–9 were tested at 12.5–50.0 µg/plate on TA100 and TA98 strains of *S. typhimurium*.

The percent inhibition of mutagenicity was calculated as described by Tachino et al. [26]. The antimutagenicity results were expressed as percent inhibition (the ability of the compounds to inhibit the action of the known mutagen). This was calculated as follows:

$$\text{Inhibition(\%)} = 100 - (T/M) \times 100$$

where *T* is the number of revertant colonies in the plate containing mutagen and compounds, and *M* is the number of revertant colonies in the plate containing only the mutagen.

No antimutagenic effect was recorded when inhibition was lower than 25%, a moderate effect for a value between 25% and 40%, and strong antimutagenicity for values greater than 40% [24,25]. Three independent experiments were done with the methanol extracts and isolated compounds, all of them in triplicate.

The isolated compounds 1–9 were only evaluated for mutagenicity and antimutagenicity in strains TA100 and TA98 because the amount of these substances obtained was very small and preference was given to the strains where the best results were obtained for the extracts.

3. Results

3.1. Rya test

Results for the estrogenic activity of the methanol extracts and isolated compounds of *S. dealbatus*, *S. macrolepis*, *S. nitens* and *S. suberosus* are listed in Figs. 3 and 4. The concentrations that were

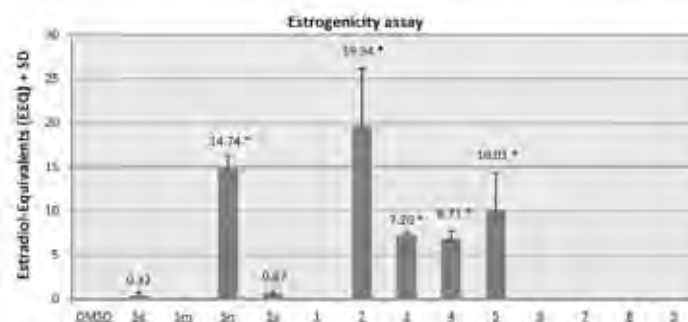


Fig. 3. Estrogenic activity expressed as estradiol equivalents (EEQ) ± Standard Deviation (SD), obtained by recombinant yeast assay (RYA), of methanol extracts of *Sd*, *Sm*, *Sn*, *Ss* and the isolated compounds 1–9, on the *S. cerevisiae* BY4741 strain. Methanol extract of *S. nitens* (*Sn*) and xanthones 2, 3, 8 and 9 were significantly different (*) from negative control (DMSO) and were considered estrogenic in the recombinant yeast assay (RYA). (1 = luteolin, 2 = mix of A-1,3,6-trihydroxy-2-methoxyxanthone and B-1,3,6-trihydroxy-2,5-dimethoxyxanthone, 3 = 1,3,7-trihydroxy-3,6-dimethoxyxanthone, 4 = 1,3,6,8-tetrahydroxy-2,3-dimethoxyxanthone, 5 = 1,3,6,8-tetrahydroxy-5-methoxyxanthone, 6 = 7-methoxyfluteolin-8-C-β-glucopyranoside, 7 = 7-methoxyfluteolin-6-C-β-glucopyranoside, 8 = 7,3'-dimethoxyfluteolin-6-C-β-glucopyranoside and 9 = 6-hydroxyfluteolin).

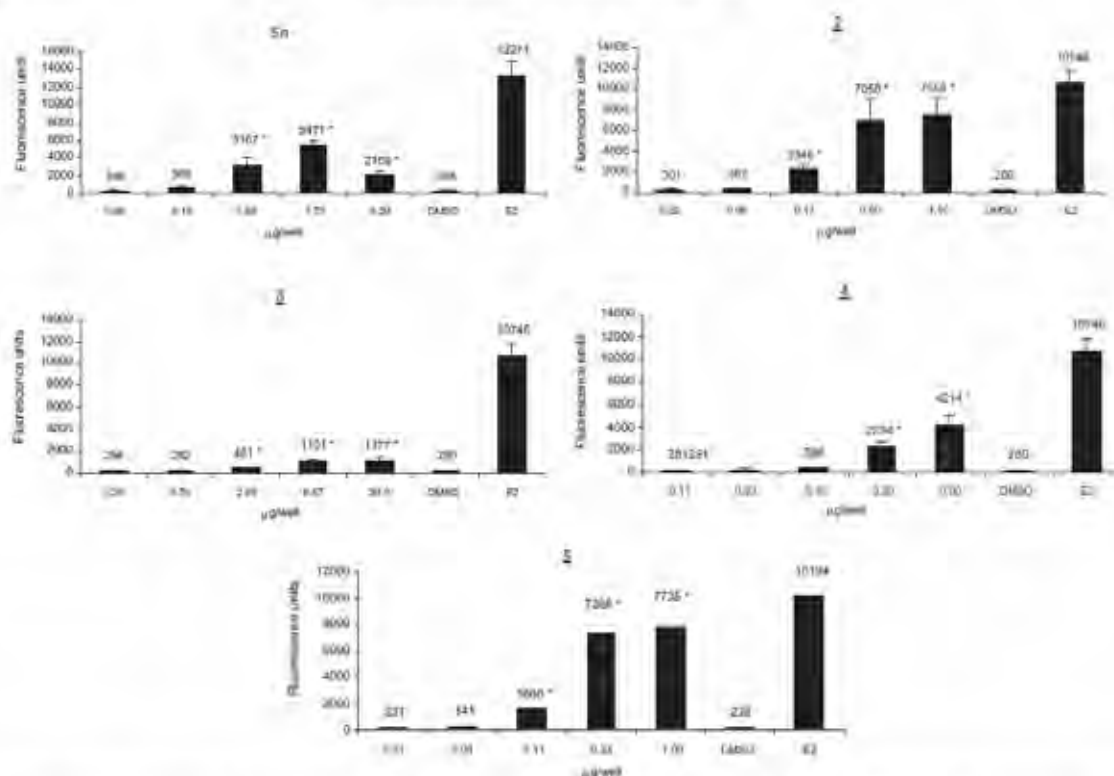


Fig. 4. Estrogenic activity expressed as fluorescence units $\pm$ Standard Deviation (SD), obtained by recombinant yeast assay (RYA), of the five different concentrations (μ g/well) of methanol extract of *S. nitens* (Sn) and the isolated compounds 2–5, on the *S. cerevisiae* BY4741 strain. Xanthenes 2 and 3 were more estrogenic in comparison with the extract Sn and the xanthenes 1 and 4. *Concentrations that were significantly different from negative control (DMSO) ($\alpha = 0.05$).

significantly different from negative control values of EEQ were observed only for the methanol extract of *S. nitens* and xanthenes 2, 3, 4 and 5. For example the value of EEQ obtained for *S. nitens* extract was 14.74 ± 1.63 nM that means that this extract presents an estrogenic activity similar to 14.74 ± 1.63 nM of 17 β -estradiol. The highest value of EEQ was obtained for 2 (19.54 ± 6.61 nM). The Fig. 4 shows the behavior, shown in fluorescence units, of the five different concentrations of the methanol extract of *S. nitens* (Sn) and its four isolated xanthenes (2–5). We also can see that the xanthenes 2 and 5 had the best results in comparison with the extract Sn and the xanthenes 1 and 4. The most estrogenic concentration founded for the xanthone 2 was 1.5 μ g/well; for 3, 20.0 μ g/well; for 4, 0.9 μ g/well and for 5, 1.00 μ g/well.

3.2. *Salmonella* mutagenicity and antimutagenicity assay

The mutagenicity evaluation of the methanol extracts of *S. dealbatus*, *S. macrolepis*, *S. nitens* and *S. suberosus* and its isolated compounds showed only negative results for all the tested concentrations in all tested strains (data not shown).

The antimutagenicity data for four extracts and their isolated substances are distributed in Tables 1–3. According to these results, strong antimutagenic effects (>40% of inhibition) were detected for the four methanol extracts and the nine isolated compounds, in all tested strains, with (+S9) and without (–S9) metabolism.

For strain TA100, S.d. inhibited 78% of the mutations induced by AFB₁ at the concentration 18 mg/plate. For TA98, the values of

inhibition of the B[a]P mutations were more prominent, reaching 96%, at 18 mg/plate. For TA102, the results were less notable, but reached 73% inhibition of MMC mutations, at the highest tested concentration (1.0 mg/plate).

S.m. was strongly inhibitory for TA100 and TA98, in the absence and in the presence of metabolism. For TA98, the greater inhibition was found at the concentration of 9.4 mg/plate (55%). For TA100, this extract reduced the mutagenicity caused by NPD by 46%, at 9.4 mg/plate, without metabolism. For TA102, inhibited by 73% (9.4 mg/plate) the mutations caused by the MMC. In the presence of metabolism, the results improved to 91% of inhibition of the mutations caused by B[a]P, at the highest concentration (9.4 mg/plate), for the TA98 and for the TA100, inhibited 72% of the mutations caused by AFB₁, at 4.7 mg/plate.

S.n. also shows an antimutagenic activity in the TA100 and TA98 strains. For TA100, significant results were found only in the presence of metabolism, the greater value of inhibition founded was 75%, at the highest concentration (6.0 mg/plate). For TA98, the extract reduced 60% of the mutagenicity caused by NPD at 17.5 mg/plate, without metabolism. With S9-mix, the inhibition was much greater: 80% at the highest concentration tested.

The results of S.s. showed antimutagenic activity in three of the test strains. For TA100, the extract inhibited 69% of the reversion rate caused by AFB₁ at the highest concentration (35.4 mg/plate), with metabolism. It also reduced the number of revertants by 42% without metabolism, at the concentration of 17.7 mg/plate. For TA98, it reduced 54% of the mutagenicity caused by

Table 1
Antimutagenicity assay: *S. typhimurium* revertants per plate with methanolic extracts of *Syngoniumanthus dealbanus* (S.d.) and *Syngoniumanthus macrocephalus* (S.m.) in association with sodium azide (SA), in TA100, 4-nitro-O-phenylenediamine (NPD), in TA98, and mitomycin C (MMC), in TA102, and aflatoxin B₁ (AFB₁), in TA100, and benzo[a]pyrene (B[a]P), in TA98, under metabolization (+S9).

Salmonella typhimurium revertants/plate + SD (1)			TA100 mg/plate (+S9)			TA98 mg/plate (+S9)			TA102 mg/plate (+S9)		
TA100 mg/plate (–S9)			AFB ₁ (1 × 10 ^{–3})			NPD (1 × 10 ^{–2})			B[a]P (5 × 10 ^{–4})		
SA (1.25 × 10 ^{–3})	1281 ± 321	932 ± 114	DMSO	226 ± 24	932 ± 114	DMSO	226 ± 24	934 ± 272	DMSO	243 ± 18	3893 ± 801
S.d. + SA	181 ± 22	226 ± 24	S.d. + AFB ₁	4.5	290 ± 9 (60) ^f	S.d. + NPD	4.5	24 ± 4	S.d. + B[a]P	22 ± 2	447 ± 19
2.3	980 ± 62 (24) ^a	241 ± 14 (74) ^f	2.3	9.0	241 ± 14 (74) ^f	2.3	9.0	824 ± 164 (12) ^a	36 ± 13 (85) ^c	36 ± 13 (85) ^c	2603 ± 235 (33) ^b
4.5	813 ± 57 (37) ^a	209 ± 5 (78) ^f	4.5	18.0	209 ± 5 (78) ^f	4.5	18.0	687 ± 166 (27) ^b	31 ± 4 (87) ^c	31 ± 4 (87) ^c	3028 ± 87 (22) ^a
9.0	869 ± 47 (32) ^a	214 ± 20 (77) ^f	9.0	36.0	214 ± 20 (77) ^f	9.0	36.0	557 ± 48 (40) ^b	11 ± 2 (96) ^c	11 ± 2 (96) ^c	3213 ± 643 (18) ^a
18.0	993 ± 78 (23) ^a	932 ± 114	18.0	71.7	932 ± 114	18.0	71.7	300 ± 30 (68) ^c	17 ± 3 (93) ^c	17 ± 3 (93) ^c	1048 ± 217 (73) ^c
SA (1.25 × 10 ^{–3})	1603 ± 21	226 ± 24	SA (1 × 10 ^{–3})	4.4	369 ± 22 (60) ^f	NPD (1 × 10 ^{–2})	4.4	934 ± 272	B[a]P (5 × 10 ^{–4})	243 ± 18	3893 ± 801
DMSO	177 ± 3	226 ± 24	S.m. + AFB ₁	1.2	369 ± 22 (60) ^f	S.m. + NPD	1.2	24 ± 4	DMSO	22 ± 2	447 ± 19
S.m. + SA	973 ± 67 (39) ^b	274 ± 23 (71) ^f	2.3	2.3	274 ± 23 (71) ^f	2.3	2.3	1116 ± 73 ^a	S.m. + B[a]P	60 ± 3 (73) ^c	2603 ± 235 (33) ^b
2.3	1126 ± 254 (30) ^b	261 ± 28 (72) ^f	4.7	4.7	261 ± 28 (72) ^f	4.7	4.7	904 ± 115 (3) ^a	46 ± 8 (81) ^c	46 ± 8 (81) ^c	3028 ± 87 (22) ^a
4.7	1212 ± 253 (24) ^b	270 ± 48 (71) ^f	9.4	9.4	270 ± 48 (71) ^f	9.4	9.4	592 ± 17 (37) ^b	31 ± 6 (87) ^c	31 ± 6 (87) ^c	3213 ± 643 (18) ^a
9.4	866 ± 64 (46) ^f							419 ± 46 (55) ^c	23 ± 5 (91) ^c	23 ± 5 (91) ^c	1048 ± 217 (73) ^c

I = percent of inhibition; DMSO = negative control (100 µL/plate).

The extracts Sd and Sm acted especially on the indirect mutagenic agents. They were able to prevent indirectly caused frameshift mutations, detected by strain TA98, in the presence of B[a]P, and were also able to prevent base-pair substitution mutations, detected by TA100 strain, in the presence of the indirect mutagen AFB₁.

^a No antimutagenic effect (<25% inhibition).

^b Moderate effect (25–40% inhibition).

^c Strong antimutagenic effect (>40% inhibition).

Table 2
Antimutagenicity assay: *S. typhimurium* revertants per plate with methanolic extracts of *Syngoniumanthus nitens* (S.n.) and *Syngoniumanthus suberosus* (S.s.) in association with sodium azide (SA), in TA100, 4-nitro-O-phenylenediamine (NPD), in TA98, and mitomycin C (MMC), in TA102, and aflatoxin B₁ (AFB₁), in TA100, and benzo[a]pyrene (B[a]P), in TA98, under metabolization (+S9).

Salmonella typhimurium revertants/plate + SD (1)			TA100 mg/plate (+S9)			TA98 mg/plate (+S9)			TA102 mg/plate (+S9)		
TA100 mg/plate (–S9)			AFB ₁ (1 × 10 ^{–3})			NPD (1 × 10 ^{–2})			B[a]P (5 × 10 ^{–4})		
SA (1.25 × 10 ^{–3})	1281 ± 321	932 ± 114	DMSO	226 ± 24	932 ± 114	DMSO	226 ± 24	934 ± 272	DMSO	100 ± 9	3893 ± 801
S.d. + SA	181 ± 22	226 ± 24	S.d. + AFB ₁	0.8	362 ± 9 (61) ^c	S.d. + NPD	2.2	24 ± 4	S.n. + B[a]P	17 ± 3	447 ± 19
0.4	1073 ± 263 (16) ^a	265 ± 19 (72) ^f	0.8	1.5	265 ± 19 (72) ^f	0.8	1.5	1014 ± 264 ^a	26 ± 7 (74) ^c	26 ± 7 (74) ^c	2405 ± 968 (38) ^b
0.8	770 ± 99 (40) ^b	259 ± 19 (72) ^f	1.5	3.0	259 ± 19 (72) ^f	1.5	3.0	845 ± 144 (10) ^a	30 ± 4 (70) ^c	30 ± 4 (70) ^c	3850 ± 822 (1) ^a
1.5	1063 ± 83 (17) ^a	235 ± 39 (75) ^f	3.0	6.0	235 ± 39 (75) ^f	3.0	6.0	488 ± 42 (48) ^c	25 ± 4 (75) ^c	25 ± 4 (75) ^c	3611 ± 461 (7) ^a
3.0	971 ± 25 (24) ^a	932 ± 114	6.0	17.5	932 ± 114	6.0	17.5	376 ± 32 (60) ^c	20 ± 3 (80) ^c	20 ± 3 (80) ^c	2233 ± 175 (43) ^c
SA (1.25 × 10 ^{–3})	1603 ± 21	226 ± 24	SA (1 × 10 ^{–3})	4.4	394 ± 24 (58) ^c	NPD (1 × 10 ^{–2})	4.4	934 ± 272	B[a]P (5 × 10 ^{–4})	243 ± 18	3591 ± 962
DMSO	177 ± 3	226 ± 24	S.s. + AFB ₁	4.4	394 ± 24 (58) ^c	S.s. + NPD	4.4	24 ± 4	DMSO	22 ± 2	352 ± 67
S.s. + SA	1011 ± 120 (37) ^b	347 ± 60 (63) ^f	4.4	8.8	347 ± 60 (63) ^f	4.4	8.8	823 ± 54 (12) ^a	S.s. + B[a]P	66 ± 11 (73) ^c	2913 ± 903 (19) ^a
4.4	1148 ± 180 (28) ^b	327 ± 63 (64) ^f	8.8	17.7	327 ± 63 (64) ^f	8.8	17.7	870 ± 126 (7) ^a	53 ± 13 (78) ^c	53 ± 13 (78) ^c	2739 ± 42 (24) ^a
8.8	924 ± 63 (42) ^c		17.7	35.4	292 ± 17 (69) ^c	17.7	35.4	580 ± 86 (38) ^b	32 ± 6 (87) ^c	32 ± 6 (87) ^c	2329 ± 51 (35) ^b
17.7								453 ± 47 (54) ^c	26 ± 6 (89) ^c	26 ± 6 (89) ^c	1294 ± 195 (64) ^c

I = percent of inhibition; DMSO = negative control (100 µL/plate).

The extracts Sn and Ss acted especially on the indirect mutagenic agents. They were able to prevent indirectly caused frameshift mutations, detected by strain TA98, in the presence of B[a]P, and were also able to prevent base-pair substitution mutations, detected by TA100 strain, in the presence of the indirect mutagen AFB₁.

^a No antimutagenic effect (<25% inhibition).

^b Moderate effect (25–40% inhibition).

^c Strong antimutagenic effect (>40% inhibition).

Table 3

Antimutagenicity assay. *S. typhimurium* revertants per plate with nine isolated compounds 1–9 with association with aflatoxin B₁ (AFB₁) in TA100, and benzo(a)pyrene (B[a]P) in TA98, under metabolism (+S9).

<i>Salmonella typhimurium</i> revertants/plate ± SD (I)			
TA100 (μg/plate) (<S9)		TA98 (μg/plate) (+S9)	
AFB ₁ (1 × 10 ⁻⁵)	1751 ± 137	B[a]P (5 × 10 ⁻⁴)	316 ± 7
DMSO	180 ± 13	DMSO	24 ± 2
1 + AFB ₁		1 + B[a]P	
12.5	1015 ± 94 (42) ^a	12.5	260 ± 16 (18) ^a
25.0	759 ± 62 (57) ^c	25.0	194 ± 3 (39) ^b
50.0	673 ± 27 (62) ^c	50.0	162 ± 31 (49) ^b
AFB ₁ (1 × 10 ⁻⁶)	1751 ± 137	B[a]P (5 × 10 ⁻⁵)	316 ± 7
DMSO	180 ± 13	DMSO	24 ± 2
3 + AFB ₁		3 + B[a]P	
12.5	1258 ± 184 (28) ^b	12.5	307 ± 11 (3) ^a
25.0	1142 ± 144 (35) ^b	25.0	298 ± 23 (6) ^a
50.0	864 ± 210 (51) ^b	50.0	274 ± 40 (13) ^a
AFB ₁ (1 × 10 ⁻⁷)	1751 ± 137	B[a]P (5 × 10 ⁻⁶)	316 ± 7
DMSO	180 ± 13	DMSO	24 ± 2
5 + AFB ₁		5 + B[a]P	
12.5	275 ± 1 (84) ^f	12.5	273 ± 21 (14) ^a
25.0	250 ± 7 (86) ^f	25.0	273 ± 5 (14) ^a
50.0	194 ± 3 (89) ^f	50.0	339 ± 28 (18) ^a
AFB ₁ (1 × 10 ⁻⁸)	1751 ± 137	B[a]P (5 × 10 ⁻⁷)	316 ± 7
DMSO	180 ± 13	DMSO	24 ± 2
7 + AFB ₁		7 + B[a]P	
12.5	487 ± 92 (75) ^f	12.5	281 ± 26 (11) ^a
25.0	598 ± 128 (66) ^f	25.0	273 ± 34 (12) ^a
50.0	432 ± 5 (75) ^f	50.0	218 ± 6 (17) ^a
AFB ₁ (1 × 10 ⁻⁹)	1751 ± 137	B[a]P (5 × 10 ⁻⁸)	316 ± 7
DMSO	180 ± 13	DMSO	24 ± 2
9 + AFB ₁		9 + B[a]P	
12.5	447 ± 35 (73) ^f	12.5	273 ± 16 (14) ^a
25.0	440 ± 35 (75) ^f	25.0	253 ± 34 (20) ^a
50.0	461 ± 2 (74) ^f	50.0	257 ± 54 (19) ^a

I = percent of inhibition; DMSO = negative control (100 μL/plate).

All isolated compounds were more effective on inhibiting the mutagenicity caused by AFB₁ (TA100), except isolated compound 4.^a No antimutagenic effect (<25% inhibition).^b Moderate effect (25–40% inhibition).^c Strong antimutagenic effect (>40% inhibition).

NPD, at the last concentration (35.4 mg/plate). With metabolism, it reduced 89% of the mutations caused by B[a]P, also at the last concentration tested.

For TA102, it reduced the mutagenicity caused by MMC by 64% at the concentration of 17.7 mg/plate.

For the isolated compounds, it was found that all of them displayed more strong antimutagenic activity for TA100, reaching the inhibiting 62% (1); 55% (2); 51% (3); 89% (5); 69% (6); 75% (7); 85% (8) and 75% (9) of the mutagenic effect of AFB₁. 4 showed more significantly results for TA98, in the presence of metabolism, and inhibited 54% of the mutagenicity caused by B[a]P.

4. Discussion

Interest in plant-derived estrogens (or phytoestrogens) has recently been increased by the realization that hormone replacement therapy is not as safe or effective as previously thought [27,28]. Unlike xenobiotic estrogens (environmental pollutants with estrogenic activity) that have a negative impact on the development of human reproductive organs and male fertility, phytoestrogens are believed to have mainly beneficial effects on the health [29].

It is, however, a well-established fact that phytoestrogens belong to diverse classes of compounds; therefore, chemical structures alone are not sufficient to predict estrogenic activity. For this reason, bioassay-guided chemical investigation is needed to add further important information on the estrogenic activity of plants and their constituents.

It has long been an enigma why such structurally diverse chemicals have estrogenic activity like the endogenous hormone estradiol. Structure-activity relationships for estrogens date back more than six decades to the early work of Dodds et al. [30,31]. The succeeding two decades saw the discovery of nonsteroidal estrogens, such as synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES), based on understanding of the important structural features governing potency for steroidal estrogens [32].

In principle, chemicals with similar biological activity share common structural features. This implies that structurally diverse estrogens possess a certain degree of structural commonality essential to eliciting estrogenic activity. Although a number of chemical classes are known to be estrogenic, little thorough structural evaluation has been presented for their structural resemblance to the 17β-estradiol (E₂) or the strong synthetic estrogen DES [32].

In this study, we used the functional recombinant yeast assay (RYA) to evaluate the presence of phytoestrogens and the potential estrogenic activity of the plant material. The use of the recombinant yeast system for screening purposes offers several advantages, including the absence of known endogenous receptors, the use of media devoid of steroids [33] and its weak biotransformation activity [34,35]. In this system, the potential estrogenic activity of a substance is revealed by its direct interaction with the ER [33]. This human receptor has previously shown an ability to bind to an array of compounds with a degree of structural diversity [36]. The estrogenic potency of each substance may be reflected in its affinity for the ER.

In the methanol extract of *S. nitens*, some flavones, their glycosylated derivatives and xanthenes were identified. Although flavones have some structural similarities with isoflavones, which are known for their accentuated estrogenicity [37], their estrogenicities are relatively weak [38]. In this study, only xanthenes were estrogenic.

To our knowledge, this is the first report about estrogenic activity of xanthenes assessed by the recombinant yeast assays. 3 and 4 showed a weak estrogenic activity, compared to the other active xanthenes and to estradiol. 2 and 5 were strongly estrogenic.

Fang et al. [32] determined the estrogen receptor Relative Binding Affinity (ER RBA) of 230 chemicals, of which 130 were active and 100 inactive. They saw that a common structural feature for steroids, DES-like chemicals, and most phytoestrogens is the presence of two rings (one of them usually a phenolic ring) separated by two carbons. Chemicals either with two rings separated by one carbon atom (diphenylmethanes), connected directly (polychlorinated biphenyls), or possessing only one ring (alkylphenols, phthalates, and kepone) typically have relatively lower binding affinities than chemicals with two rings separated by two atoms [39]. The elimination or modification of either of these two OH groups significantly reduces a chemical's binding affinity for the receptor. This impact is more dramatic at the 3-position than at the 17 β -position.

They also summarize the general structural requirements relevant to the template E₂ structure: (1) H-bonding ability of the phenolic ring mimicking the 3-OH, (2) H-bond donor mimicking the 17 β -OH and O–O distance between 3- and 17 β -OH, (3) precise steric hydrophobic centers mimicking steric 7 α and 11 β -substituents, (4) hydrophobicity, and (5) a ring structure. These important features provide the structural basis for a xenoestrogen to exhibit binding activity.

Xanthenes evaluated in this study have similar characteristics to those described above and explain the positive test result for estrogenicity. These are the hydroxyls that mimic the 3-OH and 17 β -OH and the O–O distance between 3- and 17 β -OH. They have hydrophobicity and feature a ring-shaped structure, although their phenolic rings are not separated, resulting in a drastic reduction of estrogenic activity [32].

Much research has been done to characterize some of the biological activities of xanthenes and a lot of information has been collected about these polyphenols, but until now nothing has been published about their estrogenicity. Pharmacological assays of natural xanthenes have shown a variety of activities, such as anti-inflammatory, antileukemic, antitumoral, antihepatotoxic, antitumorogenic, antiviral (Herpes), antifungal, myocardial and central nervous system stimulant, hypertensive, antimicrobial, antibacterial and immunosuppressive, highlighting the potential of these special metabolites as medicinal agents [40–44].

While herbs have been used to treat diseases in the high of experience accumulated over a long time, scientific research has to be done on these plants to detect the presence of undesirable properties, such as mutagenicity, carcinogenicity and toxicity.

According to the results of the Ames test, the four methanol extracts (*S. dealbatus*, *S. macrolepis*, *S. nitens* and *S. suberosus*) and all their isolated compounds, with (+S9) and without (–S9) metabolism, were considered non mutagenic in all tested concentrations, for all of tested strains of *Salmonella*.

For any plant material that is a candidate for use as a therapeutic agent, it is clearly an advantage not to have an undesirable property, such as mutagenic activity. An extra advantage is to have, in that case, an antimutagenic activity and thus to be capable of preventing DNA lesions caused by damaging substances. That prompted the testing of the extracts and isolated compounds for antimutagenicity and we can see that the results were excellent.

S. dealbatus, *S. macrolepis*, *S. nitens* and *S. suberosus*, and their isolated compounds, acted especially on the indirect mutagenic agents, assayed by the Ames test with metabolic activation. They were able to prevent indirectly caused frameshift mutations, detected by strain TA98, in the presence of B[a]P, and were also able to prevent base-pair substitution mutations, detected by TA100 strain, in the presence of the indirect mutagen AFB₁.

From the assessment of antimutagenesis of isolated compounds 1–9, we can see that the flavonoids were more significantly active than the xanthenes, showing higher percentages of inhibition of mutagenicity. In this study, the flavonoids evaluated were luteolin and its glucosylated derivatives.

Numerous compounds of the class of flavonoids are known to inhibit the development of mutagenic and carcinogenic processes. The protective effect was identified against direct and indirect acting mutagens and occurs through different mechanisms, including, direct interaction with nucleophilic metabolites and/or, for example, inhibition of metabolic activation of pro-mutagenic [45].

The flavonoids (1, 6, 7, 8 and 9) used in this study, differ from one another by the number and position of hydroxyl, methoxyl groups and by the presence or not of a sugar substituent. All compounds exhibited a protective effect against the indirect acting mutagens, preventing mutagenicity. They show antimutagenic potential in more than one strain, indicating that the number and the position of these functional groups may increase or decrease the effect of protection, depending on the type and concentration of the compounds used.

The presence of the carbonyl group at C4 has been suggested to play an important role in the antimutagenic properties of flavonoids [46]. It is known that the high chemical reactivity of carbonyl compounds is intimately linked to its acid–base properties. The carbonyl compounds usually exert their action through direct interaction with some enzyme usually through hydrogen bonds [47]. Another essential feature probably is a planar structure to the side of the keto function [46]. All flavonoids evaluated in this study show these two structural features.

The *ortho*-dihydroxy structure in the B ring and the 2,3-double bond in conjunction with the 4-oxo function of the C ring provides a good anti-oxidant capacity to luteolin. However, it is lipophilic and may have a good performance in the test systems with biological molecules or membranes. Moreover, the absence of the hydroxyl group in position 3, prevents the oxidation effect of this molecule and luteolin is converted back to its original form after metabolism [48].

The protection of the bacterial genome against the directly acting mutagens, as NPD, SA and MMC may be due to the rapid elimination of mutagens from bacteria before their interaction with the DNA. Moreover, the interaction of the evaluated flavonoids with active intermediates of B[a]P, a well-known environmental procarcinogen, shows which the decrease of the B[a]P-induced DNA adduct formation can be by interacting with reactive intermediates or by interfering with microsomal enzyme activities (e.g., CYP1A1) [49]. However, further studies are needed to confirm this hypothesis.

Similar results for the antimutagenesis of flavonoids (especially, luteolin and its glucosylated derivatives) have been described extensively by many researchers, corroborating the results of this study [11,50–55].

In sum, the results for estrogenic activity, mutagenesis and antimutagenesis show that the xanthenes isolated from the methanol extract of *S. nitens* may be useful as phytoestrogens and the flavonoids, isolated from all of the extracts tested, may act as chemopreventive.

To provide a new opportunity to build on natural product diversity to develop hormonal agents, further studies will be needed. It is essential to assess the tested compounds in further assays, for

example, against the estrogen receptor β (ER β), since epidemiological studies suggest that phytoestrogens like genistein and daidzein reduce the risk of breast and prostate cancers. The preferential binding of isoflavones to that receptor might explain why these compounds reduce the risk of cancer in these organs [56]. In addition, they should be also evaluated for its estrogenicity and anti-estrogenicity *in vivo*, in an animal model, such as the uterotrophic assay [57], since this test is internationally recognized screening method, and they could also have its activity compared with the activity of mammotropic hormones [58], to evaluate if they are capable or not to induce breast cancer or even preventing it.

5. Conclusions

To our knowledge, this is the first report about estrogenic activity of xanthenes assessed by the recombinant yeast assay. 3 and 4 showed a weak estrogenic activity, compared to the other active xanthenes and to estradiol. 2 and 5 were strongly estrogenic. Probably, xanthenes were the responsible for the estrogenic activity showed for the methanol extract of *S. nitens*, because, all the xanthenes were only founded in the methanol extract of *S. nitens* capitula [59]. Xanthenes evaluated in this study have some structural features that ease the binding with the estrogen receptor, such as hydroxyls that mimic the 3-OH and 17 β -OH and the O–O distance between 3- and 17 β -OH. They have hydrophobicity and feature a ring-shaped structure, although their phenolic rings are not separated, resulting in a drastic reduction of estrogenic activity.

Xanthenes and flavones, evaluated in this study, were also able to prevent indirectly caused frameshift mutations, detected by strain TA98, in the presence of B[a]P, and were also able to prevent base-pair substitution mutations, detected by TA100 strain, in the presence of the indirect mutagen AFB $_1$. We can also see that the flavonoids were more active than the xanthenes, showing higher percentages of inhibition of mutagenicity. All flavonoids evaluated in this study have a carbonyl group at C4 and planar structure to the side of the keto function. These structure features have been suggested to play an important role in the antimutagenic properties of flavonoids.

In sum, the results show that the xanthenes isolated from the methanol extract of *S. nitens* could be useful as phytoestrogens, providing a new opportunity to develop hormonal agents. In addition, flavones and xanthenes could also be used as a new antimutagenic agent. Since, the mutagens are involved in the initiation and promotion of several human diseases, including cancer, the significance of novel bioactive phytochemicals in counteracting these pro-mutagenic and carcinogenic effects is now gaining credence.

6. Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

Authors are thankful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), for funding and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), for grants to E.A. Varanda, L.C. Santos and W. Vilegas.

References

- [1] Carusi D. Phytoestrogens as hormone replacement therapy: an evidence-based approach. *Prim Care Update Obstet Gynecol* 2000;7:253–9.
- [2] Umland EM, Cauffman J, Kirk JK, Thomson TE. Phytoestrogens as therapeutic alternatives to traditional hormone replacement in postmenopausal women. *Pharmacotherapy* 2000;20:981–90.
- [3] Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. Clinical review 97: potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2223–35.
- [4] García-Reyero N, Grau E, Castillo M, de Alda M, López, Barceló D, Peña B. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environ Toxicol Chem* 2001;20:1152–8.
- [5] Céspedes R, Lacorte S, Raldúa D, Ginebreda A, Barceló D, Peña B. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain). *Chemosphere* 2005;61:1710–9.
- [6] Morimatsu K, Zeiger E. The Ames *Salmonella/microsome* mutagenicity assay. *Mutat Res* 2000;455:29–60.
- [7] Gomes-Carneiro MRG, Dias MMD, Oliveira ACAX, Puumgarten RF. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of 9-tetabolol in the *Salmonella/microsome* assay. *Mutat Res* 2005;585:105–12.
- [8] Leite ACL, Vieira RFF, Moreira DRM, Brondani DJ, Srivastava RM, Silva VE, Morais Jr MA. Genotoxic activity of 3-[3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl] propionic acid and its peptidyl derivatives determined by Ames and SOS response tests. *Mutat Res* 2005;588:166–71.
- [9] Taira K, Miyashita Y, Okamoto K, Arimoto S, Takahashi E, Negishi T. Novel antimutagenic factors derived from the edible mushroom *Agaricus cylindricus*. *Mutat Res* 2005;586:115–23.
- [10] Verschaeve L, Kesters V, Taylor JLS, Elgorashi EE, Maes A, Van Puyvelde L, De Kimphe N, Van Staden J. Investigation of the antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. *Toxicol In Vitro* 2004;18:29–35.
- [11] Bacon JR, Williamson R, Collin-Gamer R, Lapping G, Langouet S, Bao Y. Sulfuraphane and quercetin modulate PhIP-DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes. *Carcinogenesis* 2003;24:1903–11.
- [12] Edenharder R, Kausche R, Platt KL. The inhibition by flavonoids of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline metabolic activation to a mutagen: a structure-activity relationship study. *Mutat Res* 1997;379:21–32.
- [13] Edenharder R, Tang X. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluorene and 1-nitropyrene by flavonoids, coumarins, quinones and other phenolic compounds. *Food Chem Toxicol* 1997;35:357–72.
- [14] Gupta S, Saha B, Giri AK. Comparative antimutagenic and anticarcinogenic effects of green tea and black tea: a review. *Mutat Res* 2002;512:37–65.
- [15] Słoczyńska K, Pekala E, Wajda A, Węgrzyn G, Marona H. Evaluation of mutagenic and antimutagenic properties of some bioactive xanthone derivatives using *Vibrio harveyi* test. *Let Appl Microbiol* 2010;50:252–7.
- [16] Yoshimoto M, Yahara S, Okuno S, Iwan MS, Ishiguro K, Yamakawa O. Antimutagenicity of mono-, di-, and tricarballic acid derivatives isolated from sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaf. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002;66:2234–6.
- [17] Pacifico M, Napolitano A, Masullo M, Hilario F, Pizzi C, Vilegas W, Piante S, Santos LC. Metabolic fingerprinting of “capim doce” (*Syntherisma nitens*): a basis of Brazilian handicrafts. *Ind Crops Prod* 2011;33:488–96.
- [18] Sonaglio D, González-Oregón G, Petrovick PR, Bassani VI. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, editors. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS, UFSC; 2003.
- [19] Céspedes R, Petrovick M, Raldúa D, Saura U, Peña B, Lacorte S, Viana P, Barceló D. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Anal Bioanal Chem* 2004;378:697–708.
- [20] García-Reyero N, Peña B, Grimalt J, Fernández P, Font R, Polvilio O, Marrat B. Estrogenic activity in sediments from European mountain lakes. *Environ Sci Technol* 2005;15:1427–35.
- [21] Nogueira TN, Boronai S, Jaques S, Barceló D, Peña B. Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta* 2006;60:351–8.
- [22] Maron D, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983;113:173–215.
- [23] Bernstein L, Kaldor J, McCann J, Pike MC. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat Res* 1982;97:267–81.
- [24] Tachino N, Guo D, Bashwood WM, Yamane S, Larsen R, Bashwood R. Mechanisms of the *in vitro* antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[a]pyrene: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen. *Mutat Res* 1994;308:191–203.
- [25] Lira WM, Santos FV, Sannoemiya M, Rodrigues CM, Vilegas W, Varanda EA. Modulatory effect of *Byrsonima humboldtii* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. *J Med Food* 2008;11:111–9.
- [26] Resende FA, Munari CC, Monteiro Neto M, Azevedo Bentes, Tavares DC, Bastos JK, Da Silva Filho AA, Varanda EA. Comparative studies of the (anti) mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and artemisinin C by the bacterial reverse mutation test. *Molecules* 2012;17:2335–50.
- [27] Anklesaria BS. The promise of phytoestrogens. *Indian J Pharmacol* 2011;43:369–70.
- [28] Hays J, Dickens JK, Brunner RL, Kotchen JM, Manson JE, Patterson RE, Aragaki AK, Shumaker SA, Brzyski RG, LaCroix AZ, Granek JA, Valanis BG. Effects of estrogen plus progestin on health related quality of life. *N Engl J Med* 2002;348:1839–54.
- [29] De Nayer A, Beebe WV, Pocock V, Milligan S, Haeghebaert G, De Keuleleire D. Estrogenic and anticarcinogenic properties of luteinone, a lavandulyl flavanone from the roots of *Sophora flavescens*. *J Nat Prod* 2004;67:1829–32.

- [30] Dodds E, Goldberg I, Lawson W. Oestrogenic activity of alkylated stilboestrols. *Nature* 1938;142:34.
- [31] Dodds E, Lawson W. Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus. *Proc R Soc* 1938;125:222–32.
- [32] Fang H, Tong W, Shi LM, Blair R, Perkins R, Branham W, Hass BS, Xie Q, Dial SL, Moland CL, Sheehan DM. Structure–activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chem Res Toxicol* 2001;14:280–94.
- [33] Zacharewski T. Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of *in vivo* and *in vitro* assays. *Environ Health Perspect* 1998;106:577–82.
- [34] Holinka CF, Hata H, Kuramoto H, Gurpide E. Effects of steroid hormones and antisteroids on alkaline phosphatase activity in human endometrial cancer cells (Ishikawa line). *Cancer Res* 1986;46:2771–4.
- [35] Le Guevel R, Pakdel F. Streamlined β -galactosidase assay for analysis of recombinant yeast response to estrogens. *Biotechniques* 2001;30:1000–4.
- [36] Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Gorton JC, Safe SH, Van der Saag PT, Van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 1998;139:4252–63.
- [37] Kinjo J, Tsuchihashi R, Morito K, Hirose T, Aomori T, Nagao T, Okabe H, Nohara T, Masamune Y. Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors α and β (III). estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biol Pharm Bull* 2004;27:185–8.
- [38] Choi SY, Ha TY, Ahn JY, Kim SR, Kang KS, Hwang IK, Kim S. Estrogenic activities of isoflavones and flavones and their structure–activity relationships. *Planta Med* 2008;74:25–32.
- [39] Fang H, Tong W, Perkins R, Soto A, Precht N, Sheehan DM. Quantitative comparison of *in vitro* assays for estrogenic activity. *Environ Health Perspect* 2000;108:723–9.
- [40] Kelly JX, Winter R, Peyton DH, Hinrichs DJ, Riscoe M. Optimization of xanthones for antimalarial activity: the 3,6-bis- ω -diethylaminoalkoxyxanthone series. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:144–50.
- [41] Mahabusarakam W, Proudfoot J, Taylor W, Croft K. Inhibition of lipoprotein oxidation by prenylated xanthones derived from mangostin. *Free Radical Res* 2000;33:643–59.
- [42] Miura T, Ichiki H, Hashimoto I, Iwamoto N, Kao M, Kubo M, Ishihara E, Komatsu Y, Okada M, Ishida T, Tanigawa K. Antidiabetic activity of a xanthone compound, magiferin. *Phytomedicine* 2001;8:85–7.
- [43] Recanatini M, Bisi A, Cavalli A, Belutti F, Gobbi S, Rampa A, Valenti P, Palzer M, Paluszczak A, Hartmann RW. A new class of nonsteroidal aromatase inhibitors: design and synthesis of chromone and xanthones derivatives and inhibition of the P450 enzyme aromatase and 17 α -hydroxylase. *J Med Chem* 2011;44:672–80.
- [44] Tavares LHC, Brito RGL, Guillon GMSP, Conserva LM. Terpenóides e xantonas de *Tomovita brasiliensis* walp. (Cuttiferae). *Rev Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA* 2001;1:1–6.
- [45] Delaney B, Phillips K, Vasquez C, Wilson A, Cox D, Wang HB, Manthey J. Genetic toxicity of a standardized mixture of citrus polymethoxylated flavones. *Food Chem Toxicol* 2002;40:617–24.
- [46] Edenharder R, Grünhage D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat Res* 2003;540:1–18.
- [47] Alcaráz LE, Blanco SE, Puig ON, Tomás F, Ferretti FH. Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Theor Biol* 2000;205:231–40.
- [48] Seelinger G, Merfort I, Schempp CM. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med* 2008;74:1667–77.
- [49] Cao P, Cai J, Gupta RC. Effect of green tea catechins and hydrolyzable tannins on benzo[a]pyrene-induced DNA adducts and structure–activity relationship. *Chem Res Toxicol* 2010;23:771–7.
- [50] Gulluoe M, Karadayi M, Guvenalp Z, Özbek H, Arasoglu T, Bans O. Isolation of some active compounds from *Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare* and determination of their genotoxic potentials. *Food Chem* 2012;130:248–53.
- [51] Mošková S, Mikulášková M, Brindzová I, Valík I, Mikušová L. Genotoxic and antimutagenic activities of extracts from pseudocereals in the *Salmonella* mutagenicity assay. *Food Chem Toxicol* 2010;48:1483–7.
- [52] Nagy M, Krňáková L, Mučaji P, Komšková Z, Šeršeti F, Krajčovič J. Antimutagenic activity and radical scavenging activity of water infusions and phenolics from *Ligustrum* plants leaves. *Molecules* 2009;14:509–18.
- [53] Nakahara K, Trakontivakorn C, Alzoreky NS, Ono H, Onishi-Kameyama N, Yoshida M. Antimutagenicity of some edible Thai plants, and a bioactive carbazole alkaloid, mahanine, isolated from *Micromelum minutum*. *J Agric Food Chem* 2002;50:4796–802.
- [54] Snijman PW, Swanevelder S, Joubert E, Green IR, Gelderblom WCA. The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): Some dose–response effects on mutagen activation–flavonoid interactions. *Mutat Res/Genetic Toxicol Environ Mutagen* 2007;631:111–23.
- [55] Van der Merwe JD, Joubert E, Richards ES, Manley M, Snijman PW, Mamewick JL, Gelderblom WCA. A comparative study on the antimutagenic properties of aqueous extracts of *Aspalathus linearis* (rooibos), different *Cyclopia* spp. (honeybush) and *Camellia sinensis* teas. *Mutat Res/Genetic Toxicol Environ Mutagen* 2006;611:42–53.
- [56] Ketcha-Wanda GJM, Njamen D, Yankep E, Tagatsing-Folsing M, Tanee-Fomum Z, Wober J, Starcke S, Zierau O, Vollmer G. Estrogenic properties of isoflavones derived from *Milletia griffoniana*. *Phytomedicine* 2006;13:139–45.
- [57] Uslu II, Sandal S, Cumbul A, Yildiz S, Aydin M, Yilmaz B. Evaluation of estrogenic effects of polychlorinated biphenyls and organochlorinated pesticides using immature rat uterotrophic assay. *Hum Exp Toxicol* 2013;32(5):476–82.
- [58] Trichopoulos D, Bamsia C, Lagiou P, Trichopoulou A. Are mammatropic hormones mainly permissive for the development of breast cancer? *Int J Cancer* 2006;118:2863–5.
- [59] Cardoso CAL, Zanutto FV, Varanda EA, Sano PT, Villegas W, Santos LC. Quantification of flavonoids, naphthopyranones and xanthones in ericaceae species by LC-PDA. *Am J Anal Chem* 2012;3:1–9.
- [60] Date of Access: 05/27/2013. <<http://fml.fieldmuseum.org/vrnc/?page=results&family=ERIOCAULACEAE&genus=Syngonanthus&intPage=25&rpno=5&s59497>>.