

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

LETICIA MIN WEN TIRTAPRAWITA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUIMIOPREVENTIVA DA SUBSTÂNCIA
Morelloflavona ISOLADA DE *Garcinia xanthochymus*

ARARAQUARA – SP

2012

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

LETICIA MIN WEN TIRTAPRAWITA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE QUIMIOPREVENTIVA DA SUBSTÂNCIA
Morelloflavona ISOLADA DE *Garcinia xanthochymus*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista para
obtenção do grau de Farmacêutico-
Bioquímico.

Orientadora: Profa. Dra. Christiane
Pienna Soares

ARARAQUARA – SP

2012

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Sue e Yang, aos meus irmãos, Nicky e Anderson e à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof. Dra Christiane Pienna Soares, minha orientadora, pela oportunidade, pela orientação, dedicação, confiança, apoio e colaboração ao meu crescimento e desenvolvimento deste projeto.

À Mestranda Daniele Agustoni pelo acompanhamento e auxílio no projeto, por tudo que me ensinou e colaborou para meu crescimento e realização do projeto.

À Tarsia, Juliana, Aline, Elaine, Thais, Felipe, Bel, e colegas de laboratório por todo apoio e por tudo que me ensinaram e colaboraram. Obrigada pela amizade e auxílio.

À todos os colegas de laboratório que contribuíram no desenvolvimento do projeto.

Aos meus pais por sempre me apoiarem, me incentivarem, pela força, motivação e pela contribuição no alcance dos meus objetivos, pelo amor e carinho. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos que estão sempre ao meu lado, pelo apoio e motivação, pelo amor e convívio com muito carinho. Meus amores.

À minhas amigas e amigos de faculdade, pelo companheirismo e amizade durante todo trajeto de graduação, que proporcionaram momentos inesquecíveis. Obrigada Aninha, Carol, Ju, Katia, Livia, Lu, Pri, Rochanne e Rodrigo.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. <i>Garcinia xanthochymus</i> e morelloflavona.....	11
1.2. Câncer	14
1.3. Quimioprevenção e Atividade da Quinona Redutase	15
1.4. Ensaio de Quinona Redutase.....	16
1.5. Ensaio de Sulforrodamina B	17
1.6. Ensaio do Cometa.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo Geral	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Estudo Químico <i>Garcinia xanthochymus</i>	20
4.2. Cultivo de células.....	21
4.3. Manutenção da linhagem celular.....	22
4.4. Ensaio de Quinona Redutase e Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do Violeta Cristal.....	22
4.5. Ensaio de Sulforrodamina B	24
4.6. Ensaio do Cometa.....	24
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
6. RESULTADOS.....	27
6.1. Ensaio de Quinona Redutase.....	27
6.2. Ensaio de Sulforrodamina B	28
6.3. Ensaio do Cometa.....	29
7. DISCUSSÃO	32
8. CONCLUSÕES	35
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

RESUMO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando inter-relacionadas. As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (Sistema Imunológico ou acúmulo de mutações no DNA). A compreensão dos exatos mecanismos e a tentativa de inativar genes ou impedir as ações tóxicas de substâncias contribuirá para a elucidação de diversos pontos importantes para o entendimento da carcinogênese e, portanto, para novas estratégias de tratamento e de prevenção do câncer. O presente estudo tem como objetivo, avaliar o efeito da substância pura, morelloflavona, isolada da folha de *Garcinia xanthochymus*, planta típica do Cerrado no Estado de São Paulo, conhecida por sua variada atividade biológica (analgésica, antibacteriana, antioxidante, antiviral e antitumoral) devido aos seus grupos de metabólitos: xantonas, flavonóides, fenóis e acridonas. Assim, foram realizados: o ensaio da Quinona Redutase em paralelo com o ensaio do Violeta Cristal para análise da viabilidade celular em células de hepatocarcinoma murino (Hepa 1c1c7); o ensaio de Sulforrodamina B para análise da viabilidade celular em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) e o ensaio do Cometa nos protocolos de genotoxicidade e antigenotoxicidade em células de HepG2. Esses ensaios permitiram a identificação de concentrações possivelmente quimiopreventivas e a citotoxicidade do produto natural em questão. Além disso, permitiu verificar a capacidade genotóxica e antigenotóxica da substância testada. Concluiu-se então que a classe dos biflavonóides, a qual pertence a morelloflavona, apresenta características genotóxicas em determinadas concentrações e capacidade protetora de dano de DNA (característica antigenotóxica) em diferentes concentrações, além de possuir atividade indutora da enzima quinona redutase e não ser citotóxica pelo ensaio de Violeta Cristal, porém citotóxica pelo ensaio de Sulforrodamina B.

PALAVRAS CHAVE: *Garcinia xanthochymus*; Quinona Redutase; Ensaio do Cometa; quimioprevenção; genotoxicidade; antigenotoxicidade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem das folhas, frutos e polpa de <i>Garcinia xanthochymus</i>	12
Figura 2. Algumas classes da substância isolada da espécie de <i>Garcinia xanthochymus</i>	12
Figura 3. Obtenção da morelloflavona, através do fracionamento cromatográfico da substância que contém AcOEt extraída das folhas de <i>Garcinia xanthochymus</i>	21
Figura 4 Indução da enzima quinona-redutase (QR) (média $\pm$ erro padrão) em células de hepatocarcinoma murino Hepa 1c1c7 através da morelloflavona.....	28
Figura 5. Avaliação da citotoxicidade de morelloflavona pelo método de sulforradamina B.....	29
Figura 6. Análise do ensaio do Cometa. Imagens ilustrativas das células de linhagem HepG2 posteriormente a eletroforese.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela	1.	Análise estatística do ensaio de genotoxicidade.....	31
Tabela	2.	Análise estatística do ensaio de antigenotoxicidade.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt-FOL	acetato de etila da folha
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CD	capacidade de duplicação
CI	índice de quimioprevenção
CLAE-DAD	cromatografia líquida de alta eficiência – detector com arranjo de diodos
CLAE-UV	cromatografia líquida de alta eficiência – ultravioleta
CLAE-UV-prep	cromatografia líquida de alta eficiência preparativa
CN	controle negativo
CP	controle positivo
CPG	cromatografia de permeação em gel
CV	controle de veículo
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FAD	flavina-adenina-dinucleotídeo
FBS	fetal bovine serum
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HCl	ácido clorídrico
Hepa 1c1c7	hepatocarcinoma murino
HepG2	hepatocarcinoma humano
IC50	concentração inibitória de 50% do crescimento celular
LH-20	coluna de permeação em gel
LMP	low melting point
MeOH	metanol
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótideo fosfato oxidase
pH	potencial hidrogeniônico
QR	quinona redutase
RPM	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
TCA	ácido tri-cloroacético
UDP	difosfato de uridina
VC	violeta cristal
βNF	betanaftoflavona

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
µg	micrograma
µL	microlitro
cm	centímetro
cm ²	centímetro quadrado
g	grama
h	hora
m/v	massa por volume
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
nm	nanometro
°C	graus Celsius
U	unidade
U/g	unidade por grama
v/v	volume por volume

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Garcinia xanthochymus* e morelloflavona

As espécies de *Garcinia*, família Clusiaceae (Figura 1), são fontes ricas de metabólitos secundários fenólicos, especialmente xantonas (PERES *et al.*, 2000; HAY *et al.*, 2004), além de benzofenonas, biflavonóides e depsidonas, possuindo ampla distribuição nas regiões tropicais. A maioria dos representantes desta família são árvores, arbustos ou ervas, sendo raramente epífitas, mas podem chegar a 20 metros de altura (MABBERLEY, 1997; ITO *et al.*, 2003), além de serem amplamente utilizadas na medicina tradicional como vermífugo e neutralizador de toxinas de alimentos. (ZHONG *et al.*, 2007) *G. xanthochymus* é uma planta típica do Cerrado no Estado de São Paulo, que possui em seu perfil químico flavonóides, fenóis e acridonas como principais grupos de metabólitos especiais, apresentando uma variedade de atividades biológicas, como: atividade analgésica, antibacteriana, antioxidante, antiviral e antitumoral. (FOTIE *et al.*, 2003; BAGGETT *et al.*, 2005) Neste gênero, também ocorrem, substâncias da classe das xantonas, conhecidas por sua atividade antimalárica. (CHANMAHASATHIEN *et al.*, 2003)

A família Clusiaceae compreende cerca de 50 gêneros e 1.200 espécies de ocorrência preferencial nas regiões tropicais do mundo. Todavia parte dessa família se desenvolve com facilidade em regiões norte de zonas temperadas. (JUNIOR *et al.*, 2005) No Brasil existe cerca de 20 gêneros e 150 espécies distribuídas na Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica. (CRUZ *et al.*, 1998; SOUZA & LORENZI 2005) Os gêneros são divididos em três subfamílias, destacando-se inúmeros com importância medicinal, como *Hypericum* e *Vismia* (Hypericoideae), *Clusia*, *Calophyllum* e *Garcinia* (Calophylloideae) e *Kielmeyera* (Bonnetioideae). (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002) Alguns trabalhos prévios com algumas espécies deste gênero, presentes no Cerrado e no Planalto Central Brasileiro, descrevem as xantonas como seus constituintes predominantes. (NAGEM & SILVA, 1988)

Gamboja é o nome popular dado à espécie de *G. xanthochymus*, árvore nativa da Índia com aproximadamente 8-10 metros. As árvores possuem folhas verdes escuras e a fruta tem coloração amarela com polpa ácida, possui de 6-7 cm de diâmetro, poucas sementes e é utilizada extensamente na medicina popular como antidiarreica (Figura 1), além de ser usada como pigmento para aquarela, como corante amarelo de tecidos e o fruto acidificado é utilizado em geléias, conservas e vinagres. (BAGGETT *et al.*, 2005)



Figura 1. Imagem das folhas, frutos e polpa de *Garcinia xanthochymus*. Retirado de: MCCORMACK, 2007.

Um estudo fitoquímico das folhas de *G. xanthochymus* revelou a presença predominante de biflavonóides, flavonóides e terpenos (Figura 2). (BAGGETT *et al.*, 2005)

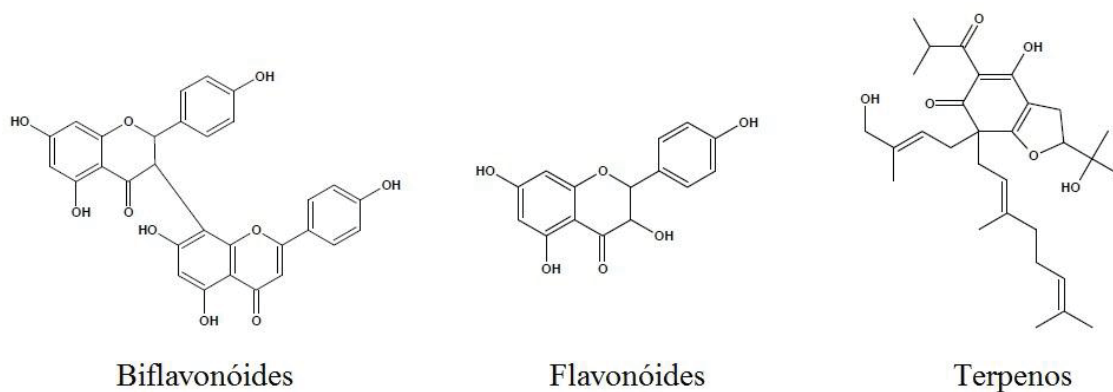


Figura 2. Algumas classes da substância isolada da espécie de *Garcinia xanthochymus*. Retirado de: FERNANDES, 2010.

Os flavonóides, pigmentos naturais encontrados em vegetais, são substâncias que protegem o organismo do dano produzido por agentes oxidantes, assim como os

raios ultravioletas, poluição ambiental e substâncias químicas presentes nos alimentos. O organismo humano não é capaz de produzir esses tipos de compostos protetores, por isso há necessidade de obter tais substâncias por meio de dietas balanceadas com frutas, verduras e bebidas, nos quais, compostos como flavonóides estão presentes. (MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002)

Esses compostos contém em sua estrutura química um número variável de grupos hidroxifenólicos, no qual, confere a eles uma grande capacidade antioxidante. São conhecidos por volta de 6.500 flavonóides, nas plantas, estes apresentam uma grande variedade estrutural, por isso o número de flavonóides encontrados na natureza é elevado. (RIJKE *et al.*, 2006)

A notável diversidade estrutural e funcional dos flavonóides presentes nas plantas tem proporcionado base para pesquisas em áreas como: genética, bioquímica, ecologia e saúde. Além disso, desempenham um papel essencial na proteção contra os fenômenos danosos do processo oxidativo, e tem efeitos terapêuticos em um vasto número de patologias. Por serem conhecidas por suas atividades antialérgicas, anti-inflamatórias, antivirais, anticancerosas e antioxidantes, também estão relacionadas diretamente com uma grande quantidade de enzimas e proteínas associadas com a fosforilação. (WINKEL, 2006)

Os biflavonóides se apresentam de forma natural como dímeros de flavonóides, se caracterizam pela união covalente de duas unidades monoméricas de flavonóides. (YAMAGUCHI *et al.*, 2005) Essa classe é amplamente conhecida e está em destaque na literatura devido à frequência e abundância com que são encontradas. (SUZART *et al.*, 2007)

A morelloflavona possui diferentes atividades como: atividade analgésica, antioxidante, antiviral, tratamento de doenças hepáticas, tratamento da labirintite, entre outras, isso ocorre pelo fato de ser um biflavonóide, que dependendo da planta em que é extraída a substância possui conformação estrutural diferente, o que confere atividades distintas. (VERDI *et al.*, 2004)

A substância, morelloflavona, isolada de *G. xanthochymus*, pertencente a classe dos biflavonóides, são estudados devido a sua possível atividade antioxidante, por isso o presente trabalho tem como objetivo pesquisar sua atividade quimiopreventiva frente aos ensaios de quinona redutase em paralelo com a viabilidade celular, e a capacidade genotóxica e antigenotóxica.

1.2. Câncer

No Brasil, o câncer representa a segunda maior causa de morte nos adultos, na população brasileira os casos mais incidentes de câncer são o de pele do tipo não melanoma, seguido do câncer de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, além do câncer de cólon, reto e estômago. (INCA 2010)

O significado da palavra ‘câncer’ abrange mais de uma centena de enfermidades, uma vez que cada tecido do organismo humano pode desenvolver uma ou mais doenças malignas. A proliferação desordenada das células e a capacidade que algumas têm de se desprender da sua origem em direção a outros locais do organismo, gerando novos focos de crescimento descontrolado (metástase) são pontos comuns das doenças denominadas câncer. (RIBEIRO & MAIA, 2002)

As células cancerígenas possuem um sistema próprio e desordenado de reprodução. Inicialmente, uma célula portadora de alterações em seu material genético, herdadas ou não, sofre uma nova mutação, por acaso ou indução de um agente oncogênico (capaz de produzir uma proliferação desordenada nas células). Essa mutação complementar proporciona à célula cancerosa uma capacidade de reprodução superior à de suas irmãs do mesmo tecido, assim ela se divide incontrolavelmente, o que compromete o funcionamento normal do tecido. (RIBEIRO & MAIA, 2002)

O processo de carcinogênese (formação de câncer) geralmente ocorre lentamente, podendo levar vários anos até que uma célula cancerígena se prolifere resultando em aparecimento do tumor, onde se detecta o câncer. (INCA, 1996)

A carcinogênese é um processo de múltiplos estágios que podem ser causados pela substância cancerígena induzida por alterações genéticas e epigenéticas das células suscetíveis. A primeira etapa do processo cancerígeno, o início do tumor, envolve a exposição de células normais a metabólitos cancerígenos eletrofilicos ou espécies reativas de oxigênio. Estes múltiplos estágios da formação do câncer se baseiam em fase de iniciação, fase de promoção e fase de progressão. O primeiro estágio (iniciação) é a etapa no qual as células sofrem ação dos carcinógenos, que provocam alterações genéticas, ou seja, nesta fase as células se encontram geneticamente modificadas. Na fase de promoção, ocorre uma indução das células características da fase de iniciação, por agentes químicos, como oncopromotores, no qual se inicia o processo de transformação celular gradual a células malignas. As células no estágio de progressão

são quase sempre o resultado de uma série de processos ou etapas no qual a célula normal se desenvolve em uma célula maligna, caracterizada pela multiplicação descontrolada e irreversível, iniciando as primeiras manifestações clínicas. (PILOT, 1995; INCA, 1996)

A prevenção primária e secundária são estratégias promissoras que devem ser empregadas para reduzir a mortalidade pela doença. A prevenção primária consiste em evitar o contato com agentes carcinogênicos exógenos, tais como radiação e substâncias químicas carcinogênicas, entre outros. (WATTENBERG, 1985; MORSE & STONER, 1993; SPORN & SUH, 2000; PEZZUTO *et al.*, 2005) A prevenção secundária, denominada quimioprevenção do câncer, tem sido considerada o passo fundamental para diminuir a incidência de câncer e a mortalidade por esta doença. (WATTENBERG, 1985; MORSE & STONER, 1993; KELLOFF *et al.*, 1994; SPORN & SUH, 2000) Um dos principais mecanismos para se proteger contra os metabólitos tóxicos é a indução de enzimas da fase II de detoxificação, como a glutathione S-transferase, UDP-glucuronosiltransferase e NADPH quinona-redutase. Os agentes supressores são quimiopreventivos que inibem a progressão global do processo neoplásico e previne as células de se tornarem malignas; agentes bloqueadores podem prevenir a ativação de carcinógenos e aumentar a detoxificação antes do início de lesão em órgãos alvos.

Portanto, pode se prevenir a carcinogênese por uma série de compostos de diferentes classes como flavonóides, tiocarbamatos, antioxidantes fenólicos e isotiocianatos. Uma propriedade importante desses compostos é que eles são capazes de evitar o aparecimento do câncer por mecanismos enzimáticos. (PEZZUTO *et al.*, 2005)

1.3. Quimioprevenção e Atividade da Quinona Redutase

A quimioprevenção do câncer pode ser definida como a utilização de compostos químicos específicos, naturais ou sintéticos, com a finalidade de prevenir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese. (WATTENBERG, 1985) A carcinogênese, portanto, pode ser evitada por uma série de compostos naturais, que tem como propriedade comum elevar a atividade enzimática (quinona redutase) por um aumento na sua síntese e/ou diminuição da degradação da mesma. (SONG *et al.*, 1999)

Algumas das estratégias para a proteção de células dos eventos iniciais da formação de tumores incluem a inibição de enzimas metabólicas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio, ativação de carcinógenos (enzimas de fase I),

ao passo que enzimas da fase II são estimuladas, promovendo a desativação de radicais e eletrófilos envolvidos nos processos celulares normais. Os agentes responsáveis por estes acontecimentos são denominados “indutores bifuncionais”, onde os carcinógenos poderiam induzir a uma proteção contra seu próprio efeito tóxico. (PROCHASKA *et al.*, 1992) Além destes, existem os “indutores monofuncionais”, que somente induzem enzimas de fase II seletivamente e ativam elementos de resposta antioxidante, podendo servir como anticancerígenos, ou seja, pode proteger o organismo de espécies tóxicas e reativas. (KANG & PEZZUTO, 2004; CUENDET *et al.*, 2006)

Recentes estudos mostram que a elevação de enzimas de fase II (NADPH quinona redutase e glutathione S-transferase) está envolvida na proteção celular dos estágios iniciais contra a carcinogênese induzida por agentes químicos em modelos animais. (WATTENBERG, 1985; SONG *et al.*, 1999; CUENDET *et al.*, 2006) Além disso, dietas baseadas em alimentos que contém substâncias quimiopreventivas potenciais (isoflavonas, curcumina, sulforafano, licopeno e outras) podem estar aliadas ao sucesso do tratamento de neoplasias de células germinativas, tumores e linfomas. (KELLOFF *et al.*, 1994)

Os agentes quimiopreventivos podem ser separados em duas categorias baseados na etapa da carcinogênese em que atuam positivamente para prevenção ou reparo do câncer. A primeira categoria inclui os compostos que são completamente efetivos contra a carcinogênese, como agentes supressores que interferem na progressão da carcinogênese, prevenindo a evolução da malignização. A segunda categoria é composta por elementos que atuam efetivamente contra os agentes indutores de tumor, como agentes bloqueadores, capazes de modular processos bioquímicos de excreção renal, absorção intestinal e interação com o material genético de substâncias cancerígenas. (WATTENBERG, 1985)

1.4. Ensaio de Quinona Redutase

O ensaio da quinona redutase (QR) constitui um método simples, para detecção e avaliação da indução da enzima quinona redutase, que detoxifica carcinógenos (enzima de fase II) e pode ser induzida por produtos naturais, baseado na medida direta da atividade da QR em células de hepatocarcinoma murino. (PROCHASKA *et al.*, 1992) A quinona redutase catalisa a redução da menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona), a menadiol mediada por NADPH como doador de elétrons. O MTT (3-(4,5-dimethyl-2-

thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) é então reduzido não enzimaticamente pelo menadiol, resultando na formação do sal de formazana de coloração violácea. (PROCHASKA & SANTAMARIA 1988; FAHEY *et al*, 2004) A linhagem derivada de hepatocarcinoma celular murino (Hepa 1c1c7) contém quantidades de QR induzíveis facilmente mensuráveis e que fornece um confiável sistema de detecção de indutores de enzimas de fase II. (PROCHASKA & SANTAMARIA 1988; FAHEY *et al*, 2004; CUENDET *et al*., 2006) A indução de quinona redutase é diretamente proporcional a quantidade reduzida de MTT.

1.5. Ensaio de Sulforrodamina B

Considerando que os ensaios de citotoxicidade em células HepG2, utilizando MTT apresentaram interação com a substância, promovendo um falso positivo, foi utilizado o ensaio de citotoxicidade por sulforrodamina B.

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

1.6. Ensaio do Cometa

Vários métodos utilizados para avaliar os efeitos genotóxicos de substâncias químicas *in vitro*, estão disponíveis. Os ensaios diferem entre si em fatores relacionados à sensibilidade e praticidade. O ensaio do Cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula única, é bastante utilizado para identificação de genotoxicidade e antigenotoxicidade. (WOLFF & MÜLLER, 2006)

A versão alcalina do ensaio permite a identificação de danos na fita simples de DNA de maneira extremamente sensível, além de ser um método de custo-benefício vantajoso. (SINGH, 1988)

Além disso, o ensaio do cometa é capaz de detectar danos de DNA precoce passíveis de reparo, a grande sensibilidade em detectar pequenos níveis de danos

recentes no DNA, sua fácil execução, o curto tempo necessário para completar um experimento e obter resultados, torna o ensaio passível de escolha. (TICE *et al.*, 2000)

O ensaio do cometa basicamente acontece quando as células de HepG2 são embebidas em agarose, e a seguir sofrem lise por meio de sais e detergentes presentes na solução de eletroforese; o relaxamento do DNA é promovido pela eletroforese em tampão alcalino, nessas condições, os fragmentos de DNA podem migrar em direção ao pólo negativo da cuba de eletroforese, formando uma espécie de cauda, que em conjunto com a célula, é denominada cometa. Por fim, o DNA é observado por microscopia de epifluorescência após a coloração das células com Brometo de etídio. Resumidamente, o ensaio consiste na migração do DNA, pois este contém quebras que podem sofrer arraste, e esses danos aumentam frente à exposição a agentes genotóxicos. (WOLFF & MÜLLER, 2006) Assim, pode-se avaliar o potencial de genotoxicidade e antigenotoxicidade deste estudo, utilizando tal metodologia. Serão empregados protocolos de pré-tratamento e pós-tratamento, segundo proposto por Scolastici e colaboradores (2008).

Alguns tipos celulares são suscetíveis ao teste de genotoxicidade de substâncias isoladas ou de extratos complexos, o que proporciona a possível flexibilidade do ensaio cometa ser testado com outros tipos de linhagem de células eucarióticas *in vitro* (MÜLLER *et al.*, 2002; WOLFF & MÜLLER, 2006).

O ensaio de Cometa foi introduzido no laboratório desde 2005, através da colaboração da Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi, do laboratório de Genética da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP). Desde então, o ensaio do Cometa vem sendo amplamente utilizado em nosso laboratório para verificação de genotoxicidade e antigenotoxicidade de produtos naturais.

2. JUSTIFICATIVA

A quimioprevenção do câncer é definida como o uso de agentes sintéticos ou naturais capazes de inibir, retardar ou reverter o processo de carcinogênese (WATTENBERG, 1985; MORSE & STONER, 1993; KELLOFF *et al.*, 1994; SPORN & SUH, 2000; PEZZUTO *et al.*, 2005). Sendo assim o uso de produtos naturais podem induzir enzimas de fase II. Um método simples, para uma rápida detecção e avaliação de indução dessa enzima, que detoxifica carcinógenos (enzima de fase II), baseando-se na medida direta da atividade da QR em células de hepatocarcinoma murino

(Hepa1c1c7) é o ensaio de quinona redutase, que foi utilizado para o desenvolvimento do projeto em questão.

Com o intuito de ampliar estudos preliminares com plantas da diversidade vegetal brasileira, resolveu-se avaliar os efeitos da substância, morelloflavona, isolada da folha de *G. xanthochymus* na indução da atividade da enzima quinona redutase e verificar a genotoxicidade frente às concentrações quimiopreventivas, além de verificar atividade protetora de danos de DNA, pelo ensaio do cometa no protocolo de antigenotoxicidade. As linhagens celulares utilizadas foram: Hepatocarcinoma murino (Hepa1c1c7) e Hepatocarcinoma humano (HepG2), respectivamente.

É essencial pensar na utilização de morelloflavona isolada a partir da extração das folhas como fonte de possíveis tratamentos, pois desta forma é possível à exploração dos recursos naturais sem colocar em risco a preservação da espécie vegetal, ao contrário do que ocorre com a utilização dos frutos. (ALMEIDA *et al.*, 2008)

Avaliar o papel antigenotóxico de extratos de plantas, de infusões e dos principais componentes fitoquímicos é de suma importância, visto que substâncias antimutagênicas presentes em algumas plantas já mostraram ajudar na prevenção de câncer e outras doenças. (NISHINO, 1998; BERHOW *et al.*, 2000, SURH & FERGUSON, 2003, PATEL *et al.*, 2007) Assim, estudos de genotoxicidade e antigenotoxicidade podem ajudar a avaliar a segurança e a efetividade de muitas plantas utilizadas na medicina popular.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a possível indução da atividade da enzima quinona redutase a partir da substância pura, morelloflavona, isolada das folhas de *Garcinia xanthochymus* em diferentes concentrações através do ensaio da quinona redutase, bem como, avaliar o seu potencial genotóxico e antigenotóxico pelo ensaio do Cometa.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade da enzima quinona redutase em células de hepatocarcinoma murino (Hepa1c1c7) tratadas com a substância pura, morelloflavona, isolada de *Garcinia xanthochymus*;

- Avaliar a viabilidade celular, concomitantemente com o ensaio da quinona redutase em células Hepa1c1c7, utilizando o método do violeta cristal e de sulforrodamina B;
- Detectar danos de DNA precoce e passível de reparo em linhagem celular metabolizadora de hepatocarcinoma humano (HepG2), utilizando o ensaio do cometa para determinar a possível ação genotóxica desse composto em diferentes concentrações;
- Avaliar a atividade antigenotóxica da morelloflavona em linhagem celular metabolizadora de hepatocarcinoma humano, utilizando um delineamento experimental de pré e pós tratamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Estudo Químico *Garcinia xanthochymus*

As folhas de *G. xanthochymus* foram coletadas na região do Cerrado do Estado de São Paulo, mais precisamente no Campus da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP) - Jaboticabal em maio de 2008, sendo identificados pelo Prof^o Antonio Baldo G. Martins. Os processos de extração e purificação do material botânico foram realizados pelo NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese, e Ecofisiologia de Produtos Naturais) com a colaboração da Profa. Dra. Dulce Helena Siqueira da Silva do Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, UNESP- Araraquara.

Quando coletadas as folhas da *G. xanthochymus*, foram secas em estufa a 40°C e em seguida pulverizadas em moinho de facas. Os produtos obtidos desse procedimento foram submetidos ao processo de extração por maceração, com posterior remaceração. Em seguida realizou-se fracionamento cromatográfico da fração de acetato de etila da folha (AcOEt-FOL) da *G. xanthochymus* em coluna de permeação em gel (LH-20, Sephadex®) e eluição isocrática com metanol (MeOH), o que resultou na substância pura, morelloflavona (Figura 3).

Para a elucidação estrutural das substâncias isoladas foram empregadas técnicas espectrométricas como ressonância magnética nuclear uni e bidimensional, espectrometria de massa, infravermelho e ultravioleta, muito úteis no isolamento e na caracterização de metabólitos secundários. (FERNANDES, 2010)

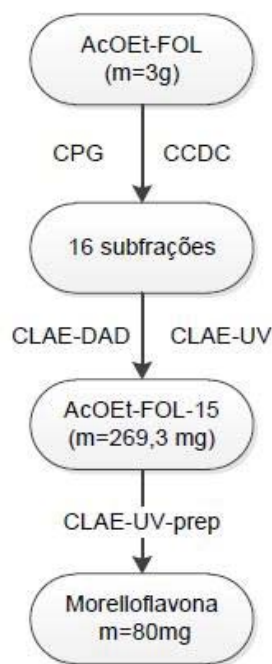


Figura 3. Obtenção da morelloflavona, através do fracionamento cromatográfico da substância que contém AcOEt extraída das folhas de *Garcinia xanthochymus*. CPG: Cromatografia de permeação em gel; CCDC: Cromatografia em camada delgada comparativa; CLAE-DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência – Detector com arranjo de diodos; CLAE-UV: Cromatografia líquida de alta eficiência – Ultravioleta; CLAE-UV-prep: Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa. Retirado de: FERNANDES, 2010.

4.2. Cultivo de células

Nos ensaios de QR e Violeta Cristal realizados, com a substância morelloflavona foi utilizada a linhagem celular de hepatocarcinoma murino (Hepa 1c1c7; “American Type Culture Collection” n. CRL-2026), fornecida pelo Prof. Dr. John M. Pezzuto do “College of Pharmacy, University of Hawaii at Hilo”.

Com a intenção de avaliar a genotoxicidade, antigenotoxicidade e citotoxicidade da morelloflavona foi utilizada a linhagem de células de hepatocarcinoma humano (HepG2; “American Type Culture Collection” n. HB-8065) que foi gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Dayse Maria Favero Salvadori do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina – UNESP, Campus Botucatu.

4.3. Manutenção da linhagem celular

A linhagem celular Hepa 1c1c7 foi cultivada em garrafas, contendo meio de cultura α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle – Sigma-Aldrich®) sem ribonucleosídeos ou desoxirribonucleosídeos, pH 7,2, suplementado com 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*, Cultilab, Brasil), bicarbonato de sódio, Hepes, kanamicina, estreptomicina 0,1mg/mL e penicilina 100U/mL.

Enquanto que a linhagem celular da HepG2 foi cultivada em meio de cultura DMEM (Sigma, EUA), pH 7,2, suplementado com FBS, penicilina 100U/mL e estreptomicina 0,1mg/mL.

As culturas celulares foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Quando as células atingiram confluência em frascos de 75 cm², essas foram tripsinizadas e seu volume aferido para 1 x 10⁴ células/mL (Hepa 1c1c7) para o ensaio de quinona redutase; 1,5 x 10⁴ células/mL para o ensaio de Sulforrodamina B, e 2,5 x 10⁵ células/mL (HepG2) para o ensaio do cometa.

4.4. Ensaio de Quinona Redutase e Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio do Violeta Cristal

Na realização do ensaio de QR, para a quantificação de indução enzimática foi necessário a preparação de reagentes específicos para o método. Preparou-se a solução de lise com 0,8% de digitonina e 2 mM de EDTA, pH 7,8, a solução de 25 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM de glicose-6-fosfato, 50 μ M de menadiona, 30 μ M de NADPH, 5 μ M de FAD, 0,07% (m/v) de soro-albumina bovina, 0,03% (m/v) de MTT, 0,01% (v/v) de Tween-20 e 2 unidades/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase. O controle positivo utilizado foi o indutor beta naftoflavona (β NF) na concentração de 0,01 μ M (SONG *et al.*, 1999). Os reagentes são provenientes de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.

O ensaio de violeta cristal foi realizado, com algumas modificações, de acordo com a metodologia descrita por KANG (2004) e LIN (1997). Este método foi usado para avaliar a viabilidade celular frente à substância. A coloração por violeta cristal reflete a perda da monocamada celular através da quantidade total de proteína (KANG *et al.*, 2004) ou ácido nucléico (GILLIES *et al.*, 1986), envolvendo a estimativa de mudanças das células tratadas quando comparadas com células que não foram submetidas a tratamento, pois o dano ocasionado na célula resulta na diminuição do número de células aderidas. (MICKUVIENE *et al.*, 2004)

Primeiramente, as células Hepa 1c1c7 foram pré-incubadas em meio α -MEM suplementado com 10% de FBS nas placas de 96 poços por 24h a 37°C, em estufa de CO₂, seguido as 24h, o meio de cultura foi removido e as células foram expostas a diferentes concentrações, seguindo uma diluição seriada 1:2 da substância morelloflavona primeiramente solubilizada em dimetilsufóxido (DMSO) e então diluída em meio de cultura por um período de 48 horas.

Após 48 horas, o tratamento foi removido, em seguida foi adicionado à placa 50µL de solução de lise, incubou-se por 10 minutos a 37°C. Com o intuito de auxiliar a lise das células, as placas foram agitadas gentilmente por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, avaliou-se a atividade da QR com a adição de 200 µL da solução do ensaio. A placa foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz e submetidas à leitura. A absorbância foi medida usando um leitor de iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) a 595 nm. (PROCHASKA *et al.*, 1988; GROSS *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2004)

A potência de indução enzimática da QR é expressa em unidades por g (U/g). Uma unidade de atividade indutora de QR é definida com a quantidade de produto natural necessário para duplicar a atividade específica da QR em relação a células não tratadas. (PROCHASKA *et al.*, 1988; GROSS *et al.*, 2000)

A viabilidade celular foi determinada em uma placa, feita paralelamente, corada com violeta cristal e determinou-se a concentração que inibe em 50% o crescimento celular (IC₅₀) (PROCHASKA *et al.*, 1992). Após 48h, os tratamentos foram removidos, e as células foram coradas utilizando 100 µL de solução 0,2% violeta cristal em 2% de etanol. O corante foi desprezado e as placas foram lavadas em água corrente e secas naturalmente. Para leitura espectrofotométrica, o violeta cristal foi solubilizado em 200 µL de 0,5% dodecil sulfato de sódio (SDS) em 50% etanol e mantidas a temperatura ambiente no shaker para solubilizar o corante completamente, mantidas em estufa a 37°C até momento da leitura de absorbância a 595 nm, utilizando leitor de placas (iMark Microplate Absorbance Reader, modelo 168-1135, Bio-Rad, USA).

Foram realizados três experimentos independentes e as concentrações foram testadas em triplicatas. A viabilidade celular dos tratamentos foi expressa em porcentagem e em relação ao controle branco.

4.5. Ensaio de Sulforrodamina B

O ensaio de sulforrodamina B foi utilizado para avaliar a citotoxicidade da substância, morelloflavona, em células de HepG2. O método foi realizado segundo protocolo, no qual, as células foram incubadas em placa de 96 poços, na concentração de $1,5 \times 10^4$ células/mL, por 24h, sendo o volume final de cada poço 100µL. Em seguida foi realizado o tratamento, utilizando a substância pura, morelloflavona, nas concentrações de 2,5; 1,25; 0,625; 0,312 e 0,15µg/mL, por 24h. Terminado o tempo de tratamento, adicionou-se 50µL de TCA (ácido tri-cloroacético) 50% a 4°C junto ao meio de cultura e incubou-se a placa por 1h a 4°C. Após 1h, a placa foi lavada com água quatro vezes para eliminar o TCA e assim deixou-se secar a placa naturalmente. Ao abrigo da luz, adicionou-se 50µL da solução de Sulforrodamina B 0,4%, por 20 minutos, após esse tempo lavou-se quatro vezes a placa com ácido acético 1% até que o excesso de corante (solução de sulforrodamina) fosse removido e deixou secar ao ar livre. Incorporou-se à placa 100µL da solução de TRIS (10mM) e deixou-se a placa em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas em comprimento de onda de 570nm com referência de 655nm. Sendo assim, determinou-se a citotoxicidade da morelloflavona, que possibilitou prosseguir com os demais ensaios, genotoxicidade e antigenotoxicidade. A porcentagem de células vivas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por ZHANG *et al.* (2004): células vivas % = Absorbância do teste X 100/ Absorbância do controle negativo.

4.6. Ensaio do Cometa

Resumindo os princípios relevantes do teste: as células de HepG2 são embebidas em agarose, após são submetidas a solução de lise, o relaxamento é promovido pelo tampão alcalino (pH > 13) antes da eletroforese e assim submetidas à eletroforese, nessas condições, os fragmentos de DNA podem migrar em direção ao o pólo negativo da cuba de eletroforese, formando uma espécie de cauda, que em conjunto com a célula, é denominada cometa. (WOLFF & MÜLLER, 2006)

O ensaio de genotoxicidade foi realizado para avaliar a capacidade da substância morelloflavona de causar dano no DNA da célula. Foi estabelecida primeiramente a partir do resultado do ensaio de Quinona redutase, com base no valor positivo para indução da enzima quinona redutase, uma concentração acima e uma abaixo do valor

positivo, ou seja, as concentrações utilizadas na avaliação de genotoxicidade foram 2,5; 5,0; 1,25 respectivamente.

As células da linhagem HepG2 foram cultivadas em meio de cultura DMEN suplementado com 10% FBS, bicarbonato de sódio, Hepes, kanamicina, estreptomicina e penicilina em placas de 24 poços, por 24h, com $2,5 \times 10^5$ células/mL em cada poço com volume final 500µL. Em seguida foram expostas a diferentes concentrações da substância morelloflavona solubilizada em DMSO e diluída em meio DMEN não suplementado com FBS (para evitar a possível interação da substância utilizada com o soro). Os tratamentos foram realizados em triplicata para cada concentração, por 24 horas.

Após 24 horas os tratamentos foram removidos, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1500 RPM por 3 minutos. Em seguida retirou-se o sobrenadante e adicionou-se solução de Hanks (ressuspensando o pellet), para retirar o máximo possível de meio de cultura restante, pois este pode interferir na agarose LMP (low melting point) diminuindo sua adesão à lâmina. As células foram então centrifugadas novamente, no qual foi retirado o sobrenadante.

O pellet resultante foi resuspendido em 200 µL de agarose baixo ponto de fusão. Em seguida foram transferidos 100µL da mistura cuidadosamente para uma lâmina previamente preparada com agarose ponto de fusão normal, esta transferência foi feita em duplicata, duas lâminas por concentração. Foi colocada uma lamínula grande (24x60 mm) sobre as lâminas e deixadas na geladeira por 5 minutos, quando as lamínulas foram retiradas.

As lâminas foram submetidas à solução de lise recém-preparada a 4°C, por um período de no mínimo 12h ao abrigo da luz, e então submetidas a uma eletroforese alcalina. Em seguida, as lâminas foram dispostas de maneira regular na cuba térmica de eletroforese mantida a 4°C. A solução tampão de eletroforese (4°C) foi adicionada na cuba até que todas as lâminas fossem cobertas, estas foram deixadas durante 20 minutos em repouso para que ocorresse o relaxamento das fitas de DNA. Prosseguiu-se, ajustando a fonte de eletroforese, que foi regulada a 25 volts; a miliamperagem e a potência foram reguladas de acordo com a quantidade de solução colocada na cuba, deixando a eletroforese correr por 20 minutos. Após a corrida eletroforética, as lâminas foram retiradas cuidadosamente da cuba. Estas foram mergulhadas em solução de neutralização por 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram fixadas com etanol 100% e

deixadas secar a temperatura ambiente. A solução de brometo de etídio foi preparada com 10 mg de brometo de etídeo e 50 mL de água destilada, no qual foram armazenadas a temperatura ambiente ao abrigo da luz, esta foi utilizada para corar as lâminas, que foram cobertas com lamínula. A leitura das lâminas foi realizada imediatamente após a coloração em um microscópio de fluorescência, utilizando filtro 516-560 nm, barreira de filtro de 590 nm e aumento total de 400 vezes. Foi possível observar imagens microscópicas com contorno circular, indicando que não houve danos no DNA, e também foi possível observar estruturas em forma de “cometa”, indicando que houve danos no DNA.

A partir disso, foram capturadas imagens de 100 nucleóides por alíquota de células e analisadas pelo *software TriTek CometScore*™ versão 1.5. O parâmetro adotado no presente estudo foi o *Tail Moment* que nos permite relacionar a quantidade de DNA fragmentado com a distância que os fragmentos migraram durante a eletroforese (MOLLER, 2005).

Para avaliação da antigenotoxicidade da substância pura isolada da folha de *G. xanthochymus* foi utilizado como agente indutor de danos o peróxido de hidrogênio a 1mM por 5 minutos (H_2O_2) em células HepG2. Foram empregados protocolos de pré-tratamento e pós-tratamento, segundo proposto por Scolastici e colaboradores (2008). Esses dois protocolos de tratamento permitiram a identificação do mecanismo de ação antigenotóxica das diferentes concentrações e tempos de tratamento da substância pura isolada da espécie vegetal proposta para estudo. O ensaio de antigenotoxicidade foi realizado a partir de concentrações não genotóxicas obtidas pelo ensaio de genotoxicidade, no qual se estabeleceu a concentração em que não ocorreu dano significativo quando comparado ao controle negativo.

Após 24 horas do plaqueamento as células HepG2 foram tratadas da seguinte forma: no pré-tratamento as células foram submetidas à diferentes concentrações da substância morelloflavona diluída (diluição seriada) em meio D-MEN não suplementado com FSB, resultando em um volume final de 500 μ L/poço, por 24h. Passado o tempo de tratamento, o meio foi removido e foi adicionado o H_2O_2 a 1mM por 5 minutos. Em seguida as células foram tripsinizadas e o protocolo foi realizado como descrito anteriormente; no pós-tratamento, após 24 horas de plaqueamento as células HepG2 foram submetidas ao indutor de dano, H_2O_2 a 1 mM por 5 minutos, depois desse período o H_2O_2 foi removido e os tratamentos foram adicionados. Após 24

horas o meio foi removido e as células foram tripsinizadas e o protocolo foi realizado como descrito anteriormente.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação da citotoxicidade e do potencial de indução de quinona redutase a partir do tratamento com morelloflavona foi utilizada a análise de variância One Way ANOVA com pós-teste de Tukey. Para a comparação dos resultados quantitativos de genotoxicidade/antigenotoxicidade do tratamento com a morelloflavona comparadas com o controle negativo e positivo respectivamente foi aplicado a análise de variância *Kruskal wallis* com pós-teste de Dunn. Em todos os testes estatísticos foi considerado o nível de significância de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Ensaio de Quinona Redutase

Foram realizados três experimentos independentes para avaliar a capacidade de indução da atividade da enzima quinona redutase e a viabilidade celular pelo ensaio do violeta cristal em linhagem celular Hepa 1c1c7 (hepatocarcinoma murino), levando em consideração a indução do controle positivo (β -naftoflavona) que possui uma taxa de indução igual ou superior a duas vezes em relação ao controle de veículo dimetilsulfóxido 0,5% (DMSO), utilizado para solubilizar os compostos de *G. xanthochymus*. As células foram tratadas com morelloflavona.

Foi possível observar uma duplicação da atividade da enzima quinona redutase na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e viabilidade celular (%) igual a $101 \pm 7,49$, sugerindo que a morelloflavona, possui alguma atividade quimiopreventiva e não citotóxica pelo ensaio de Violeta Cristal. As concentrações 1,25; 5; 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram diferenças significativas em relação ao controle positivo (β NF) para a indução da enzima QR. Na avaliação da viabilidade celular houve significância estatística nas concentrações 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao controle positivo (β NF) (Figura 4).

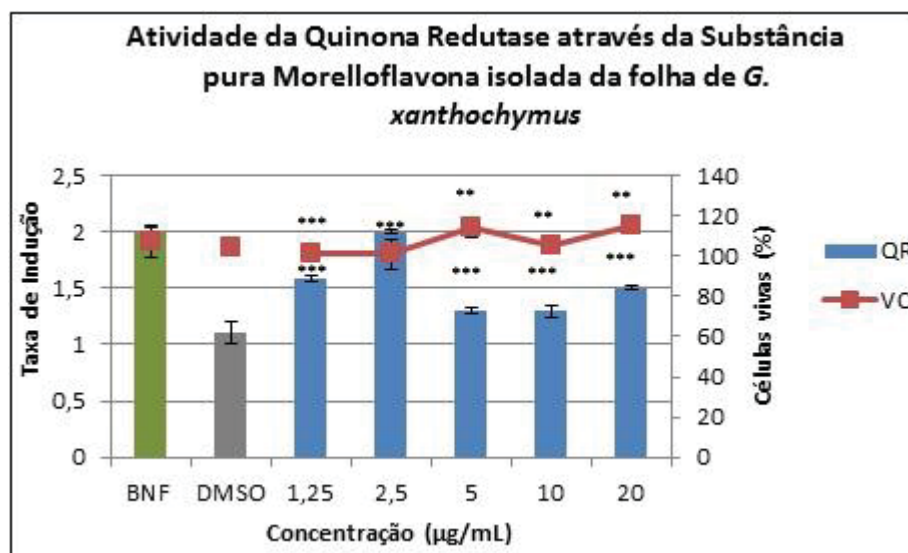


Figura 4. Indução da enzima quinona-redutase (QR) (média $\pm$ erro padrão) em células de hepatocarcinoma murino Hepa 1c1c7 através da morelloflavona (tratamento/control) (■) e relação com sobrevivência celular (%) pelo ensaio de violeta cristal (VC) (■) tratadas por 48h e comparadas com controle positivo β -nafto flavona (■) a 0,1 μ M. Análise de variância (One Way ANOVA com pós teste de Tukey) – *P* valor: QR: 1,25 vs BNF $p < 0.001$; 5 vs BNF $p < 0.001$; 10 vs BNF $p < 0.001$; 20 vs BNF $p < 0.001$; VC: 1,25 vs BNF $p < 0.001$; 2,5 vs BNF $p < 0.001$; 5 vs BNF $p < 0.01$; 10 vs BNF $p < 0.01$; 20 vs BNF $p < 0.01$. (**) $P < 0.01$

6.2. Ensaio de Sulforrodamina B

Foram realizados três experimentos independentes para avaliar a citotoxicidade da substância, morelloflavona, frente à linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HepG2), levando em consideração a citotoxicidade do controle negativo. Como controle positivo foi utilizado peróxido de hidrogênio 1mM, que tem potencial ação citotóxica, causando morte celular em 80% das células quando comparado ao controle negativo que não causa morte celular, mantendo 100% das células vivas (Figura 5).

Foi possível observar que somente as concentrações de 2,5 e 1,25 μ g/mL apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas com o controle negativo. As concentrações de 0,625, 0,312 e 0,15 μ g/mL não apresentaram diferença estatística do controle negativo, portanto são consideradas não citotóxicas (Figura 5).

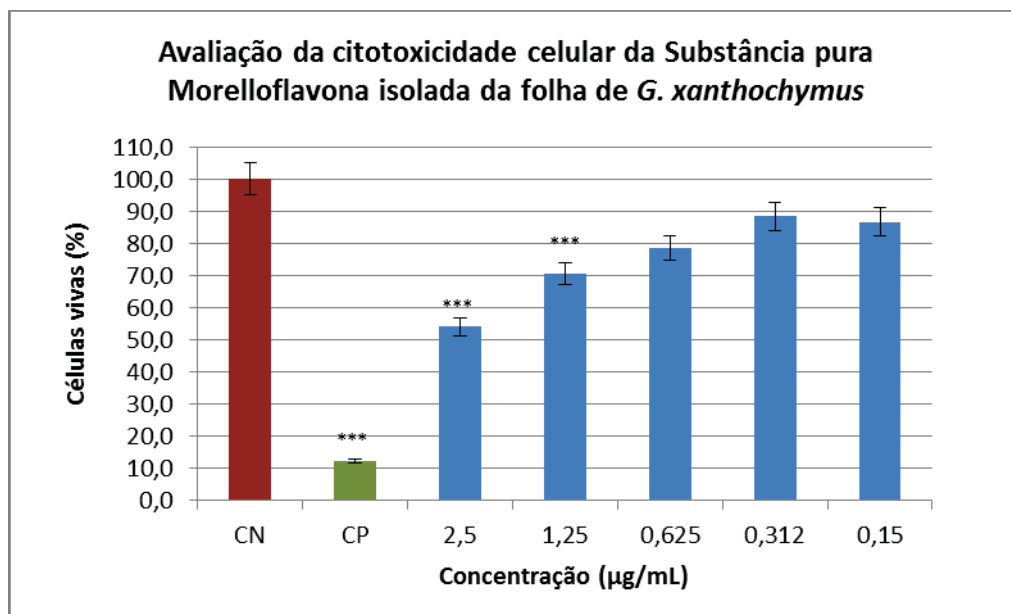


Figura 5. Avaliação da citotoxicidade de morelloflavona pelo método de sulforradamina B. Porcentagem de células (HepG2) vivas (média $\pm$ erro padrão) sob a presença de diferentes concentrações da morelloflavona (■) pelo ensaio de Sulforrodamina B. Controle positivo (CP) peróxido de hidrogênio (■) a 1 mM; Controle negativo (CN) (■). Análise de variância (One Way ANOVA com pós-teste de Tukey) – (***) $P < 0.001$

6.3. Ensaio do Cometa

Foram realizados dois experimentos com o ensaio do Cometa, no qual se avaliou a genotoxicidade e a antigenotoxicidade em linhagem de células HepG2. As concentrações utilizadas nesses experimentos são provenientes do resultado do ensaio de Quinona Redutase. No qual foi obtido a concentração da substância morelloflavona que induz a enzima e proporciona viabilidade celular significativa.

A partir das leituras das caudas dos cometas formados sobre as lâminas, as células foram analisadas pelo programa *TriTek CometScore*™ versão 1.5. Este programa permite a obtenção dos valores do *tail moment*, que relaciona a quantidade de DNA fragmentado com a distância que os fragmentos migraram durante a eletroforese (Figura 6). (MOOLER, 2005) Após a análise das imagens, os valores resultantes foram tabulados e calculados a partir da média dos valores de *tail moment* de cada concentração $\pm$ o erro padrão. Os resultados estão projetados na tabela 1, estes foram comparados com o Controle Negativo, a partir do programa GraphPad Prism®, utilizando análise estatística de variância Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn.

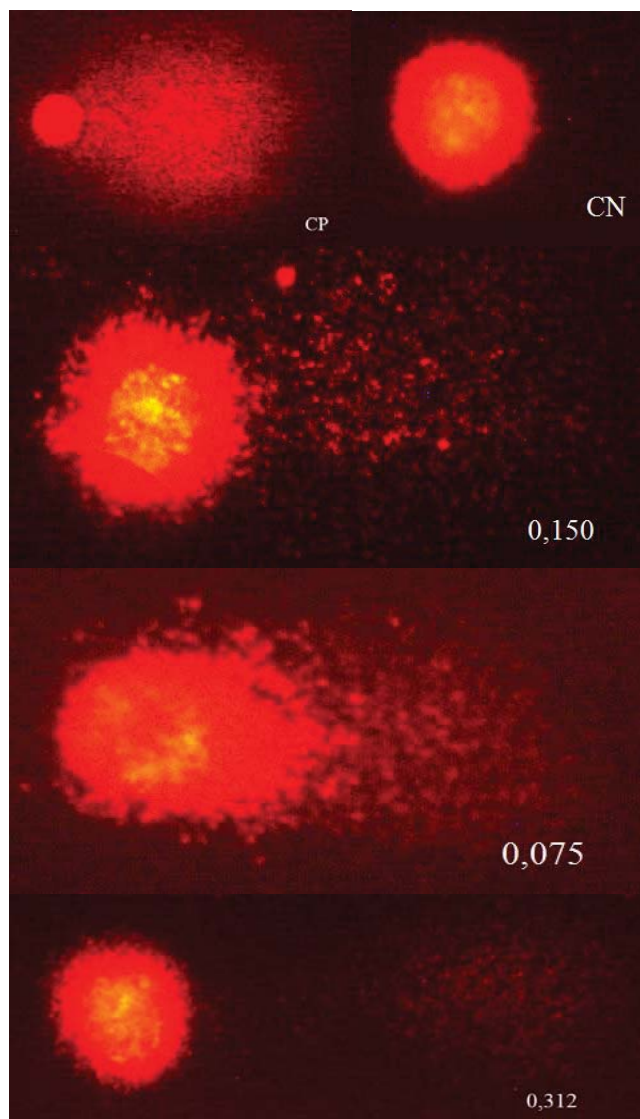


Figura 6. Análise do ensaio do Cometa. Imagens ilustrativas das células de linhagem HepG2 posteriormente a eletroforese. Controle positivo (CP), peróxido de hidrogênio; Controle negativo (CN) ausência da substância; Concentrações de 0,150 µg/mL; 0,075 µg/mL e 0,312 µg/mL da substância morelloflavona.

Na genotoxicidade, foi observado que a concentração de 0,312 µg/mL da substância morelloflavona não apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle negativo, não causando dano nessas condições, assim como o controle negativo (Tabela 1). Já nas concentrações de 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 µg/mL houve diferença significativa em relação ao controle negativo, indicando que são concentrações genotóxicas, ou seja, nessas concentrações a substância causa dano significativo no DNA quando comparado ao controle negativo (Tabela 1).

Tabela 1. Análise estatística do ensaio de Genotoxicidade

	Tail Moment $\pm$ Erro Padrão
CN	10,60 $\pm$ 1,61
CP	41,39 $\pm$ 2,41***
CV	11,40 $\pm$ 2,78
Morelloflavona ($\mu\text{g/mL}$)	
0,312	11,56 $\pm$ 2,53
0,625	7,89 $\pm$ 2,31**
1,25	16,13 $\pm$ 1,19*
2,5	16,05 $\pm$ 1,69*
5	26,87 $\pm$ 3***

Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$

No ensaio de Cometa que avalia a antigenotoxicidade, foi realizado o pré e pós-tratamento. As concentrações das substâncias utilizadas neste ensaio foram determinadas a partir do resultado do ensaio de genotoxicidade, no qual a concentração de 0,312 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo, ou seja, concentração em que a substância não causa dano significativo no DNA. Portanto, é possível verificar a possibilidade da substância proteger danos de DNA, em concentrações abaixo de 0,312. Os resultados estão projetados na tabela 2, estes foram comparados com o Controle Positivo, a partir do programa *GraphPad Prism®*, utilizando análise estatística de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn.

Na avaliação de antigenotoxicidade no pré-tratamento foi observado que na concentração de 0,312 $\mu\text{g/mL}$ não houve diferença estatística significativa, ou seja, seu resultado foi igual ao controle positivo (peróxido de hidrogênio), o que indica que causaram o mesmo grau de dano que o controle positivo (Tabela 2). Já na concentração de 0,15 $\mu\text{g/mL}$ e 0,075 $\mu\text{g/mL}$ houve diferença significativa em relação ao controle positivo.

Na avaliação de antigenotoxicidade no pós-tratamento não foi possível fazer comparação com os controles de pós tratamento, uma vez que estes não foram

realizados, devido a um equívoco de protocolo, assim os resultados obtidos no pós-tratamento não poderiam ser comparados com os controles obtidos no pré-tratamento, caso contrário, obteria-se um resultado não fidedigno, já que não há controles ideais (Tabela 2). Como não foram realizados os controles adequados para o pós-tratamento, inviabilizando as conclusões de antigenotoxicidade nesse tratamento, esses resultados deverão ser repetidos com os controles apropriados.

Tabela 2. Análise estatística do ensaio de antigenotoxicidade

	Tail Moment $\pm$ Erro Padrão	
	Pré-tratamento	Pós-tratamento
CN	8,70 $\pm$ 1,35	
CP	66,92 $\pm$ 6,28***	
CV	11,40 $\pm$ 2,78	
Morelloflavona ($\mu\text{g/mL}$)		
0,075	155,22 $\pm$ 8,34***	49,24 $\pm$ 6,91
0,15	100,24 $\pm$ 7,25**	37,25 $\pm$ 6,32
0,312	86,60 $\pm$ 6,76	55,48 $\pm$ 6,35

Análise de variância *Kruskal Wallis* com pós-teste de Dunn (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$

7. DISCUSSÃO

Diversos estudos epidemiológicos conduzidos em vários países demonstram que dietas ricas em vegetais, frutas e seus derivados, retardam o processo de envelhecimento e reduz o risco de doenças comuns nos dias de hoje, principalmente doenças cardiovasculares e câncer, além de outras patologias como artrite reumatoide e doenças degenerativas. (SZAJDEK & BOROWSKA, 2008; YIN *et al.*, 2008; RIMM *et al.*, 1996) Diversos estudos demonstraram a propriedade antitumoral e de prevenção do câncer no tratamento com extratos ou substâncias puras isoladas de plantas (DI CARLO *et al.*, 1999; MARTÍNEZ *et al.*, 2002; PANG *et al.*, 2009; KANG & PEZZUTO, 2004).

No presente estudo avaliou-se a atividade quimiopreventiva da morelloflavona. A partir disso verificou-se que o tratamento com morelloflavona não possui citotoxicidade em linhagem celular Hepa1c1c7 que contém quinona redutase induzível (Figura 4), que é facilmente mensurável e fornece um sistema confiável e de alto rendimento para detecção da indução da enzima, além de imitar tecidos animais em resposta a uma ampla variedade de agentes quimiopreventivos. (KANG & PEZZUTO, 2004; BEGLEITER & FOURIE, 2004; FAHEY *et al.*, 2004)

Entretanto, estudos prévios, baseados em investigações químicas e farmacológicas sobre a casca da raiz, folhas e frutos de diferentes espécies de *Garcinia* demonstraram efeito citotóxico em linhagens de câncer de ovário humano (CaOV-3); linhagens de câncer cervical humano (HeLa); linhagens de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e linhagens celulares de leucemia murino (L1210). (SHADED *et al.*, 2007; ELYA *et al.*, 2008)

Durante a última década, foi estabelecido um programa de pesquisa multidisciplinar focado em descobrir os princípios ativos de plantas comestíveis que podem ser usados na prevenção e tratamento do câncer do colo de útero. (BAGGET *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005) Com base em resultados anteriores e o interesse de pesquisa continuada, estudo realizado por YANG *et al.* (2010) verificou ação citotóxica do extrato de *Garcinia livingstonei* em linhagens de células de câncer de colo do útero humano (SW-480). Ainda, estudos anteriores verificaram que a família *Clusiaceae*, família a qual pertence o gênero *Garcinia*, é uma importante fonte de bioativos com atividades citotóxicas e antiproliferativas. (ACUÑA *et al.*, 2010)

A ausência de efeito citotóxico, em algumas concentrações pelo ensaio de Sulforrodamina B, de morelloflavona pode estar relacionado a sua classe de compostos, biflanóides, pois os flavonóides e os biflavonóides são compostos considerados pouco citotóxicos e com potencial atividade protetora. (YAMAGUCHI *et al.*, 2005; SUZART *et al.*, 2007; WINKEL, 2006) O biflavonóide morelloflavona pode ser encontrado em diversos tipos de plantas, tais como *Rheedia edulis* (ACUÑA *et al.*, 2010); *Garcinia cymosa* (ELFITA *et al.*, 2009); *Garcinia livingstonei* (ELFITA *et al.*, 2009); *Garcinia spicata* (GIL *et al.*, 1997); *Garcinia multiflora* (LIN *et al.*, 1997); *Garcinia dulcis* (TOWATANA *et al.*, 2007); *Garcinia xanthochyms*; entre outras, ou seja, a substância geralmente é encontrada em gêneros de *Garcinia* ssp. Isso proporciona um leque variado de atividades biológicas que a substância desempenha no organismo,

dependendo de sua origem, podendo ser atividades antiparasitárias, antivirais, antifúngicas e antibacterianas. (SORDAT *et al.*, 1992; VERDI *et al.*, 2004)

Pouco se conhece sobre a atuação da morelloflavona frente à atividade da quinona redutase e por se tratar de uma substância pouco estudada quanto à atividade quimiopreventiva, foi avaliado no presente estudo a capacidade da morelloflavona em induzir a enzima QR. Em nosso estudo verificou-se que a morelloflavona duplicou a atividade da enzima quinona redutase em linhagens celulares de Hepa 1c1c7 (Figura 4). Esse resultado é relevante no estudo de prevenção de câncer, uma vez que essa atividade, proveniente de produtos naturais pode contribuir para o tratamento e prevenção do câncer. (MIKSTACKA *et al.*, 2010; DI CARLO *et al.*, 1999; BOLLING & PARKIN, 2009; XIAO & PARKIN 2007; YANG *et al.*, 1997; WISEMAN 1996) YANG & LIU (2009), demonstraram que substâncias fitoquímicas contidas em grande quantidade nas uvas, são prováveis indutores de quinona redutase, podendo servir como protetores celulares contra o estresse oxidativo e eletrofilico. Nas uvas foram encontrados compostos fenólicos, flavonóides e taninos condensados, no qual apenas a quercetina, genisteína e o resveratrol apresentaram indução de QR, pelo ensaio de QR em Hepa 1c1c7, portanto demonstrou atividade quimiopreventiva de compostos extraídos das uvas. Outro estudo conduzido por CHOI *et al.* (2011) demonstrou que o resveratrol, proveniente de produtos naturais como uvas, castanhas, e vinho tinto, apresentou atividade quimiopreventiva contra o câncer utilizando o ensaio de Quinona Redutase.

Os mecanismos de quimioprevenção do câncer está relacionado à indução de enzimas de detoxificação de fase 2 (QR). A partir disso foram desenvolvidos métodos, utilizando culturas celulares para testar a capacidade de extratos vegetais em induzir enzimas protetoras. (PROCHASKA 1988) A genisteína é um composto extraído da farinha de soja, que foi isolado no estudo de BOLLING & PARKIN (2009), para testar a indução de QR em Hepa 1c1c7. Foi encontrado que a genisteína é a mais potente indutora de QR, do que as demais 13 frações obtidas e testadas. Embora a genisteína tenha apresentado atividade indutora de QR, essa atividade foi menor quando comparada ao tratamento concomitante das frações de acetato de etila e etanol, as quais contêm glicosídeos isoflavonóides. (BOLLING & PARKIN, 2009) A atividade quimiopreventiva ou a ausência de ação protetora e danos ao DNA podem ser também

avaliada, respectivamente, por ensaios de antigenotoxicidade e genotoxicidade, utilizando o ensaio do Cometa. (TICE *et al.*, 2000)

Assim, para a determinação do potencial genotóxico da morelloflavona, foi realizado o ensaio do cometa. No presente estudo, verificou-se que a morelloflavona é capaz de induzir dano de DNA em concentrações de 0,625 a 5µg/mL (Tabela 1). Na menor concentração, 0,312µg/mL não foi observada atividade genotóxica da morelloflavona. Dessa forma, avaliou-se a atividade antigenotóxica da morelloflavona na menor concentração e foi possível observar ação antigenotóxica na concentração de 0,312µg/mL no pré-tratamento (Tabela 2). BARCELOS *et al.* (2007), realizou estudos com a planta *Anacardium occidentale*, mais conhecida como caju, no qual utilizou-se o extrato metanólico da casca da raiz para avaliar a atividade genotóxica e protetora, por meio do ensaio do Cometa em linhagem celular V79 (células de pulmão de rato). Nesse estudo, utilizando o ensaio do Cometa, a substância α -hederine não apresentou ação protetora (antigenotóxica) nos ensaios de pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento. Estudos *in vivo*, realizados por GUO *et al.* (2007), demonstraram que o ácido ascórbico (vitamina presente em diversos tipos de frutas e vegetais) tem ação protetora contra os danos de DNA induzidos pelo etanol em células embrionárias do hipocampo de rato e em células da glia de cérebro humano, pelo ensaio do Cometa. (GUO *et al.*, 2007)

Os flavonóides são conhecidos, de maneira geral pela sua atividade antioxidante, isso acontece devido a sua fórmula estrutural que permite uma conformação ideal para o sequestro de radicais livres. Além disso, sua atividade antioxidante depende de fatores como, por exemplo: reatividade com o agente doador de H^+ e elétrons; estabilidade do radical flavonoil formado; reatividade frente a outros antioxidantes; capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas. (BARREIROS *et al.*, 2006) Os flavonóides devem conter pelo menos dois anéis fenílicos em sua estrutura química separados por um anel pirano, no qual podem induzir enzimas antioxidantes. (LLÓPIZ *et al.*, 2004)

8. CONCLUSÕES

- Observou-se que a atividade da enzima quinona redutase foi duplicada quando se realizou o tratamento das células Hepa1c1c7 com a morelloflavona na concentração de 2,5µg/mL, além disso foi observado uma relativa atividade da enzima em

concentrações acima de 2,5µg/mL, ou seja a morelloflavona mostrou ser capaz de induzir a atividade da enzima quinona redutase, sugerindo que a substância possui alguma atividade quimiopreventiva.

- Através do método do Violeta Cristal foi possível observar que a substância utilizada no tratamento das células, morelloflavona, não é citotóxica.

- Apesar da morelloflavona ter atividade quimiopreventiva, ela se mostrou citotóxica pelo ensaio da sulforrodamina B, nas mesmas concentrações em que houve indução de atividade de QR, ou seja, não pode ser considerado um bom quimiopreventor.

- Pelo ensaio do cometa foi possível avaliar a genotoxicidade da morelloflavona, no qual se mostrou não genotóxica na concentração de 0,312µg/mL e genotóxica em concentrações acima de 0,312 µg/mL.

- A antigenotoxicidade foi também avaliada, no pré-tratamento, a morelloflavona apresentou dano de DNA em concentrações de 0,075 e 0,15 µg/mL, ou seja, a substância não foi capaz de proteger a célula de danos ao DNA causados pelo peróxido de hidrogênio, porém na concentração de 0,312 µg/mL ocorreu uma possível atividade protetora.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA, U. M.; FIGUEROA, M.; KAVALIER, A.; JANCOVSKI, N.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Benzophenones and Biflavonoids from *Rheedia edulis*. **Journal of Natural Products**, 2010, Vol. 73, No. 11.
- ALMEIDA, L. R.; SILVA, VOL. VOL. da; RIVELLI, D. P.; MIRANDA, D. VOL.; SAWADA, T.C. H.; BARROS, S. B. de M.; ROPKE, C. D. Padronização e determinação da fotoestabilidade do extrato de folhas de *Pothomorphe umbellata* L. Miq (pariparoba) e avaliação da inibição *in vitro* de metaloproteínases 2 e 9 na pele. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Vol. 44, No. 1, jan./mar., 2008.
- BAGGETT, S. PROTIVA, P.; MAZZOLA, E. P.; YANG, H.; RESSLER, E. T.; BASILE, M. J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. Bioactive Benzophenones from *Garcinia xanthochymus* Fruits. **J. Nat. Prod.**, Vol. 68, p. 354-360, 2005.
- BARCELOS, G. R. M.; SHIMABUKURO, F.; MACIEL, M. A. M.; CÓLUS, I. M. S. Genotoxicity and antigenotoxicity of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in V79 cells. **Toxicology in Vitro**, Vol. 21, p. 1468-1475, 2007.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, Vol. 29, No. 1, p. 113-123, 2006.
- BEGLEITER, A. and FOURIE, J. Induction of NQO1 in Cancer Cells. **Methods in enzymology**, Vol. 382, p. 320-351, 2004.
- BERHOW, M. A.; WAGNER, E. D.; VAUGHN, S. F.; PLEWA, M. J. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. **Mutation Research** Vol. 448, p. 11-22, 2000.
- BOLLING, B. W. and PARKIN, K. L. Limited contribution of isoflavones to hepatocellular phase II enzyme-inducing activity of soybean (*Glycine max*) extracts. **Food Chemistry**, Vol. 113, p. 1069-1075, 2009.
- CHANMAHASATHIEN, W. et al. Prenylated xanthones from *Garcinia xanthochymus*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Vol. 51, No. 11, p. 1332-1334, 2003.

CHOI, Y.; JERMIHOV, K.; NAM, S.; MEGAN, S.; MALONEY, K.; QIU, X.; CHADWICK, L. R.; MAIN, M.; CHEN, S.; MESECAR, A. D.; FARNSWORTH, N. R.; PAULI, G. F.; FENICAL, W.; PEZZUTO, J. M.; BREEMEN, R. B. Screening Natural Products for Inhibitors of Quinone Reductase-2 Using Ultrafiltration LC-MS, **Anal. Chem.**, Vol. 83, p. 1048–1052, 2011.

CRUZ, F. G.; MOREIRA, L. M.; DAVID, J. M.; GUEDEST, M. L. S.; CHAVEZ, J. P. Coumarins from *Kielmeyera reticulata*. **Phytochemistry**, Vol. 47, No. 7, p. 1363-1366, 1998.

CUENDET, M.; OTEHAM, C.P.; MOON, R.C.; PEZZUTO, J.M. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. **J. Nat. Prod**, Vol. 69, No. 3, p. 460-463, 2006.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, Vol. 65, No. 4, p. 337-353, 1999.

DI STASI, L. C. and HIRUMA-LIMA, C. A. Guttiferales medicinais. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Ed. UNESP, 2002.

ELFITA, E.; MUHARNI, M.; MADYAWATI, L.; DARWATI, D.; WIDIYANTORO, A.; SUPRIYATNA, S.; BAHTI, H. H.; DACHRIYANUS, D.; COS, P.; MAES, L.; FOUBERT, K.; APERS, S.; PIETERS, L. Antiplasmodial and other constituents from four Indonesian *Garcinia* sp. **Phytochemistry**, Vol. 70, p. 907-912, 2009.

ELYA, B.; HE, H. P.; KOSELA, S.; HANAFI, M.; HAO, X. J. A new cytotoxic xanthone from *Garcinia rigida*. **Fitoterapia**, Vol. 79, p. 182-184, 2008.

FAHEY, J. W.; DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; STEPHENSON, K. K.; TALALAY, P. The “Prochaska” Microtiter Plate Bioassay for Inducers of NQO1. **Methods in enzymology**, Vol. 382, p. 243-258, 2004.

FERNANDES, D. C. Estudo Químico e Atividade Biológica de *Garcinia xanthochymus* (Clusiaceae). **Dissertação apresentada ao Instituto de Química da UNESP**, 2010.

FOTIE, J.; NKEGFACK, C.K.; RUKUNGA, G.; TOLO, F.; PETER, M. G.; HEYDENREICH, M.; FOMUM, Z. T. A. Trop. Med. **Parasitology**, Vol. 97. p. 683, 2003.

GIL, B.; SANZ, M. J.; TERCENIO, C.; GUNASEGARAN, R.; PAYÁ, M.; ALCARAZ, J. Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A₂ with Anti-Inflammatory Activity. **Biochemical Pharmacology**, Vol. 53, p. 733-740, 1997.

GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of Cell Number in Monolayer Cultures. **Analytical Biochemistry**, Vol. 159, p. 109-113, 1986.

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

GUO, L.; WANG, L. H.; SUN, B.; YANG, J. Y.; ZHAO, Y. Q.; DONG, Y. X.; SPRANGER, M. I.; WU, C. F. Direct In Vivo Evidence Of Protective Effects Of Grape Seed Procyanidin Fractions And Other Antioxidants Against Ethanol-Induced Oxidative DNA Damage In Mouse Brain Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 55, No. 14, 2007.

HAY, A. E.; AUMOND, M.C.; MALLET, S.; DUMONTET, VOL.; LITAUDON, M.; RONDEAU, D.; RCHOMME, P. Antioxidant xanthones from *Garcinia vieillardii*. **P. J. Nat. Prod**, Vol. 67, p. 707, 2004.

INCA MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER. COORDENAÇÃO NACIONAL DE CONTROLE DE TABAGISMO - CONTAP. "Falando Sobre Câncer e Seus Fatores de Risco". Rio de Janeiro, 1996. Acesso 29/06/11 http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319

INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER-INCA. Câncer. Disponível em: Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>. Acesso em 26 de agosto de 2010.

- ITO, C.; ITOIGAWA, M.; KANEMATSU, T.; RUANGRUNGSI, N.; HIGASHIHARA, H.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. [New cinnamylphenols from Dalbergia species with cancer chemopreventive activity](#). **J Nat Prod.**, Vol. 66, n. 12, p. 1574-1577, 2003.
- JUNIOR, A. G.; FERREIRA, I. C. P.; NAKAMURA, C. VOL.; FILHO, B. P. D.; JACOMASSI, E.; YOUNG, M. C. M.; CORTEZ, D. A. G. Estudo morfo-anatômico das folhas e caule da *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma contribuição ao estudo farmacognóstico da droga vegetal. **Acta Farm. Bonaerense**, Vol 24 (3), p. 371-6, 2005.
- KANG, Y. and PEZZUTO, J. M. Induction of Quinone Reductase as a Primary Screen for Natural Product Anticarcinogens. **Methods in enzymology**, Vol. 382, p. 380-414, 2004.
- KELLOFF, G. J.; BOONE, C. W.; STEELE, VOL. E.; FAY, J. R.; LUBET, R. A.; CROWELL, J. A.; SIGMAN, C. C. Mechanistic consideration in chemopreventive drug development. **J. Cell. Biochem. Suppl.**, Vol. 20, p. 1 - 24, 1994.
- LIN, YUH-MEEI; ANDERSON, H.; FLAVIN, M. T.; PAI, YEAH-HUEI S. In vitro Anti-HIV Activity of Biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. **Journal of Natural Products**, Vol. 60, No. 9, 1997.
- LLÓPIZ, N.; PUIGGRÒS, F.; CÉSPEDES, E.; AROLA, L.; ARDEVOL, A.; BLADÉ, C.; SALVADÓ, J. Antigenotoxic Effect of Grape Seed Procyanidin Extract in Fao Cells Submitted to Oxidative Stress. **J. Agric. Food Chem.** Vol. 52, p. 1083-1087, 2004.
- MABBERLEY, D. J. **The plant-book**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.
- MARTÍNÉZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, Vol. 17, p. 271-278, 2002.
- MCCORMACK, G. **Cook Islands Biodiversity Database**, Version 2007.2., 2007. Cook Islands Natural Heritage Trust, Rarotonga. Disponível em: <http://cookislands.bishopmuseum.org>.

- MICKUVIENE, I.; KIRVELIENE, VOL.; JUDOKA, B. Experimental survey of non-clonogenic viability assays for adherent cells in vitro. **Toxicology in vitro**, Vol. 18, p. 639-648, 2004.
- MIKSTACKA, R.; RIMANDO, A. M.; IGNATOWICZ, E. Antioxidant effect of *trans*-Resveratrol, Pterostilbene, Quercetin and Their Combinations in Human Erythrocytes *In Vitro*. **Plant Foods Hum Nutr**, Vol.65, p. 57-63, 2010.
- MOLLER, P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. **Basic Clin. Pharmacol**, Vol. 96, p. 1–42, 2005.
- MORSE, M. A. and STONER, G. D. Cancer chemoprevention: principles and prospects. **Carcinogenesis**, Vol. 14, p. 1737 - 1746, 1993.
- MULLER, E, STOCK, T., BAUER, S., AND WOLFF, I. Genotoxicological characterisation of complex mixtures: Genotoxic effects of a complex mixture of perhalogenated hydrocarbons. **Mutat. Res.**, Vol. 515, p. 99-109, 2002.
- NAGEM, T. J. and SILVA, M. A. Xanthoness and phenylcoumarins from *Kilmeyera pumila*. **Phytochemistry**, Vol. 27, p. 2961-2962, 1988.
- NISHINO, H. Cancer prevention by carotenoids. **Mutation research**, Vol. 402, p. 159-163, 1998.
- PANG, X.; YI, T.; YI, Z.; CHO, S. G.; QU, W.; PINKAEW, D.; FUJISE, K.; LIU, M. Morelloflavone, a biflavonoid, Inhibits Tumor Angiogenesis by Targeting Rho GTPases and Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathways. **Cancer Research**, Vol. 69, p. 518-525, 2009.
- PATEL, R.; GARG, R.; ERANDE, S.; MARU, G. B. Chemopreventive Herbal Anti-Oxidants: Current Status and Future Perspectives. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, Vol. 40, p. 82-91, 2007.
- PERES, VOL.; NAGEM, T.J.; OLIVEIRA, F. F. **Phytochemistry**, Vol. 55, p. 683, 2000.

PEZZUTO, J. M.; KOSMEDER, J. W.; PARK, E. J.; LEE, S. K.; CUENDET, M.; AHT, K.; GRUBJESIC, S.; PARK, H. S.; MATA-GREENWOOD, E.; TAN, Y.; YU, R.; LANTVIT, D. D.; KINGHORN, A. D. **Cancer Chemoprevention, Volume 2: Strategies for Cancer Chemoprevention**, 2005.

PILOT, H. C. The role of receptors in multistage carcinogenesis. **Mutation Research**, Vol. 333, p. 3-14, 1995.

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

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

RIBEIRO, E. M. S. F. e MAIA, N. F., Câncer. Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, **Revista Ciência Hoje**, Vol. 32, No. 189, 2002.

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W. M. A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. Th. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography**, Vol. 1112, p. 31-63, 2006.

RIMM, E. B.; KATAN, M. B.; ASCHERIO, A.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C. Relation Between Intake of Flavonoids and Risk for Coronary Heart Disease in Male Health Professionals. **Annals of Internal Medicine**, Vol. 125, No. 5, 1996.

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

SHADED, K. A.; SHAARI, K.; ABAS, F.; ISRAF, D. A.; HAMZAH, A. S.; SYAKRONI, N.; SAHA, K.'LAJIS, N. H. Cytotoxic caged-polyprenylated xanthonoids and xanthone from *Garcinia Catleyana*. **Phytochemistry**, Vol. 68, p. 2537-2544, 2007.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.**, Vol. 175, 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. **J. Natl. Cancer Inst.**, Vol. 82, p. 1107 - 1112, 1990.

SONG, L. L.; KOSMEDER II, W.; LEE, S. K.; GERHäUSER, C.; LANTVIT, D.; MOON, R. C.; MORIARTY, R. M.; PEZZUTO, J. M. Cancer Chemopreventive Activity Mediated By 4'-Bromoflavone, A Potent Inducer Of Phase II Detoxification Enzymes. **Cancer Research**, Vol. 59, p. 578-585, 1999.

SORDAT-DISERENS, I.; ROGERS, C.; SORDAT, B.; HOSTETTMANN, K. Prenylated xanthenes from *Garcinia livingstonei*. **Phytochemistry** Vol. 31, p. 313–316, 1992.

SOUZA, VOL. and LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação de famílias de angiospermas da flora brasileira. São Paulo: **Instituto Plantarum**, p. 348, 2005.

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

SURH, Y. and FERGUSON, L. R. Dietary And Medicinal Antimutagens And Anticarcinogens: Molecular Mechanisms And Chemopreventive Potential-Highlights of a Symposium. **Mutation Research**, Vol. 523-524, p. 1-8, 2003.

SUZART, L. R.; DANIEL, J. F. D. S.; CARVALHO, M. G. Biodiversidade flavonoídica e aspectos farmacológicos em espécies dos gêneros *Ouratea* E. *Luxembrugia* (OCHNACEAE). **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 4, p. 984-987, 2007.

SZAJDEK, A. and BOROWSKA, E. J. Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A review. **Plants Foods Hum Nutr**, Vol. 63, p. 147-156, 2008.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen**, Vol. 35, n.3, p. 206-221, 2000.

TOWATANA, N. H.; KONGKACHUAY, S.; MAHABUSARAKAM, W. Inhibition of human lipoprotein oxidation by morelloflavone and camboginol from *Garcinia dulcis*. **Natural Product Research**, Vol. 21, No. 7, p. 655-662, June 2007.

VERDI, L. G.; PIZZOLATTI, M. G.; MONTANHER, A. B.; BRIGHENTE, I. M.; SMANIA JUNIOR, A.; SMANIA ED EDE, F.; SIMIONATTO, E. L.; MONACHE, F. D. Antibacterial and brine shrimp lethality tests of bioflavonoids and derivatives of *Rheedia gardneriana*. **Fitoterapia**, Vol. 75, p. 360–363, 2004.

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

WINKEL-SHIRLEY, B. The biosynthesis of flavonoids. En “The Science of Flavonoids” (Grotewold, E. ed.).. **Springer**, p. 71-96, New York, 2006.

WISEMAN, H. Dietary influences on membrane function: Importance in protection against oxidative damage and disease. **Nutritional Biochemistry**, Vol 7, p. 2-15, 1996.

WOLFF, I. and MÜLLER, P. Micronuclei and Comet Assay. **Cell Biology**, chapter 39, 2006.

XIAO, H. and PARKIN, K. L. Isolation and identification of potencial cancer chemopreventive agents from methanolic extracts of green onion (*Allium cepa*). **Phytochemistry**, Vol. 68, p. 1059-1067, 2007.

YAMAGUCHI, L. F.; VASSÃO, D. G.; KATO, M. J.; MASCIO, P. D. Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials agentes against DNA damage and lipoperoxidation. **Phytochemistry**, Vol. 66, p. 2238-2247, 2005.

YANG, C. S.; LEE, MAO-JUNG; CHEN, L.; YANG, G. Polyphenols as inhibitors of carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, Vol. 105, Supplement 4, 1997.

YANG, H.; FIGUEROA, M.; TO, S.; BAGGETT, S.; JIANG, B.; BASILE, M. J.; WEINSTEIN, B.; KENNELLY, E. J. Benzophenones and Biflavonoids from *Garcinia livingstonei* Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 58, No. 8, 2010.

YANG, H.; PROTIVA, P.; GIL, R. R.; JIANG, B.; BAGGETT, S.; BASILE, M. J.; REYNERTSON, K. A.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. Antioxidant and cytotoxic isoprenylated coumarins from *Mammea americana*. **Planta Med.**, Vol. 71, p. 852–860, 2005.

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

YIN, X.; QUAN, J.; KANAZAWA, T. Banana Prevents Plasma Oxidative Stress in Healthy Individuals. **Plants Foods Hum Nutr**, Vol. 63, p. 71-76, 2008.

ZHANG, Y.; WU, L.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Evodiamine Induces Tumor Cell Death Through Different Pathways: Apoptosis And Necrosis. *Acta Pharmacol Sin*, Vol. 25, P. 83-89, 2004.

ZHONG, F. F.; CHEN, Y.; MEI, Z. N.; YANG, G. Z. Xanthones from the bark of *Garcinia xanthochymus*. **Chinese Chemical Letters**, Vol. 18, p. 849-851, 2007.