

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

Carolina Pereira da Silva Almeida

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO DE FLAVONOIDES PELO
ENSAIO BACTERIANO DE MUTAÇÃO REVERSA (TESTE DE AMES)**

Araraquara

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

Carolina Pereira da Silva Almeida

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO DE FLAVONOIDES PELO
ENSAIO BACTERIANO DE MUTAÇÃO REVERSA (TESTE DE AMES)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara da UNESP –
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” para obtenção do grau de Farmacêutica-
Bioquímica

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliana Aparecida Varanda

Co-orientadora: Dr^a Flávia Aparecida Resende

Araraquara

2013

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha Mãe, **Andréa**, à minha avó, **Angelina**, e ao meu pai, **Nilton**, pessoas que foram extremamente importantes nessa fase da minha vida. Sempre acreditaram muito em mim, nunca mediram esforços para me ajudar e sempre me incentivaram, mesmo nos momentos mais difíceis. Essas foram as pessoas que me deram todo o suporte necessário para que eu pudesse continuar em busca dos meus objetivos. Sempre demonstraram orgulho de mim e isso me fez acreditar mais em mim mesma.

Este trabalho representa a concretização de um grande sonho, a conclusão de um curso numa grande universidade, e sem a ajuda dessas três maravilhosas pessoas isso não seria possível.

Agradecimentos

À Prof^a Dr^a **Eliana Aparecida Varanda** por ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho. Agradeço muito a confiança depositada em mim.

À Dra. **Flávia Aparecida Resende** por sempre ter me ajudado e me compreendido. Agradeço às nossas conversas, as trocas de experiências e à sua compreensão frente aos meus horários confusos. Agradeço á oportunidade de realizar esse trabalho.

À minha **família** por todo o orgulho que sempre demonstraram sentir por mim. Agradeço a confiança, o incentivo e o suporte dado a mim durante todo o período da faculdade.

Ao **Rafael Romano Domenegueti** por ser o meu porto seguro. Agradeço imensamente pelo amor, carinho, respeito e compreensão. Com você ao meu lado meu caminho é muito mais fácil de ser percorrido. Obrigada por ser tudo o que eu preciso.

Aos meus amigos da república **Quebra Tudo** que desde o primeiro ano de faculdade foram minha segunda casa e minha segunda família.

Às minhas amigas da república **Lolitas** pela convivência, pelas experiências trocadas, pela amizade, companheirismo, risadas e até mesmo pelos desentendimentos, pois tudo isso me fez crescer muito pessoalmente.

À **Turma 80 Noturno** pela longa jornada que compartilhamos. Por toda amizade, ajuda e diversos momentos inesquecíveis que vivemos. Foi muito divertido.

A todos os **professores** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP que fizeram parte da minha formação acadêmica, e que muitas vezes passaram conhecimentos não apenas técnicos, mas também de vida.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 FLAVONOIDES	12
1.2 CÂNCER E MUTAGENICIDADE	13
1.3 TESTE DE AMES	16
2 OBJETIVOS	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 SUBSTÂNCIAS TESTADAS	21
3.2 CEPAS BACTERIANAS UTILIZADAS	21
3.3 PREPARO DE SOLUÇÕES	22
3.3.1 INÓCULO	22
3.3.2 ATIVAÇÃO METABÓLICA	22
3.4 VIABILIDADE CELULAR	23
3.5 ENSAIOS DE ANTIMUTAGENICIDADE	24
4 RESULTADOS	27
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÕES	40
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
8 DADOS FINAIS	48

Lista de ilustrações

FIGURA 1- ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONOIDES.....	13
FIGURA 2 - PLACAS COM <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> (TESTE DE AMES)	19
FIGURA 3- ESTRUTURA MOLECULAR DOS FLAVONOIDES TESTADOS	21
FIGURA 4- CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS RESPONSÁVEIS PELA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS FLAVONOIDES	36
FIGURA 5 - METABOLIZAÇÃO DO B[A]P E ATAQUE DO INTERMEDIÁRIO AO DNA	37

Lista de tabelas

TABELA 1- CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS DAS CEPAS PADRÃO SUGERIDAS PARA O ENSAIO DE TESTE DE AMES	17
TABELA 2 – AS CINCO CONCENTRAÇÕES DISTINTAS, EM NM/PLACA, DE CADA FLAVONOIDE	25
TABELA 3 – ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA DOS FLAVONOIDES CONTRA O MUTÁGENO 4-NITRO-O-FENILENODIAMINA (NPD) NA CEPA TA 98 SEM METABOLIZAÇÃO (- S9)	29
TABELA 4 - ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA DOS FLAVONOIDES CONTRA O MUTÁGENO BENZO[A]PIRENO (B[A]P) NA CEPA TA 98 COM METABOLIZAÇÃO (+S9).	30
TABELA 5 - ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA DOS FLAVONOIDES CONTRA O MUTÁGENO ÁZIDA SÓDICA (AZS) NA CEPA TA 100 SEM METABOLIZAÇÃO (-S9).	31
TABELA 6 - ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA DOS FLAVONOIDES CONTRA O MUTÁGENO AFLATOXINA B ₁ (AFB ₁) NA CEPA TA 100 COM METABOLIZAÇÃO (+S9).	32
TABELA 7 - ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA DOS FLAVONOIDES CONTRA O MUTÁGENO MITOMICINA (MMC) NAS CEPAS TA 102 SEM METABOLIZAÇÃO (-S9).	33
TABELA 8 - ATIVIDADE ANTIMUTAGÊNICA DOS FLAVONOIDES CONTRA O MUTÁGENO 2-AMINOANTRACENO (2-AA) NA CEPA TA 102 COM METABOLIZAÇÃO (+S9). .	34

Lista de abreviaturas e siglas

2-AA - 2-aminoantraceno

AFB₁ - aflatoxina B₁

AZS - azida sódica

B[a]P - benzo[a]pireno

DMSO - dimetilsufóxido

DP - desvio padrão

His - histidina

MMC - mitomicina C

NPD - 4-nitro-*o*-fenilenodiamina

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

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

TA97, TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537 e TA1538 - cepas de *Salmonella typhimurium*

UFC - unidades formadoras de colônias

Resumo

Flavonoides são constituintes fenólicos de plantas que possuem diversas atividades terapêuticas, dentre elas, a atividade antimutagênica. Eles são caracterizados por um esqueleto carbônico C6-C3-C6, em que os componentes C6 são anéis aromáticos e o C3 um anel heterocíclico. Diferenças nessa estrutura podem alterar a atividade e o seu potencial antimutagênico. Para melhor compreensão da atividade antimutagênica exercida pelos flavonoides, neste estudo, os compostos quercetina, kaempferol, luteolina, fisetina, galangina, crisina, flavona, 3-hidroxiavona, 5-hidroxiavona e 7-hidroxiavona, flavonoides que apresentam diferenças no padrão de hidroxilação, foram analisados pelo teste de Ames. Para realização dos ensaios foram utilizadas as cepas TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* em testes com e sem ativação metabólica. Os mutágenos utilizados para comparação do efeito protetor dos flavonoides foram 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (NPD), azida sódica (AZS), mitomicina C (MMC), benzo[*a*]pireno (B[*a*]P), aflatoxina B₁ (AFB₁) e 2-aminoantraceno (2-AA). No ensaio contra o NPD sem ativação metabólica, todos os flavonoides apresentaram efeito antimutagênico, com exceção da fisetina. No ensaio com ativação metabólica contra o B[*a*]P, todos os flavonoides demonstraram forte efeito antimutagênico, com exceção da quercetina que potencializou o efeito mutagênico do mutágeno. No ensaio contra a AZS sem ativação metabólica, os flavonoides luteolina, crisina, 3-hidroxiavona e 7-hidroxiavona reduziram a resposta mutagênica do mutágeno. No ensaio contra a AFB₁ com ativação metabólica, os flavonoides kaempferol, luteolina, crisina e galangina (em concentrações mais elevadas) exibiram efeito antimutagênico. No

ensaio contra a MMC sem ativação metabólica, os flavonoides kaempferol, luteolina, 3-hidroxiflavona e 7-hidroxiflavona apresentaram efeito antimutagênico. No ensaio contra o 2-AA com ativação metabólica, todos os flavonoides apresentaram efeito antimutagênico, exceto flavona e kaempferol.

Palavras-chave: flavonoides; teste de Ames; atividade antimutagênica

1 Introdução

1.1 Flavonoides

Em 1930 foi descoberta uma nova substância química em laranjas. A princípio essa substância foi designada como vitamina P, pois acreditava-se tratar de um novo tipo de vitamina. Porém, algum tempo depois, essa substância ficou conhecida como flavonoide (Simões *et al.*, 2007).

Os flavonoides representam um grande grupo de constituintes fenólicos de plantas (Chebil *et al.*, 2007). São metabólitos especiais de baixo peso molecular e exercem os seguintes mecanismos nos vegetais: influenciam o transporte do hormônio vegetal, auxina, atuam em mecanismos de defesa, alelopatia, modulação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e proporcionam coloração para flores a fim de atrair polinizadores (Buer *et al.*, 2010).

Segundo Czebot e Kuszteľak (1993), os flavonoides são regularmente consumidos por humanos (aproximadamente 1g/dia) e são encontrados em grandes quantidades em vegetais, frutas, chás, vinho tinto e chocolate (Macready *et al.*, 2009).

Do ponto de vista químico, os flavonoides são caracterizados por um esqueleto de carbono C6-C3-C6, em que os componentes C6 são anéis aromáticos e o C3 um anel heterocíclico (Lazaro, 2002). Essa estrutura básica (Figura 1) pode sofrer reações de alquilação, glicosilação e oligomerização, e, devido às características de seus substituintes, pode apresentar diferentes níveis de oxidação. Sendo assim, os flavonoides podem ser encontrados como agliconas ou sob a forma de glicosídeos e/ou derivados metilados e/ou acilados. Tudo isso

explica a grande diversidade estrutural encontrada nos flavonoides (Coutinho *et al.*, 2009).

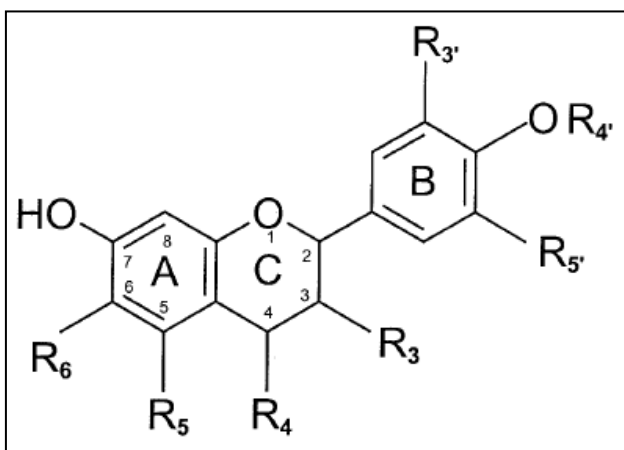


Figura 1- Estrutura básica dos flavonoides

As modificações estruturais no anel central dos flavonoides os diferenciam nas seguintes classes: chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-ols e antocianidinas (Coutinho *et al.*, 2009).

Diante de tamanha diversidade estrutural ainda há pouca informação quanto à estrutura molecular que confere atividade farmacológica à classe de flavonoides (Howells *et al.*, 2011).

1.2 Câncer e mutagenicidade

De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (2005), uma das doenças mais proeminentes nos seres humanos hoje é o câncer. Estima-se que as mortes por câncer continuam a crescer, com uma estimativa de nove milhões de mortes no ano de 2015 e 11,4 milhões de mortes até 2030. É uma doença na

qual a célula perde o controle do crescimento (Bishop and Schiestl, 2001; Dehghan-Noodeh *et al.*, 2013).

Existem cerca de 100 tipos de câncer e qualquer parte do corpo pode ser afetada. Cerca de um terço dos casos poderia ser curado se detectado a tempo (Organização Mundial de Saúde; Sanjorjo, 2012) e por isso a prevenção é muito importante.

Os principais eventos genotóxicos que levam as células à mutação são: ativação de oncogenes e desativação de genes supressores tumorais, deleções, translocações anormais, amplificação e/ou substancial aneuploidia. A célula, após a ocorrência desses eventos genotóxicos, possui capacidade ilimitada de replicação e é resistente a sinais inibitórios do crescimento e insensível a sinais de morte e apoptose (Preston, 2005; Sanjorjo, 2012). Geralmente a mutação ocorre em uma única célula, entretanto, após uma série de mutações adicionais se transforma progressivamente em malignidade (Khan e Pelengaris, 2006; Mashele e Fuku, 2011).

Basicamente existem três etapas no processo de carcinogênese: a iniciação, a promoção e a progressão. A iniciação é a etapa em que uma substância produz alterações genéticas na célula. Como consequência, pode ocorrer uma das seguintes situações: mutação dos genes de controle do crescimento, produção de oncogênes ativos ou perda/inativação de genes supressores de tumor. Já a promoção é a etapa na qual há alteração da expressão genética e crescimento clonal reversível da população de células iniciadas e a progressão é a última etapa e se caracteriza pelo expressivo aumento do número de células mutadas. Esta etapa é irreversível (Butterworth *et al.*, 1992; Yu, 2003).

Muitos estudos sugerem que uma das maneiras de se prevenir o câncer é através da quimioprevenção. A quimioprevenção pode ser definida como a prevenção da indução, inibição ou atraso da progressão do câncer, ou a reversão da carcinogênese até o estágio pré-maligno pela administração de agentes farmacológicos adequados ou ingestão de macronutrientes, micronutrientes ou metabólitos secundários vegetais (De Flora e Ferguson, 2005; Namasivayam, 2011). Um dos mecanismos para a quimioprevenção do câncer é a antimutagenese (Namasivayam, 2011).

Substâncias antimutagênicas são capazes de interferir no processo de progressão do câncer direta ou indiretamente e elas podem ser classificadas da seguinte maneira: a) substâncias que inativam ou inibem a absorção de agentes mutagênicos, b) substâncias que impedem que agentes mutagênicos atinjam sítios alvo ou, c) substâncias que suprimem a expressão neoplásica das células afetadas e iniciam o reparo ao DNA, independentemente dos mecanismos envolvidos (Waters *et al.*, 1996; Sanjorjo, 2012).

Há um evidente interesse científico e comercial na busca por agentes quimiopreventivos a partir de fontes naturais (Kinghorn *et al.*, 2003; Mashele e Fuku, 2011) e o reino vegetal é uma das fontes mais importante, pois fornece muitas substâncias com novas estruturas e diferentes mecanismos de ação (Chang *et al.*, 1999; Mashele e Fuku, 2011).

Uma vez que a exposição a substâncias genotóxicas presentes no ambiente e nos alimentos é praticamente inevitável, investigações por compostos exógenos que possam evitar ou minimizar os danos induzidos no DNA assumiram grande importância, já que as mutações desempenham um papel importante na carcinogênese (Yoshikawa *et al.*, 1996; Zahin *et al.*, 2013).

1.3 Teste de Ames

O teste de Ames é um ensaio muito eficiente no rastreamento de atividade mutagênica e antimutagênica de novos compostos (Maron e Ames, 1983; El-Sayed e Hussin, 2013).

Trata-se de um ensaio bacteriano amplamente aceito para identificação de substâncias que podem produzir danos genéticos que conduzem a mutações do gene. O teste utiliza cepas de *Salmonella typhimurium* auxotróficas em relação à histidina e detectam preferencialmente mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases do DNA. Essas linhagens possuem várias mutações no operon da histidina que são os alvos para mutação reversa, bem como mutações do tipo *rfa* que causam perda parcial da barreira de lipopolissacárides da parede bacteriana facilitando a difusão de moléculas grandes para o interior da célula, deleção do gene *uvrB* que causa deficiência do sistema de reparo por excisão e fator R plasmidial (plasmídeo pKM101) que confere resistência à ampicilina e contém os genes *muc AB*, cuja expressão causa estímulo no sistema de reparo susceptível ao erro (“*error prone*”). Essas mutações lhes conferem maior sensibilidade na detecção de diversos mutágenos (Maron e Ames, 1983).

As diferentes mutações preexistentes nas cepas desse ensaio podem nos fornecer informações úteis a respeito dos tipos de alterações genéticas produzidas pelas substâncias analisadas (Tabela 1) (OECD, 1997).

As cepas padrão de *S. typhimurium* sugeridas para o teste de Ames são TA97, TA98, TA100 e TA102. No entanto, outras cepas são comparativamente

usadas com estas, como as cepas TA1535 e TA1538 para TA100 e TA98, respectivamente (Maron e Ames, 1983).

Tabela 1- Características genotípicas e fenotípicas das cepas padrão sugeridas para o ensaio de teste de Ames

Cepa	Mutação em <i>His</i>	Plasmídeo	Outras mutações	Tipos de mutação detectável	
TA97	<i>hisD6610</i> <i>his01242</i>	pKM101	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB</i> <i>chl bio</i>)	<i>Frameshift</i>	Adição de um par G:C
TA98	<i>hisD3052</i>	pKM101	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB</i> <i>chl bio</i>)	<i>Frameshift</i>	Deleção de um par G:C
TA100	<i>hisG46</i>	pKM101	<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB</i> <i>chl bio</i>)	Substituição	G:C para A:T
TA102	pAQ1 (<i>hisG428</i>)	pKM101, pAQ1	<i>rfa</i>	Substituição	A:T para G:C
TA1535	<i>hisG46</i>		<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB</i> <i>chl bio</i>)	Substituição	G:C para A:T
TA1537	<i>hisC3076</i>		<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB</i> <i>chl bio</i>)	<i>Frameshift</i>	Adição de um par C:G
TA1538	<i>hisD3052</i>		<i>rfa</i> Δ (<i>uvrB</i> <i>chl bio</i>)	<i>Frameshift</i>	Deleção de um par G:C

A cepa TA98 detecta agentes mutagênicos que alteram o quadro de leitura do DNA. Os mutágenos que causam alterações genéticas na TA98 geralmente atuam em unidades repetitivas do DNA fazendo com que haja uma restauração do quadro correto de leitura envolvida na síntese de histidina (Maron e Ames, 1983).

A cepa TA98 assim como a TA100 são utilizadas para estudo do metabolismo de nitrocarcinógenos, já que apresentam a característica em comum de serem nitroredutases-deficientes. Devido a tal propriedade, a cepa TA100 é utilizada para detectar agentes que possam induzir metilação e causar

substituição de pares de bases (G-C). Uma mutação detectada por essa cepa revela ocorrência de uma mutação pontual, a alteração do par de bases G-C (prolina) por A-T (leucina). Assim é produzida a primeira enzima da biossíntese de histidina, restaurando o fenótipo selvagem (Maron e Ames, 1983).

A cepa TA97 de *S. typhimurium* apresenta uma mutação (no gene *hisGD6610*) que causa adição de um par de bases C-G (*frameshift*), levando a proliferação bacteriana pelo restabelecimento normal do quadro de leitura. Esta mutação induzida dá origem à formação de uma pseudo histidinol desidrogenase, o que permite o crescimento muito próximo ao normal em meio mínimo (Maron e Ames, 1983).

A cepa TA102 possui plasmídeo para resistência à tetraciclina e o gene mutante *hisG*, determinando seu caráter auxotrófico. Contém também o par de bases A-T no sítio crítico da reversão, e por isso detecta uma grande variedade de mutágenos oxidativos e de agentes *crosslinks* que atacam preferencialmente estes pares de base, diferenciando-a das demais cepas que são revertidas nos alvos G-C (Maron e Ames, 1983).

No teste de Ames as células bacterianas são expostas à substância teste na presença e na ausência de um sistema de ativação metabólico exógeno. O sistema mais frequentemente usado é a fração pós-mitocondrial (S9), preparada a partir de fígados de ratos tratados com agentes indutores de enzimas e suplementado com cofatores (OECD, 1997).

O ensaio pode ser realizado através de duas técnicas, incorporação em placas ou pré-incubação. Na primeira técnica, as células bacterianas são misturadas em ágar e semeadas imediatamente em meio mínimo. Na técnica de pré-incubação, primeiramente as células bacterianas são expostas à substância

teste e a mistura incubada, em seguida ela é semeada em ágar em placas com meio mínimo. Para ambas as técnicas, após 48 horas de incubação, as colônias revertentes são contadas e comparadas com os controles (Figura 2) (OECD, 1997).

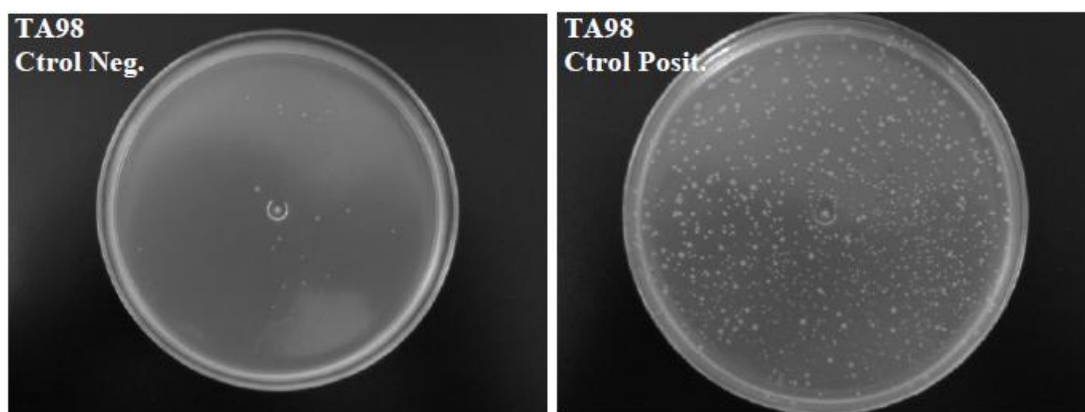


Figura 2 - Placas com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames)

Em cada ensaio devem ser incluídos controles positivos, tanto na presença como na ausência do sistema de metabolização. Os controles positivos são compostos comprovadamente mutagênicos, em concentrações já padronizadas para cada cepa utilizada (Maron e Ames, 1983; Aiub e Felzenszwalb, 2011).

Ensaio que utilizam organismos unicelulares e bactérias têm enormes vantagens. Por serem unicelulares, esses sistemas permitem a análise da composição genética exata. Nos ensaios antimutagênicos são necessárias grandes quantidades de células vivas e através da utilização de células bacterianas isso é facilmente conseguido. Estes sistemas são simples, permitem testes rápidos e são relativamente de baixo custo (Mortelmans e Zeiger, 2000; Dehghan-Noodeh *et al.*, 2013).

2 Objetivos

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimutagênica dos flavonoides quercetina, kaempferol, luteolina, fisetina, galangina, crisina, flavona, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona e 7-hidroxiflavona, através do teste de Ames contra os mutágenos 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (NPD), azida sódica (AZS) e mitomicina C (MMC) em experimentos sem ativação metabólica e benzo[*a*]pireno (B[*a*]P), aflatoxina B₁ (AFB₁) e 2-aminoantraceno (2-AA) em experimentos com ativação metabólica.

3 Materiais e Métodos

3.1 Substâncias testadas

Foram testados dez flavonoides, quercetina, kaempferol, luteolina, fisetina, galangina, crisina, flavona, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona e 7-hidroxiflavona, cujas estruturas encontram elucidadas na Figura 3. Esses flavonoides apresentam diferenças no padrão de hidroxilação.

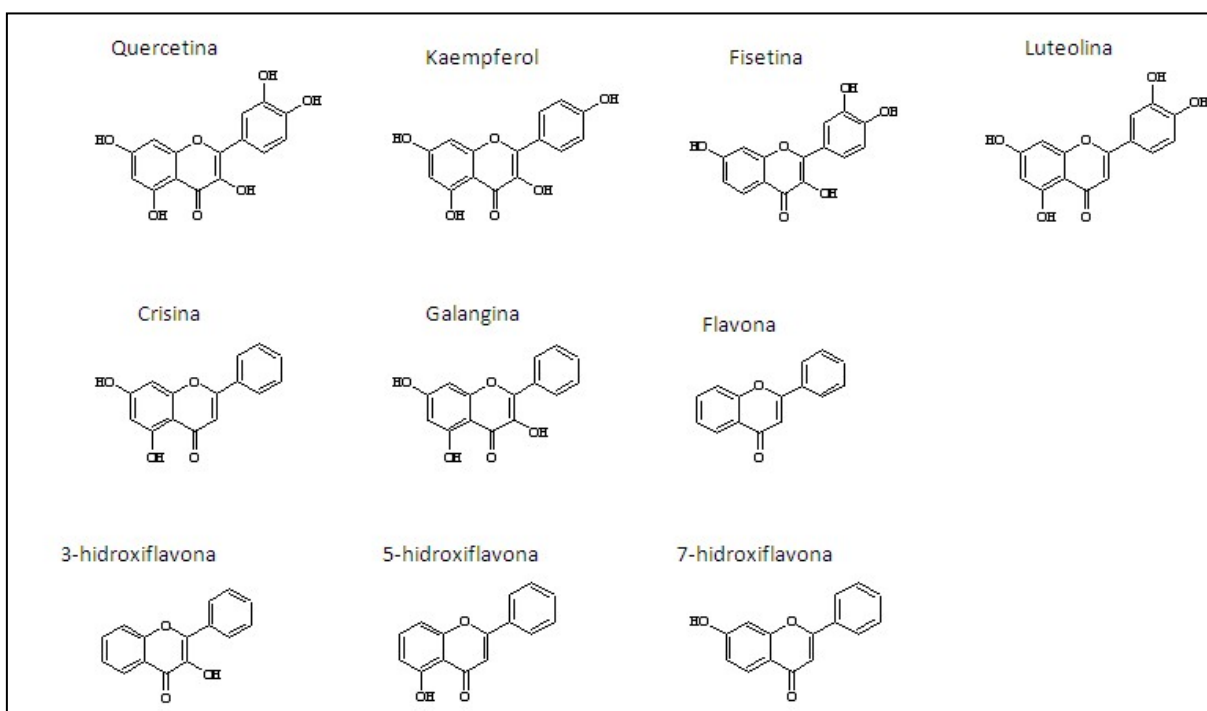


Figura 3- Estrutura molecular dos flavonoides testados

Os flavonoides foram obtidos comercialmente pela Sigma-Aldrich (Brasil) e foram dissolvidos em DMSO em cinco concentrações distintas.

3.2 Cepas bacterianas utilizadas

Para a realização do teste de antimutagenicidade foram utilizadas as linhagens TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*. Estas cepas foram

gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, EUA.

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

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

3.3 Preparo de soluções

3.3.1 Inóculo

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

3.3.2 Ativação metabólica

Foi utilizada a fração microsomal S9 homogeneizada de fígado de rato Sprague Dawley (fração pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas, aroclor 1254- 500 mg/kg). A fração S9 revela se a substância teste é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para

se tornar mutagênica. O sistema de ativação metabólica consiste de 4% de fração S9, 1% de 0,4 M de cloreto de magnésio, 1% de 1,65 M de cloreto de potássio, 0,5% de 1 M de glicose-6-fosfato e 4% de 0,1 M de b-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1 M, além de 50% de 0,2 M de tampão fosfato pH 7,4 e 39,5% de água destilada estéril (Maron e Ames, 1983). Essa mistura foi mantida em banho de gelo durante todo o ensaio. Todas as soluções foram preparadas sempre a fresco e utilizadas num período máximo de 3 horas.

3.4 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada para cada experimento de antimutagênese para avaliar o potencial efeito bactericida dos mutágenos quando associados aos flavonoides.

Para o desenvolvimento do teste de viabilidade, as células bacterianas foram misturadas aos mutágenos, em tubos de ensaio, e também ao sistema de metabolização (S9) ou solução tampão, quando não havia necessidade de metabolização. Foram feitos também o controle espontâneo do crescimento bacteriano, contendo apenas solução tampão; e o controle negativo, contendo solução tampão ou sistema de metabolização (S9) e o solvente DMSO.

A mistura foi homogeneizada em vortex e o conteúdo de cada tubo foi adicionado a 9 mL de solução fisiológica estéril a fim de se obter uma diluição de 1:10. Em seguida, a mistura foi homogeneizada e 1 mL transferido para outro tubo com o mesmo volume de solução fisiológica, procedendo dessa maneira diluições seriadas até obtenção de uma diluição de 1×10^{-5} .

Do tubo contendo a diluição de 1×10^{-5} e 1×10^{-4} retirou-se 0,1 mL e semeou-se com alça de Drigalsky em placas com ágar nutriente. A placa foi

incubada por 24 horas a 37°C. Decorrido este período as colônias foram contadas e calculadas as unidades formadoras de colônias (UFC)/mL ($\text{UFC} = \text{diluição} \times \text{número de colônias} \times 10$).

O percentual de viabilidade para cada tratamento foi comparado com o número de colônias do controle negativo. As respostas foram consideradas citotóxicas quando o percentual de sobrevivência da amostra foi inferior a 60% do total observado para o controle negativo (Vargas *et al.*, 1993; Lira *et al.*, 2008).

3.5 Ensaios de antimutagenicidade

O ensaio foi realizado pelo método de pré-incubação, de acordo com Maron e Ames (1983). Os flavonoides quercetina, kaempferol, crisina, fisetina, flavona, luteolina, galangina, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona e 7-hidroxiflavona foram dissolvidos em DMSO em cinco concentrações distintas. As concentrações foram selecionadas com base nos testes de viabilidade celular.

As concentrações dos flavonoides utilizadas nos ensaios estão exibidas na Tabela 2.

Tabela 2 – As cinco concentrações distintas, em nM/placa, de cada flavonoide

Flavonoide	Concentrações (nM/placa)				
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a
Quercetina	12,1	24,5	49,1	98,4	147,8
Kaempferol	14,3	29,0	58,0	116,4	174,7
Crisina	16,1	32,6	65,3	131,0	196,7
Fisetina	14,3	29,0	58,0	116,4	174,7
Luteolina	14,3	29,0	58,0	116,4	174,7
Flavona	18,4	37,3	74,7	149,8	225,0
Galangina	2,6	5,1	10,2	20,5	30,7
3-hidroxiflavona	17,2	34,8	69,7	139,8	209,9
5-hidroxiflavona	17,2	34,8	69,7	139,8	209,9
7-hidroxiflavona	17,2	34,8	69,7	139,8	209,9

Para cada concentração distinta de cada um dos flavonoides estudados foram adicionados 0,5 mL de tampão fosfato 0,2 M, para os ensaios sem metabolização, ou 0,5 mL de mistura S9 4% para ensaios com metabolização, 0,1 mL de cultura de bactérias e os agentes mutagênicos conhecidos. Como mutágenos diretos foram utilizados 10,0 µg/ placa de NPD para *S. typhimurium* TA98, 1,25 µg/ placa de AZS para *S. typhimurium* TA100 e 0,5 µg/ placa de MMC para *S. typhimurium* TA102. Como mutágenos indiretos foram utilizados 1,0 µg/ placa de B[a]P para *S. typhimurium* TA98, 0,5 µg/ placa de AFB1 para *S. typhimurium* TA100 e 1,25 µg/ placa de 2-AA para *S. typhimurium* TA102.

As misturas foram então incubadas a 37°C por 20 a 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 mL de *top agar* suplementado com traços de histidina e biotina. Homogeinizou-se levemente e plaqueou-se em meio mínimo glicosado. Após solidificação do *top agar*, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período, as colônias revertentes foram contadas manualmente. O ensaio foi realizado em triplicata.

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

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

onde:

T é o número de revertentes na placa contendo mutágeno e compostos;

M é o número de revertentes na placa contendo apenas o mutágeno.

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

4 Resultados

Os resultados obtidos da avaliação do potencial antimutagênico dos flavonoides estão apresentados nas Tabelas 4-9. Os resultados foram expressos como média do número de revertentes/placa (M), desvio padrão (DP) e porcentagem de inibição da atividade mutagênica dos mutágenos NPD e B[a]P, na linhagem TA 98, AZS e AFB₁, na linhagem TA100 e MMC e 2-AA, na linhagem TA102 de *S. typhimurium*.

Os resultados do ensaio que utilizou a cepa TA98 sem S9 e que foi tratado com o mutágeno NPD mostraram que todos os flavonoides testados apresentam forte efeito antimutagênico, exceto os flavonoides fisetina, que não exibiu efeito antimutagênico, e a flavona, que exibiu moderado efeito antimutagênico (Tabela 3). No ensaio com essa mesma linhagem, em experimentos com S9 e tratado com o mutágeno B[a]P, foi possível observar um forte efeito antimutagênico para todos os flavonoides estudados, exceto para a quercetina, que estimulou a mutagenicidade do B[a]P (Tabela 4).

O ensaio realizado com a cepa TA100, sem S9 e tratado com o mutágeno AZS não apresentou efeito antimutagênico dos flavonoides avaliados, exceto os flavonoides luteolina, crisina, 3-hidroxiflavona e 7-hidroxiflavona, que apresentaram efeito antimutagênico moderado quando testados em concentrações mais elevadas (Tabela 5). Quando os flavonoides foram avaliados com S9 e contra o mutágeno AFB₁, os resultados mostraram que a quercetina, fisetina, flavona, 3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona e 7-hidroxiflavona não apresentaram efeito antimutagênico. Além disso, mostrou que o flavonoide crisina apresenta um moderado efeito antimutagênico. Enquanto que os flavonoides kaempferol e luteolina apresentaram um forte efeito antimutagênico. Por outro lado, a

galangina estimulou o efeito mutagênico da AFB₁, porém em concentrações mais elevadas exibiu moderada atividade antimutagênica (Tabela 6).

O ensaio realizado com a cepa TA102, sem S9 e com o mutágeno MMC mostrou que os flavonoides quercetina, fisetina, crisina, galangina, flavona e 5-hidroxiavona não exibiram efeito antimutagênico. Já a luteolina e 7-hidroxiavona apresentaram efeito antimutagênico moderado e o kaempferol e 3-hidroxiavona apresentaram forte efeito antimutagênico (Tabela 7). Quando associados ao mutágeno 2-AA em experimentos com S9, os flavonoides quercetina, fisetina, luteolina, crisina, galangina, 3-hidroxiavona e 7-hidroxiavona exibiram forte efeito antimutagênico. O flavonoide 5-hidroxiavona exibiu um efeito moderado e os flavonoides kaempferol e flavona não apresentaram efeito antimutagênico (Tabela 8).

Os resultados obtidos neste estudo foram submetidos ao periódico *Food Chemistry* com artigo intitulado “**Differences in the hydroxylation pattern of flavonoids alter their chemoprotective effect against direct and indirect acting mutagens**” e está sob análise de publicação.

Tabela 3 – Atividade antimutagênica dos flavonoides contra o mutágeno 4-nitro-*o*-fenilenodiamina (NPD) na cepa TA 98 sem metabolização (-S9)

<i>Salmonella typhimurium</i> revertentes/placa $\pm$ DP (I)									
TA98 (-S9)									
$\mu\text{g/ placa}$									
NPD	1771 $\pm$ 50	NPD	1771 $\pm$ 50	NPD	947 $\pm$ 38	NPD	1160 $\pm$ 43	NPD	1280 $\pm$ 46
Quercetina + NPD		Kaempferol + NPD		Fisetina + NPD		Luteolina + NPD		Crisina + NPD	
12,1	483 $\pm$ 63 (73 ^c)	14,3	769 $\pm$ 76 (57 ^c)	14,3	940 $\pm$ 19 (1 ^a)	14,3	908 $\pm$ 49 (22 ^a)	16,1	775 $\pm$ 24 (39 ^b)
24,5	591 $\pm$ 48 (67 ^c)	29,0	580 $\pm$ 32 (67 ^c)	29,0	866 $\pm$ 15 (8 ^a)	29,0	837 $\pm$ 64 (28 ^b)	32,6	880 $\pm$ 39 (31 ^b)
49,1	456 $\pm$ 54 (74 ^c)	58,0	633 $\pm$ 67 (64 ^c)	58,0	826 $\pm$ 24 (13 ^a)	58,0	798 $\pm$ 38 (31 ^b)	65,3	725 $\pm$ 53 (43 ^c)
98,4	493 $\pm$ 59 (72 ^c)	116,4	584 $\pm$ 79 (67 ^c)	116,4	803 $\pm$ 25 (15 ^a)	116,4	727 $\pm$ 36 (37 ^b)	131,0	749 $\pm$ 39 (41 ^c)
147,8	472 $\pm$ 63 (73 ^c)	174,7	552 $\pm$ 62 (69 ^c)	174,7	759 $\pm$ 29 (20 ^a)	174,7	675 $\pm$ 27 (42 ^c)	196,7	667 $\pm$ 49 (48 ^c)
DMSO	12 $\pm$ 3	DMSO	12 $\pm$ 3	DMSO	15 $\pm$ 3	DMSO	18 $\pm$ 5	DMSO	21 $\pm$ 5
NPD	1771 $\pm$ 50	NPD	1280 $\pm$ 46	NPD	1280 $\pm$ 46	NPD	1280 $\pm$ 46	NPD	1280 $\pm$ 46
Galangina + NPD		Flavona + NPD		3-hidroxiflavona + NPD		5-hidroxiflavona + NPD		7-hidroxiflavona + NPD	
2,6	719 $\pm$ 79 (59 ^c)	18,4	1013 $\pm$ 17 (21 ^a)	17,2	953 $\pm$ 42 (26 ^b)	17,2	731 $\pm$ 15 (43 ^c)	17,2	775 $\pm$ 24 (41 ^c)
5,1	852 $\pm$ 21 (52 ^c)	37,3	1066 $\pm$ 43 (17 ^a)	34,8	792 $\pm$ 54 (38 ^b)	34,8	706 $\pm$ 20 (45 ^c)	34,8	706 $\pm$ 71 (45 ^c)
10,2	568 $\pm$ 73 (68 ^c)	74,7	959 $\pm$ 31 (25 ^b)	69,7	708 $\pm$ 27 (45 ^c)	69,7	682 $\pm$ 36 (47 ^c)	69,7	697 $\pm$ 48 (45 ^c)
20,5	604 $\pm$ 26 (66 ^c)	149,8	849 $\pm$ 44 (34 ^b)	139,8	681 $\pm$ 24 (47 ^c)	139,8	654 $\pm$ 38 (49 ^c)	139,8	628 $\pm$ 39 (51 ^c)
30,7	629 $\pm$ 72 (64 ^c)	225,0	844 $\pm$ 41 (34 ^b)	209,9	544 $\pm$ 34 (57 ^c)	209,9	585 $\pm$ 49 (54 ^c)	209,9	616 $\pm$ 24 (52 ^c)
DMSO	12 $\pm$ 3	DMSO	21 $\pm$ 5	DMSO	21 $\pm$ 5	DMSO	21 $\pm$ 5	DMSO	21 $\pm$ 5

I = porcentagem de inibição; DP = desvio padrão; ^a sem efeito antimutagênico (< 25% inibição); ^b efeito moderado (25% - 40% inibição); ^c forte efeito antimutagênico (> 40% inibição). DMSO: 100 $\mu\text{L/placa}$. Indutor de danos: 4-nitro-*o*-fenilenodiamino (NPD – 10,0 $\mu\text{g/ placa}$)

Tabela 4 - Atividade antimutagênica dos flavonoides contra o mutágeno benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) na cepa TA 98 com metabolização (+S9).

<i>Salmonella typhimurium</i> revertentes/placa $\pm$ DP (I)									
TA98 (+S9)									
$\mu\text{g/ placa}$									
B[<i>a</i>]P	684 $\pm$ 30	B[<i>a</i>]P	684 $\pm$ 30	B[<i>a</i>]P	689 $\pm$ 22	B[<i>a</i>]P	689 $\pm$ 22	B[<i>a</i>]P	689 $\pm$ 22
Quercetina + B[<i>a</i>]P		Kaempferol + B[<i>a</i>]P		Fisetina + B[<i>a</i>]P		Luteolina + B[<i>a</i>]P		Crisina + B[<i>a</i>]P	
12,1	623 $\pm$ 68 (9 ^a)	14,3	186 $\pm$ 77 (73 ^c)	14,3	492 $\pm$ 48 (29 ^b)	14,3	147 $\pm$ 23 (79 ^c)	16,1	160 $\pm$ 26 (77 ^c)
24,5	950 $\pm$ 65	29,0	234 $\pm$ 69 (66 ^c)	29,0	430 $\pm$ 17 (38 ^b)	29,0	196 $\pm$ 36 (71 ^c)	32,6	159 $\pm$ 13 (77 ^c)
49,1	880 $\pm$ 51	58,0	250 $\pm$ 41 (63 ^c)	58,0	432 $\pm$ 30 (37 ^b)	58,0	171 $\pm$ 15 (75 ^c)	65,3	155 $\pm$ 35 (77 ^c)
98,4	2055 $\pm$ 23	116,4	173 $\pm$ 72 (75 ^c)	116,4	370 $\pm$ 13 (46 ^c)	116,4	182 $\pm$ 29 (74 ^c)	131,0	102 $\pm$ 23 (85 ^c)
147,8	2119 $\pm$ 62	174,7	148 $\pm$ 62 (78 ^c)	174,7	351 $\pm$ 46 (49 ^c)	174,7	160 $\pm$ 35 (77 ^c)	196,7	126 $\pm$ 14 (82 ^c)
DMSO	19 $\pm$ 4	DMSO	19 $\pm$ 4	DMSO	23 $\pm$ 3	DMSO	23 $\pm$ 3	DMSO	23 $\pm$ 3
B[<i>a</i>]P	684 $\pm$ 30	B[<i>a</i>]P	689 $\pm$ 22	B[<i>a</i>]P	689 $\pm$ 22	B[<i>a</i>]P	689 $\pm$ 22	B[<i>a</i>]P	689 $\pm$ 22
Galangina + B[<i>a</i>]P		Flavona + B[<i>a</i>]P		3-hidroxi flavona + B[<i>a</i>]P		5-hidroxi flavona + B[<i>a</i>]P		7-hidroxi flavona + B[<i>a</i>]P	
2,6	327 $\pm$ 37 (52 ^c)	18,4	268 $\pm$ 13 (61 ^c)	17,2	167 $\pm$ 7 (76 ^c)	17,2	295 $\pm$ 17 (57 ^c)	17,2	171 $\pm$ 18 (75 ^c)
5,1	333 $\pm$ 51 (51 ^c)	37,3	212 $\pm$ 24 (69 ^c)	34,8	164 $\pm$ 20 (76 ^c)	34,8	222 $\pm$ 27 (68 ^c)	34,8	123 $\pm$ 29 (82 ^c)
10,2	295 $\pm$ 28 (57 ^c)	74,7	225 $\pm$ 20 (67 ^c)	69,7	156 $\pm$ 12 (77 ^c)	69,7	179 $\pm$ 11 (74 ^c)	69,7	127 $\pm$ 17 (82 ^c)
20,5	244 $\pm$ 39 (64 ^c)	149,8	206 $\pm$ 18 (70 ^c)	139,8	158 $\pm$ 15 (77 ^c)	139,8	146 $\pm$ 26 (79 ^c)	139,8	133 $\pm$ 14 (81 ^c)
30,7	286 $\pm$ 48 (58 ^c)	225,0	173 $\pm$ 25 (75 ^c)	209,9	136 $\pm$ 19 (80 ^c)	209,9	133 $\pm$ 17 (81 ^c)	209,9	135 $\pm$ 29 (80 ^c)
DMSO	19 $\pm$ 4	DMSO	23 $\pm$ 3	DMSO	23 $\pm$ 3	DMSO	23 $\pm$ 3	DMSO	23 $\pm$ 3

I = porcentagem de inibição; DP = desvio padrão; ^a sem efeito antimutagênico (< 25% inibição); ^b efeito moderado (25% - 40% inibição); ^c forte efeito antimutagênico (> 40% inibição). DMSO: 100 $\mu\text{L/placa}$. Indutor de danos: benzo[*a*]pireno (B[*a*]P – 1,0 $\mu\text{g/ placa}$)

Tabela 5 - Atividade antimutagênica dos flavonoides contra o mutágeno ázida sódica (AZS) na cepa TA 100 sem metabolização (-S9).

<i>Salmonella typhimurium</i> revertentes/placa $\pm$ DP (I)									
TA100 (-S9)									
$\mu\text{g/ placa}$									
AZS	1411 $\pm$ 35	AZS	1411 $\pm$ 35	AZS	1048 $\pm$ 33	AZS	1048 $\pm$ 33	AZS	1048 $\pm$ 33
Quercetina + AZS		Kaempferol + AZS		Fisetina + AZS		Luteolina + AZS		Crisina + AZS	
12,1	1133 $\pm$ 57 (20 ^a)	14,3	1080 $\pm$ 41 (23 ^a)	14,3	980 $\pm$ 25 (6 ^a)	14,3	868 $\pm$ 49 (17 ^a)	16,1	951 $\pm$ 36 (9 ^a)
24,5	1117 $\pm$ 26 (21 ^a)	29,0	1142 $\pm$ 34 (19 ^a)	29,0	934 $\pm$ 25 (11 ^a)	29,0	841 $\pm$ 18 (20 ^a)	32,6	929 $\pm$ 60 (11 ^a)
49,1	1160 $\pm$ 18 (18 ^a)	58,0	1155 $\pm$ 50 (18 ^a)	58,0	929 $\pm$ 61 (11 ^a)	58,0	773 $\pm$ 43 (26 ^b)	65,3	877 $\pm$ 34 (16 ^a)
98,4	1187 $\pm$ 39 (16 ^a)	116,4	1169 $\pm$ 40 (17 ^a)	116,4	873 $\pm$ 63 (17 ^a)	116,4	724 $\pm$ 12 (31 ^b)	131,0	835 $\pm$ 25 (20 ^a)
147,8	1168 $\pm$ 43 (17 ^a)	174,7	1163 $\pm$ 45 (18 ^a)	174,7	884 $\pm$ 30 (16 ^a)	174,7	717 $\pm$ 22 (32 ^b)	196,7	667 $\pm$ 44 (36 ^b)
DMSO	109 $\pm$ 20	DMSO	109 $\pm$ 20	DMSO	124 $\pm$ 40	DMSO	124 $\pm$ 40	DMSO	124 $\pm$ 40
AZS	1411 $\pm$ 35	AZS	1048 $\pm$ 33	AZS	1048 $\pm$ 33	AZS	1048 $\pm$ 33	AZS	1048 $\pm$ 33
Galangina + AZS		Flavona + AZS		3-hidroxi flavona + AZS		5-hidroxi flavona + AZS		7-hidroxi flavona + AZS	
2,6	1384 $\pm$ 45 (2 ^a)	18,4	829 $\pm$ 44 (21 ^a)	17,2	996 $\pm$ 66 (5 ^a)	17,2	957 $\pm$ 29 (9 ^a)	17,2	909 $\pm$ 23 (13 ^a)
5,1	1353 $\pm$ 33 (4 ^a)	37,3	805 $\pm$ 37 (23 ^a)	34,8	964 $\pm$ 28 (8 ^a)	34,8	928 $\pm$ 59 (11 ^a)	34,8	888 $\pm$ 46 (15 ^a)
10,2	1339 $\pm$ 52 (5 ^a)	74,7	867 $\pm$ 70 (17 ^a)	69,7	864 $\pm$ 29 (18 ^a)	69,7	883 $\pm$ 65 (16 ^a)	69,7	865 $\pm$ 37 (17 ^a)
20,5	1363 $\pm$ 44 (3 ^a)	149,8	891 $\pm$ 54 (15 ^a)	139,8	815 $\pm$ 15 (22 ^a)	139,8	916 $\pm$ 32 (13 ^a)	139,8	855 $\pm$ 23 (18 ^a)
30,7	1380 $\pm$ 23 (2 ^a)	225,0	925 $\pm$ 47 (12 ^a)	209,9	725 $\pm$ 11 (31 ^b)	209,9	913 $\pm$ 27 (12 ^a)	209,9	760 $\pm$ 45 (27 ^b)
DMSO	109 $\pm$ 20	DMSO	124 $\pm$ 40	DMSO	124 $\pm$ 40	DMSO	124 $\pm$ 40	DMSO	124 $\pm$ 40

I = porcentagem de inibição; DP = desvio padrão; ^a sem efeito antimutagênico (< 25% inibição); ^b efeito moderado (25% - 40% inibição); ^c forte efeito antimutagênico (> 40% inibição). DMSO: 100 $\mu\text{L/placa}$. Indutor de danos: ázida sódica (AZS – 1,25 $\mu\text{g/ placa}$)

Tabela 6 - Atividade antimutagênica dos flavonoides contra o mutágeno aflatoxina B₁ (AFB₁) na cepa TA 100 com metabolização (+S9).

<i>Salmonella typhimurium</i> revertentes/placa ± DP (I)									
TA100 (+S9)									
µg/ placa									
AFB ₁	1123 ± 37	AFB ₁	1123 ± 37	AFB ₁	1049 ± 38	AFB ₁	1060 ± 77	AFB ₁	1060 ± 77
Quercetina + AFB₁		Kaempferol + AFB₁		Fisetina + AFB₁		Luteolina + AFB₁		Crisina + AFB₁	
12,1	1051 ± 52 (6 ^a)	14,3	1083 ± 29 (4 ^a)	14,3	873 ± 29 (17 ^a)	14,3	944 ± 35 (11 ^a)	16,1	940 ± 28 (11 ^a)
24,5	1109 ± 69 (1 ^a)	29,0	821 ± 40 (27 ^b)	29,0	977 ± 49 (7 ^a)	29,0	948 ± 17 (11 ^a)	32,6	876 ± 16 (17 ^a)
49,1	1064 ± 48 (5 ^a)	58,0	864 ± 44 (23 ^b)	58,0	953 ± 20 (9 ^a)	58,0	877 ± 23 (17 ^a)	65,3	920 ± 30 (13 ^a)
98,4	917 ± 49 (18 ^a)	116,4	607 ± 68 (46 ^c)	116,4	983 ± 16 (6 ^a)	116,4	749 ± 20 (29 ^b)	131,0	725 ± 18 (32 ^b)
147,8	870 ± 29 (22 ^a)	174,7	455 ± 48 (59 ^c)	174,7	959 ± 28 (9 ^a)	174,7	609 ± 26 (42 ^c)	196,7	720 ± 17 (32 ^b)
DMSO	192 ± 77	DMSO	192 ± 77	DMSO	200 ± 47	DMSO	219 ± 68	DMSO	219 ± 68
AFB ₁	1123 ± 37	AFB ₁	1049 ± 38	AFB ₁	1049 ± 38	AFB ₁	1049 ± 38	AFB ₁	1049 ± 38
Galangina + AFB₁		Flavona + AFB₁		3-hidroxiavona + AFB₁		5-hidroxiavona + AFB₁		7-hidroxiavona + AFB₁	
2,6	1613 ± 58	18,4	945 ± 39 (10 ^a)	17,2	987 ± 60 (6 ^a)	17,2	1028 ± 25 (2 ^a)	17,2	929 ± 34 (11 ^a)
5,1	1491 ± 50	37,3	983 ± 28 (6 ^a)	34,8	985 ± 30 (6 ^a)	34,8	1041 ± 16 (1 ^a)	34,8	941 ± 28 (10 ^a)
10,2	1467 ± 69	74,7	969 ± 33 (8 ^a)	69,7	907 ± 22 (14 ^a)	69,7	909 ± 38 (13 ^a)	69,7	877 ± 29 (16 ^a)
20,5	944 ± 47 (16 ^a)	149,8	929 ± 27 (11 ^a)	139,8	975 ± 36 (7 ^a)	139,8	848 ± 34 (19 ^a)	139,8	904 ± 29 (14 ^a)
30,7	773 ± 55 (31 ^b)	225,0	995 ± 37 (5 ^a)	209,9	948 ± 34 (10 ^a)	209,9	869 ± 24 (17 ^a)	209,9	972 ± 17 (7 ^a)
DMSO	192 ± 77	DMSO	200 ± 47	DMSO	200 ± 47	DMSO	200 ± 47	DMSO	200 ± 47

I = porcentagem de inibição; DP = desvio padrão; ^a sem efeito antimutagênico (< 25% inibição); ^b efeito moderado (25% - 40% inibição); ^c forte efeito antimutagênico (> 40% inibição). DMSO: 100 µL/placa. Indutor de danos: aflatoxina B₁ (AFB₁ – 0,5 µg/ placa)

Tabela 7 - Atividade antimutagênica dos flavonoides contra o mutágeno mitomicina (MMC) nas cepas TA 102 sem metabolização (-S9).

<i>Salmonella typhimurium</i> evertentes/placa $\pm$ DP (I)									
TA102 (-S9)									
$\mu\text{g/ placa}$									
MMC	2292 $\pm$ 82	MMC	2292 $\pm$ 82	MMC	2292 $\pm$ 82	MMC	2292 $\pm$ 82	MMC	2292 $\pm$ 82
Quercetina + MMC		Kaempferol + MMC		Fisetina + MMC		Luteolina + MMC		Crisina + MMC	
12,1	2365 $\pm$ 44	14,3	2283 $\pm$ 31 (0.4 ^a)	14,3	1971 $\pm$ 57 (14 ^a)	14,3	2035 $\pm$ 66 (11 ^a)	16,1	2144 $\pm$ 39 (6 ^a)
24,5	2304 $\pm$ 70	29,0	2171 $\pm$ 45 (5 ^a)	29,0	1947 $\pm$ 45 (15 ^a)	29,0	1877 $\pm$ 60 (18 ^a)	32,6	1987 $\pm$ 65 (13 ^a)
49,1	1973 $\pm$ 32 (14 ^a)	58,0	1579 $\pm$ 68 (31 ^b)	58,0	1800 $\pm$ 38 (21 ^a)	58,0	1688 $\pm$ 55 (26 ^b)	65,3	1957 $\pm$ 61 (15 ^a)
98,4	1923 $\pm$ 79 (16 ^a)	116,4	1496 $\pm$ 32 (35 ^b)	116,4	1864 $\pm$ 48 (19 ^a)	116,4	1565 $\pm$ 53 (32 ^b)	131,0	2016 $\pm$ 51 (12 ^a)
147,8	1971 $\pm$ 65 (14 ^a)	174,7	1269 $\pm$ 72 (45 ^c)	174,7	1787 $\pm$ 64 (22 ^a)	174,7	1515 $\pm$ 60 (34 ^b)	196,7	1964 $\pm$ 69 (14 ^a)
DMSO	253 $\pm$ 36	DMSO	253 $\pm$ 36	DMSO	253 $\pm$ 36	DMSO	253 $\pm$ 36	DMSO	253 $\pm$ 36
MMC	2292 $\pm$ 82	MMC	2292 $\pm$ 82	MMC	2292 $\pm$ 82	MMC	2292 $\pm$ 82	MMC	2292 $\pm$ 82
Galangina + MMC		Flavona + MMC		3-hidroxiflavona + MMC		5-hidroxiflavona + MMC		7-hidroxiflavona + MMC	
2,6	2216 $\pm$ 32 (3 ^a)	18,4	2256 $\pm$ 31 (2 ^a)	17,2	1909 $\pm$ 72 (17 ^a)	17,2	1984 $\pm$ 69 (13 ^a)	17,2	2040 $\pm$ 48 (11 ^a)
5,1	1893 $\pm$ 38 (17 ^a)	37,3	1968 $\pm$ 42 (14 ^a)	34,8	1624 $\pm$ 60 (29 ^b)	34,8	1848 $\pm$ 52 (19 ^a)	34,8	2051 $\pm$ 41 (10 ^a)
10,2	1877 $\pm$ 42 (18 ^a)	74,7	1971 $\pm$ 49 (16 ^a)	69,7	1557 $\pm$ 45 (32 ^b)	69,7	1976 $\pm$ 60 (14 ^a)	69,7	1917 $\pm$ 47 (16 ^a)
20,5	1869 $\pm$ 53 (18 ^a)	149,8	2048 $\pm$ 63 (11 ^a)	139,8	1427 $\pm$ 55 (38 ^b)	139,8	1984 $\pm$ 63 (13 ^a)	139,8	1859 $\pm$ 75 (19 ^a)
30,7	2011 $\pm$ 68 (12 ^a)	225,0	1907 $\pm$ 56 (17 ^a)	209,9	1360 $\pm$ 54 (41 ^c)	209,9	1960 $\pm$ 61 (14 ^a)	209,9	1707 $\pm$ 62 (25 ^b)
DMSO	253 $\pm$ 36	DMSO	253 $\pm$ 36	DMSO	253 $\pm$ 36	DMSO	253 $\pm$ 36	DMSO	253 $\pm$ 36

I = porcentagem de inibição; DP = desvio padrão; ^a sem efeito antimutagênico (< 25% inibição); ^b efeito moderado (25% - 40% inibição); ^c forte efeito antimutagênico (> 40% inibição). DMSO: 100 $\mu\text{L/placa}$. Indutor de danos: mitomicina (MMC – 0,5 $\mu\text{g/ placa}$)

Tabela 8 - Atividade antimutagênica dos flavonoides contra o mutágeno 2-aminoantraceno (2-AA) na cepa TA 102 com metabolização (+S9).

<i>Salmonella typhimurium</i> revertentes/placa $\pm$ DP (I)									
TA102 (+S9)									
$\mu\text{g/ placa}$									
2-AA	1292 $\pm$ 50	2-AA	1292 $\pm$ 50	2-AA	1083 $\pm$ 57	2-AA	1292 $\pm$ 50	2-AA	1292 $\pm$ 50
Quercetina + 2-AA		Kaempferol + 2-AA		Fisetina + 2-AA		Luteolina + 2-AA		Crisina + 2-AA	
12,1	1149 $\pm$ 30 (11 ^a)	14,3	1131 $\pm$ 89 (12 ^a)	14,3	445 $\pm$ 70 (59 ^c)	14,3	549 $\pm$ 54 (57 ^c)	16,1	349 $\pm$ 30 (73 ^c)
24,5	1112 $\pm$ 46 (14 ^a)	29,0	1069 $\pm$ 44 (17 ^a)	29,0	351 $\pm$ 70 (68 ^c)	29,0	447 $\pm$ 61 (65 ^c)	32,6	331 $\pm$ 23 (74 ^c)
49,1	933 $\pm$ 32 (28 ^b)	58,0	1128 $\pm$ 37 (13 ^a)	58,0	365 $\pm$ 54 (66 ^c)	58,0	308 $\pm$ 49 (76 ^c)	65,3	228 $\pm$ 28 (82 ^c)
98,4	893 $\pm$ 44 (31 ^b)	116,4	1059 $\pm$ 60 (18 ^a)	116,4	323 $\pm$ 48 (70 ^c)	116,4	263 $\pm$ 48 (80 ^c)	131,0	220 $\pm$ 27 (83 ^c)
147,8	763 $\pm$ 41 (41 ^c)	174,7	1003 $\pm$ 72 (22 ^a)	174,7	368 $\pm$ 55 (66 ^c)	174,7	303 $\pm$ 31 (77 ^c)	196,7	149 $\pm$ 26 (88 ^c)
DMSO	236 $\pm$ 28	DMSO	236 $\pm$ 28	DMSO	288 $\pm$ 19	DMSO	236 $\pm$ 28	DMSO	236 $\pm$ 28
2-AA	1292 $\pm$ 50	2-AA	1083 $\pm$ 57	2-AA	1083 $\pm$ 57	2-AA	1083 $\pm$ 57	2-AA	1083 $\pm$ 57
Galangina + 2-AA		Flavona + 2-AA		3-hidroxiflavona + 2-AA		5-hidroxiflavona + 2-AA		7-hidroxiflavona + 2-AA	
2,6	404 $\pm$ 30 (69 ^c)	18,4	864 $\pm$ 37 (20 ^a)	17,2	528 $\pm$ 42 (51 ^c)	17,2	819 $\pm$ 25 (24 ^a)	17,2	464 $\pm$ 73 (57 ^c)
5,1	408 $\pm$ 23 (68 ^c)	37,3	837 $\pm$ 68 (23 ^a)	34,8	499 $\pm$ 81 (54 ^c)	34,8	739 $\pm$ 70 (32 ^b)	34,8	424 $\pm$ 14 (61 ^c)
10,2	353 $\pm$ 37 (73 ^c)	74,7	827 $\pm$ 20 (24 ^a)	69,7	381 $\pm$ 74 (65 ^c)	69,7	784 $\pm$ 73 (28 ^b)	69,7	504 $\pm$ 21 (53 ^c)
20,5	287 $\pm$ 21 (78 ^c)	149,8	856 $\pm$ 24 (21 ^a)	139,8	408 $\pm$ 21 (62 ^c)	139,8	691 $\pm$ 32 (36 ^b)	139,8	376 $\pm$ 21 (65 ^c)
30,7	227 $\pm$ 36 (82 ^c)	225,0	832 $\pm$ 40 (23 ^a)	209,9	328 $\pm$ 35 (70 ^c)	209,9	661 $\pm$ 41 (39 ^b)	209,9	480 $\pm$ 29 (56 ^c)
DMSO	236 $\pm$ 28	DMSO	288 $\pm$ 19	DMSO	288 $\pm$ 19	DMSO	288 $\pm$ 19	DMSO	288 $\pm$ 19

I = porcentagem de inibição; DP = desvio padrão; ^a sem efeito antimutagênico (< 25% inibição); ^b efeito moderado (25% - 40% inibição); ^c forte efeito antimutagênico (> 40% inibição). DMSO: 100 $\mu\text{L/placa}$. Indutor de danos: 2-aminoantraceno (2-AA – 1,25 $\mu\text{g/ placa}$)

5 Discussão

A diversidade do padrão estrutural tornou os flavonoides uma rica fonte de compostos com propriedades quimiopreventivas (Moghaddam *et al*, 2012). Segundo Buer *et al*. (2010), são conhecidas mais de 9000 variantes estruturais de flavonoides. Do ponto de vista do potencial terapêutico, muitas pesquisas têm tentado elucidar a possível relação estrutura atividade que pode levar a descoberta de novas drogas (Lazaro, 2002).

Algumas estruturas já foram descritas como sendo essenciais para a atividade antimutagênica de flavonoides. Segundo Edenharder e Grunhage (2003), a presença de uma carbonila no carbono 4 dos flavonoides e a existência de uma estrutura planar ao lado da função ceto são essenciais para atividade antimutagênica. Além disso, segundo Lazaro (2002), a existência de uma dupla ligação entre os carbonos C2-C3, um anel aberto C e a posição do anel B (em C2 ou C3) são as principais estruturas que podem produzir variações na atividade anticâncer. Lazaro (2002) ainda afirma que a presença de hidroxilas em C3' e C4' no anel B ou hidroxilas em C5 e C7 no anel A são os padrões de substituições presentes nos flavonoides mais ativos. Variações nos substituintes em diferentes posições, como 3 e 4' na estrutura flavona, tem mostrado alterar a eficácia dos flavonoides.

Outro parâmetro que deve ser considerado é o ângulo de torção do anel B com o restante da molécula o que influencia fortemente a capacidade de eliminação de radicais livres. A planaridade permite conjugação, deslocamento eletrônico, e um correspondente aumento na estabilidade do radical fenoxil do flavonoide. É postulado que grupos hidroxilas do anel B formam ligações de

hidrogênio com o 3-OH, alinhando o anel B com o heterocíclico e com o anel A (Heim *et al.*, 2002)

As principais características para captura de radicais livres são a presença de um grupo catecol no anel B que tem melhor propriedade de doar elétrons para estabilizar espécies radicais, uma dupla ligação entre as posições 2 e 3 conjugada com o grupo 4-oxo, que é responsável pela deslocalização de elétrons, e a presença de hidroxilas nos carbonos 3 e 5 juntamente com o grupo 4-oxo que confere potencial máximo na captura de radicais livres (Figura 4) (Edenharder e Grunhage, 2003).



Figura 4- Características estruturais responsáveis pela atividade antioxidante dos flavonoides

Todos os flavonoides estudados neste trabalho foram anteriormente avaliados pelo nosso grupo (Laboratório de Mutagênese da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara) quanto ao seu potencial mutagênico. Os resultados de mutagenicidade foram publicados por Resende *et al.* (2012).

Com relação aos resultados obtidos neste estudo, no ensaio realizado utilizando o mutágeno NPD, a fisetina foi o único flavonoide que não mostrou atividade antimutagênica. Este resultado talvez possa ser explicado devido à ausência de hidroxila na posição C5, como pode ser visto na Figura 3. Segundo

Edenharder e Grunhage (2003), uma hidroxila no C5 é importante para captura de elétrons, juntamente com a ressonância com o grupo oxo em C4 e uma hidroxila em C3.

A quercetina foi o flavonoide que exibiu a maior atividade antimutagênica no ensaio com o mutágeno NPD. Isso pode ser explicado devido a sua molécula possuir todas as estruturas que conferem um potencial máximo na captura de elétrons como pode ser visto na Figura 3 e 4.

No ensaio realizado contra o mutágeno B[a]P o flavonoide quercetina não exibiu um efeito antimutagênico, pelo contrário, este flavonoide estimulou a mutagenicidade induzida pelo B[a]P. De acordo com Melo *et al.* (1984), uma das características do sistema enzimático da B[a]P hidrolase é o aumento de sua atividade induzida pela administração de compostos orgânicos apropriados, inclusive flavonoides (Figura 5). Portanto uma das possíveis explicações para esse resultado pode ser a ocorrência de uma indução enzimática causada pela quercetina. Além disso, segundo Harwood *et al.* (2007), a molécula da quercetina se oxida enquanto exerce sua capacidade antioxidante formando produtos de oxidação potencialmente tóxicos responsáveis pela sua mutagenicidade.

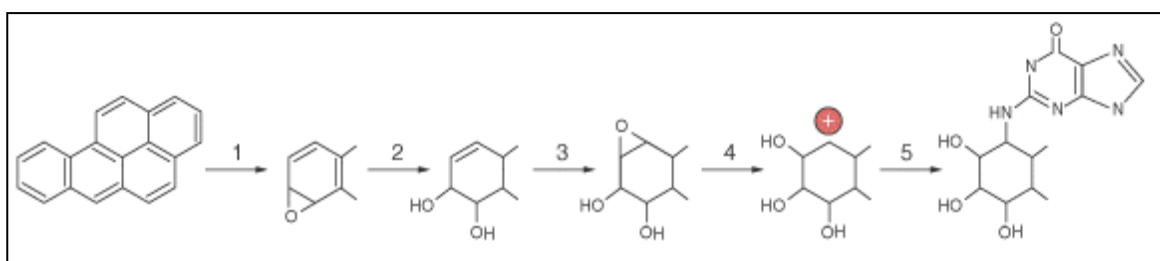


Figura 5 - Metabolização do B[a]P e ataque do intermediário ao DNA

No ensaio realizado com o mutágeno AZS, apenas os flavonoides luteolina, crisina, 3-hidroxiflavona e 7-hidroxiflavona apresentaram moderado efeito protetor, quando em concentrações mais elevadas. O flavonoide luteolina foi o que apresentou uma melhor atividade, pois obteve efeito protetor em três distintas concentrações. Isso talvez possa ser explicado devido à presença do grupo catecol no anel B, como pode ser visto na Figura 3, pois foi o único flavonoide dentre os que exibiram efeito protetor a possuir essa estrutura.

No ensaio realizado contra o mutágeno AFB₁, o flavonoide kaempferol apresentou o melhor efeito protetor, seguido da luteolina e crisina enquanto o flavonoide galangina potencializou o efeito mutagênico. O kaempferol possui, dentre os flavonoides com atividade protetora, mais estruturas ditas como essenciais para a atividade antimutagênica, como por exemplo, grupo OH em C3, grupo ceto em C4, grupo OH em C5 e em C7 (Figura 3). O flavonoide galangina (Figura 3), diferente de todos os flavonoides estudados, é o único a apresentar um grupo OH em C3, C5 e C7 e nenhum grupo OH no anel B. Também pôde ser verificado nesse ensaio, que os flavonoides monohidroxilados (3-hidroxiflavona, 5-hidroxiflavona, 7-hidroxiflavona) e o flavonoide flavona (Figura 3) não exibiram efeito protetor, podendo, portanto, ser indicativo de que nesse caso a presença e o número de grupos OH é importante para a atividade antimutagênica.

No ensaio que utilizou o mutágeno MMC, a quercetina também potencializou sua atividade mutagênica. Esse mutágeno possui anéis insaturados que permitem a incorporação de excesso de elétrons e a consequente produção de radicais livres reativos (Pritsos e Sartorelli, 1986), portanto nesse caso, o flavonoide quercetina pode ter se oxidado demasiadamente devido ao excesso de radicais livres e ter gerado produtos tóxicos, como já foi explicado. Os

flavonoides 3-hidroxiavona e kaempferol foram os que apresentaram melhor atividade protetora.

Quando os flavonoides foram associados ao mutágeno 2-AA, o kaempferol e avona foram os únicos a não apresentarem efeito protetor. O flavonoide avona não possui nenhum grupo OH em sua molécula, e isso pode ter ocasionado a ausência de atividade antimutagênica. Já o flavonoide kaempferol possui grupos OH em C3', C3, C5 e C7, porém também não apresentou atividade antimutagênica. Provavelmente, nesse caso, haja uma ação específica sobre a molécula de kaempferol, que acaba por inativ -la.

Frente aos resultados disponíveis na literatura, podemos concluir que as propriedades antimutag nicas dos flavonoides envolvem vários mecanismos, seja pela proteção direta ao DNA ou pela inibição da ativação metabólica de mutágenos indiretos devido a inativação de enzimas de metabolização ou interação com o pro-mutágenos tornando-os indisponíveis ao processo enzimático (Zahin *et al.*, 2010).

6 Conclusões

Os resultados obtidos no ensaio realizado contra o mutágeno NPD e utilizando a cepa TA98 permitem concluir que a fisetina foi o único composto que não exibiu qualquer efeito protetor. Já nos experimentos com ativação metabólica utilizando a cepa TA98 contra o mutágeno B[a]P, os resultados demonstraram que todos os flavonoides reduziram a ocorrência de mutações, exceto a quercetina, que potencializou o efeito mutagênico do B[a]P.

Nos experimentos utilizando a cepa TA100, os flavonoides luteolina e a crisina reduziram a resposta mutagênica da AZSe da AFB₁ em ensaios sem e com ativação metabólica, respectivamente. Os flavonoides 3-hidroxiflavona e 7-hidroxiflavona apresentaram um efeito protetor moderado contra AZS. O flavonoide kaempferol exibiu efeito antimutagênico nos experimentos realizados contra o mutágeno AFB₁, já a galangina potencializou a sua mutagenicidade. No experimento realizado nas cepas TA102 contra o mutágeno 2-AA mostrou que todos compostos reduziram a mutagenicidade, exceto o kaempferol e a flavona. No experimento realizado na cepa TA102 contra o mutágeno MMC os flavonoides kaempferol, luteolina, 3-hidroxiflavona e 7-hidroxiflavona inibiram as mutações.

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

7 Referências bibliográficas

AIUB, C. A. F; FELZENSZWALB, I. Os Princípios do Teste de Ames (*Salmonella*/ Microsomo) e sua aplicabilidade. *Genética na Escola*, v.6, n. 2, p. 11-16, 2011.

BISHOP, J. A. R.; SCHIESTL R. H. Homologous recombination as a mechanism of carcinogenesis. *Biochem. Biophysica Acta – Rev. Cancer*, n. 1471, p.109-121, 2001.

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

BUTTERWORTH B. E; POPP J. A; CONOLLY R. B; GOLDSWORTHY T. L. Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis. *International Agency for Research on Cancer*, v.116, p. 279-305, 1992.

CHANG, C; ASHENDEL, C; CHAN, T. C. K; GEAHLEN, R.L; McLAUGHLIN, J; WATERS, D. J. Oncogene signal transduction inhibitors from Chinese medicinal plants. *Pure Applied Chemistry*, v. 71, p. 1101-1104, 1999.

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

COUTINHO M., MUZITANO M. F.; COSTA S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CZECZOT H.; KUSZTELAK J. A study of the genotoxic potential of flavonoids using short-term bacterial assays. *Acta Biochimica Polonica*, v.40, n. 4, p.549-554, 1993.

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

DEHGHAN-NOODEH, G; SHARIFIFAR, F; MOSHAFFI, M. H; DEHGHAN-NOODEH A; GHARAEI R. R. Antimutagenicity activity of different fractions of *Zataria multiflora*, *Achillea wilhelmsii* and *Camellia sinensis* using Ames test. *J. Med. Sci.*, v. 13, n. 6, p. 459-464, 2013.

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

EL-SAYED, W. M; HUSSIN, W. A. Antimutagenic and antioxidant activity of novel 4-substituted phenyl-2,2'-bichalcophenes and aza-analogs. *Drug Design, Development and Therapy*, v.7, p. 73-81, 2013.

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

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

HOWELLS L. M.; BRITTON R. G.; MAZZOLETTI M.; GREAVES P.; BROGGINI M.; BROWN K.; STEWARD W. P.; GESCHER A. J.; SALE S. Preclinical Colorectal Cancer Chemopreventive Efficacy and p53-Modulating Activity of 3' ,4' ,5' -Trimethoxyflavonol, a Quercetin Analog. *Cancer Prev Res (Phila)*, v.3, n.8, p. 929-939, 2011.

KHAN, M., PELENGARIS, S. *The Molecular Biology of Cancer*, ed.1, 2006.

KINGHORN, A.D; FARNSWORTH N. R; SOEJARTO, D. D; CODELL, G. A. Novel strategies for the discovery of plant-derived anti-cancer agents. *Pharmaceutical Biology*, v. 41, p. 53-67, 2003.

LAZARO M. L.; Flavonoids as Anticancer Agents: Structure-Activity Relationship Study. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, v.2, p. 691-714, 2002.

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

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

MACREADY A. L.; KENNEDY O. B.; ELLIS J. A.; WILLIAMS C. M.; SPENCER J. P. E.; BUTLER L. T. Flavonoids and cognitive function: a review of human randomized controlled trial studies and recommendations for future studies. *Genes Nutr*, v.4, p. 227-242, 2009.

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

MASHELE S; FUKU S. L; Evaluation of the antimutagenic and mutagenic properties of *Asparagus larycinus*. *Medical Technology SA*, v.25, n.2, 2011.

MELO S. J; GALDINO S. L; PITTA I. R.; CAMPOS M. A.; KOROLKOVAS A. Derivados flavonoides indutores da benzo(a)pireno hidroxilase. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, v.20, n.1, p. 94-100, 1984.

MOGHADDAM G, EBRAHIMI S. A.; RAHBAR-ROSHANDEL; FOROUMADI A. Antiproliferative Activity of Flavonoids: Influence of the Sequential Methoxylation State of the Flavonoid Structure. *Phytotherapy Research*, v.26, p. 1023-1028, 2012.

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

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

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

OECD – Guideline for testing of Chemicals - The Organization for Economic Co-operation and Development Report on Regulatory Reform Synthesis, 1997.

PRESTON R. J. Bystander effects, genomic instability, adaptive response, and cancer risk assessment for radiation and chemical exposures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 207, p. 550–556, 2005.

PRITSOS C. A.; SARTORELLI A. C. Generation of Reactive Oxygen Radicals through Bioactivation of Mitomycin Antibiotics. *Cancer Res*, v. 46, p. 3528-3532, 1986.

RESENDE, F. A., VILELAS, W., DOS SANTOS, L. C., & VARANDA, E. A. Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (Ames) test. *Molecules*, v. 17, p. 5255-5268, 2012.

SANJORJO R. A. S. Clastogenicity and antimutagenicity potential of the philippine marine sponge *Haliclona koremella*. 2012. 49f. Tese – Department of Chemistry of the University of San Carlos. March 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; *Farmacognosia - da Planta ao Medicamento*, 6^a ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2007

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

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

YOSHIKAWA, K; INAGAKI, K; TERASHITA, T; SHISHIYAMA, J; Kuo, S; SHANKEL, D. M. Antimutagenic activity of extracts from Japanese eggplant. *Mutation Research - Genetic Toxicology*, v. 371, n. 1-2, p. 65-71, 1996.

YU, Z. Antimutagenic Potency of Wheat Grain and Berry Extracts *in vitro* and Anticarcinogenicity of Wheat Grain *in vivo*. 2003. 77 f. Tese - Oregon State University. October 15, 2002.

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

ZAHIN, M; AQIL, F; HUSAIN, F. M; AHMAD, I. Antioxidant Capacity and Antimutagenic Potential of *Murraya koenigii*. *BioMed Research International*, v.2013, p. 1-10, 2013.

8 Dados Finais

De acordo,

Orientador

Aluno

Araraquara, __ de _____ de 20__