

LILIANE DA SILVA COELHO

**ACCIÓN MODULADORA DE LA GENOTOXICIDAD DE LA PLANTA
MEDICINAL *Duguetia furfuracea* (St.Hil) Benth. & Hook f. EN CÉLULAS
SOMÁTICAS Y GERMINATIVAS DE *Drosophila melanogaster* Y EN CEPAS
DE *Salmonella typhimurium***

Noviembre – 2015

ESTE TRABAJO SE LO DEDICO A
MIS PADRES, ALCI COELHO GOMES
E ANTENOR GOMES DA SILVA.

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Paz Herraéz, juntamente com os demais componentes do Departamento de Biologia Celular e Anatomia da Universidade de León (Espanha).
- Ao Prof. Dr. Salvador de Carvalho e a equipe do Laboratório de Mutagênese com *Drosophila*, pela orientação, e disponibilidade dos recursos para a realização dos testes com *Drosophila melanogaster*.
- À Profa. Dra. Lee Chen Chen pela orientação, apoio e incentivo constantes, juntamente com a equipe do Laboratório de Radiobiologia de Microorganismos e Mutagênese.
- Ao Prof. Dr. Mário Antônio Spanó e o Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno, da Universidade Federal de Uberlândia-MG, pela orientação na análise estatística dos dados referentes ao teste SMART/asa.
- Ao Prof. Ms. Heleno Dias Ferreira, pelo auxílio nos trabalhos de campo e identificação da planta estudada.
- À funcionária Maria Alves Pereira, pelo auxílio na preparação das lâminas.
- À Sra. Heloísa da Silva Coelho pelo apoio e consideração durante a realização deste trabalho.
- À Sra. Christine Barbara Weber pelo constante apoio, incentivo, disponibilidade e colaboração na realização deste trabalho.
- À Sra. Suzete Celi Rissio pelo constante apoio, incentivo, disponibilidade e colaboração na realização deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Fernando Luiz Kratz pela revisão dos testes com *Drosophila melanogaster*.
- Ao Prof. Dr. Bruce Ames e sua equipe da Universidade de Berkeley, California (U.S.A), por ter enviado as cepas bacterianas para a realização deste trabalho.
- À Universidade do Estado do Mato Grosso, pelo apoio concedido na realização deste trabalho.
- Ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, pelo apoio e disponibilidade de recursos na execução do trabalho.
- À FUNAPE, pelos auxílios financeiros para reagentes e participação em congressos.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	<i>Drosophila melanogaster</i> como organismo experimental	5
1.2	Testes bacterianos	8
1.3	Test de pérdida del cromosoma X en anillo (Ring-x-loss)	9
1.4	Test para detección de mutaciones y recombinaciones somáticas (SMART).....	11
1.5	Test de Ames	13
1.6	<i>Duguetia furfuracea</i>	14
2.	OBJETIVOS	20
3.	EXPERIMENTO I	21
3.1	Test para la detección de la pérdida del cromosoma X en anillo.....	21
3.2	Material y método	21
3.2.1	Linajes de <i>Drosophila melanogaster</i>	21
3.2.2	Definición de las dosis de <i>Duguetia furfuracea</i>	21
3.2.3	Controles	22
3.2.4	Medio de cultura	23
3.2.5	Procedimiento.....	23
3.2.6	Análisis da generación F1	23
3.2.7	Análisis estadístico	25
3.3	Resultados y discusión	25
4.	EXPERIMENTO II	33
4.1	Test para detección de mutaciones y recombinaciones somáticas (SMART).....	33
4.2	Material y método	33
4.2.1	Cruzamientos entre los linajes mutantes	33

4.2.2	Definição das doses de <i>D. furfuracea</i>	34
4.2.3	Controles	34
4.2.4	Medio de cultura	34
4.2.5.	Procedimiento.....	34
4.2.6	Preparación de alas.....	35
4.2.7	Análisis de láminas	35
4.2.8	Análisis estadístico	35
4.3	Resultados y discusión	36
4.3.1	Verificación sobre la posible actividad mutagénica de <i>D. furfuracea</i> en células somáticas de <i>D. melanogaster</i>	36
4.3.2	Verificación del efecto protector de <i>D. furfuracea</i> en células somáticas de <i>D. melanogaster</i>	40
5.	EXPERIMENTO III	48
5.1	Test de Ames	48
5.2	Material y métodos	48
5.2.1	Linajes de <i>S. typhimurium</i>	48
5.2.2	Controles	48
5.2.3	Medio de cultura	48
5.2.4.	Verificación de las características genéticas y conservación de las cepas bacterianas.....	49
5.2.5.	Procedimiento experimental	50
5.2.6.	Expresión e analyses de los resultados.....	51
5.3	Resultados y discusión	51
5.3.1	Evaluación de la atividad mutagénica de <i>D. furfuracea</i> en cepas de <i>S. typhimurium</i>	52
5.3.2	Evaluación de la actividad antimutagénica de <i>D. furfuracea</i> en cepas de <i>S. typhimurium</i>	54

6.	DISCUSIÓN GENERAL	60
6.1	Evaluación sobre la posible actividad genotóxica de <i>D. furfuracea</i> en células germinales de <i>D. melanogaster</i>	60
6.2	Evaluación sobre la posible actividad genotóxica y antigenotóxica de <i>D. furfuracea</i> en células somáticas de <i>D. melanogaster</i>	64
6.3	Evaluación sobre la posible actividad mutagénica y antimutagénica de <i>D. furfuracea</i> en cepas <i>S. typhimurium</i> por el test de Ames.....	68
7.	CONCLUSIONES.....	74
8.	RESUMEN.....	76
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	111
10.	ANEXOS	129

FIGURAS:

Figura 1A (Experimento I).....	129
Figura 1E (Experimento I).....	131
Figura 1B, a (Experimento I).....	132
Figura 1B, b (Experimento I).....	132
Figura 1C, a (Experimento I)	132
Figura 1C, b (Experimento I)	132
Figura 1D (Experimento I)	133
Figura 2A (Experimento II).....	134
Figura 2B (Experimento II).....	135
Figura 2C (Experimento II)	137
Figura 2D (Experimento II)	138
Figura 2E (Experimento II).....	142
Figura 2F (Experimento II).....	143

Figura 2G, a (Experimento II)	144
Figura 2G, b (Experimento II)	144
Figura 2H, a (Experimento II)	144
Figura 2H, b (Experimento II)	144
Figura 2I (Experimento II)	145
Figura 2J (Experimento II)	146
Figura 3A (Experimento III).....	150
Figura 3B (Experimento III).....	150
Figura 3C (Experimento III)	151
Figura 3D (Experimento III)	151
Figura 3E (Experimento III).....	152
Figura 3F (Experimento III).....	152
Figura 3G (Experimento III)	153
Figura 3H (Experimento III)	153

TABLAS:

Tabla 1A (Experimento I).....	130
Tabla 2A (Experimento II).....	136
Tabla 2B (Experimento II).....	130
Tabla 3A (Experimento III).....	147
Tabla 3B (Experimento III).....	154
Tabla 3C (Experimento III).....	155
Tabla 3D (Experimento III).....	156
Tabla 3E (Experimento III).....	157
Tabla 3F (Experimento III).....	158
Tabla 3G (Experimento III)	159
Tabla 3H (Experimento III).....	160

Tabla 3I (Experimento III)	161
----------------------------------	-----

CUADROS:

Cuadro 1A (Experimento I)	129
Cuadro 3A (Experimento III)	147
Cuadro 3B (Experimento III)	147
Cuadro 3C (Experimento III)	147
Cuadro 3D (Experimento III)	148
Cuadro 3E (Experimento III)	148
Cuadro 3F (Experimento III)	148
Cuadro 3G (Experimento III)	149

1 . INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é uma prática generalizada na medicina popular. É o resultado do acúmulo secular de conhecimentos empíricos sobre a ação dos vegetais, por diversos grupos étnicos. A importância das plantas na medicina popular por suas propriedades terapêuticas é detectada ao longo da história da humanidade. A China, desde o ano 3000 a. C., já se dedicava ao cultivo das plantas medicinais, como a raiz de ginseng, o ruibarbo, a cânfora, destacando-se na farmacognosia. Os antigos egípcios conseguiram grandes progressos no fabrico de cosméticos, antissépticos, gomas e outras matérias de origem vegetal, paralelo à criação de purgantes, vermífugos e diuréticos. O embalsamento de múmias foi possível graças a estes progressos que remontam a 2300 a.C. Ainda neste período, assírios e hebreus já se dedicavam à cultura de diversas plantas para o uso medicinal e rituais religiosos, como também no preparo de cosméticos. Na Índia, no período brâmico (seis últimos séculos a.C.), constam obras que abordam assuntos como essências, elixires, purgantes, tinturas, extratos aquosos, etc., exaltando as propriedades de certos vegetais, assim como de diversos outros medicamentos e receitas. Na Grécia antiga, Hipócrates (460-377 a.C.), considerado o “Pai da Medicina”, reuniu em sua obra “Corpus Hippocraticum”, a síntese dos conhecimentos médicos de seu tempo. A importância das plantas e seu valor terapêutico ou tóxico na Antiga Grécia alcançou o início da Era Cristã, quando Dióscorides, em seu tratado “De Materia Médica”, enumerou mais de 500 drogas de origem vegetal, descrevendo o emprego terapêutico de muitas delas. Durante o Império Romano (primeiros cinco séculos da Era Cristã), os romanos, extremamente dependentes das ervas para uso medicinal e culinário, as importavam da África, Espanha e do Oriente e as disseminavam por todo o império. Na idade média, apesar da medicina e os estudos das plantas sofrerem um período de inércia, se destacaram os mosteiros que, na Europa, mantiveram viva a literatura medicinal, os árabes que contribuíram para a difusão de diversas plantas medicinais nas costas do Mediterrâneo e os alquimistas, que, ao darem início à iatroquímica (a cura de doenças como verdadeira finalidade da química) e discorrerem sobre a terapêutica das plantas, lançaram as bases da medicina natural (Covalite e Franco,2002).

Observações realizadas até agora indicam que todas as formações culturais fazem uso de plantas como recurso medicinal. Em todas as épocas e em todas as culturas, o homem aprendeu a tirar proveito dos recursos naturais locais (Lorenzi e Matos, 2002).

O Brasil possui uma grande diversidade de plantas medicinais. Desde a época do descobrimento, os índios já retinham, e ainda o fazem, conhecimentos sobre os poderes medicinais de cada arbusto, folha, tronco e raiz. Os imigrantes, vindos de diversas partes do mundo, contribuíram através de seus costumes na ampliação dos conhecimentos das plantas medicinais. A influência européia teve início com os jesuítas, que vieram para o Brasil em 1579 e que, além de trazerem seus conhecimentos no tratamento de doenças pelo uso das plantas, trouxeram ervas medicinais que se reproduziram, formando genótipos e variedades distintas que se adaptaram ao solo brasileiro (Martins et al. 1995; Adeodato et al. 1996).

Atualmente mais de 25% dos medicamentos em uso são derivados naturais ou produtos semi-sintético, de origem natural. Nos países em desenvolvimento da América Latina, a percentagem de utilização de produtos naturais vem aumentando consideravelmente, revelando a importância do conhecimento da composição química, ação farmacológica e de possíveis efeitos colaterais dessas plantas (OPAS/OMS, 1996). Grande parte das plantas brasileiras apresentam alguma propriedade terapêutica útil à população. No entanto, registros comprovam que a percentagem de espécies estudadas sob o ponto de vista fitoquímico ou farmacológico não chega a 1% (Martins *et al*, 1995).

O consumo de remédios obtidos de plantas medicinais é prática comum para cerca de 80% da população mundial, segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde. A OMS tem incentivado o uso de plantas medicinais por terem muitos fatores que colaboram para o desenvolvimento de práticas de saúde, incluindo principalmente a facilidade de acesso, o baixo custo e a compatibilidade cultural com as tradições populares (Colavitti e Franco, 2002).

Os organismos vivos, em seu processo evolutivo, vem sofrendo interações com o ambiente, ocasionando modificações estruturais específicas, favorecendo a adaptação das espécies às exigências do meio em que vivem. Por

essa razão muitas plantas desenvolveram substâncias tóxicas como defesa, contra animais predadores, bactérias, fungos e vírus (Ribeiro et al. 2003).

As plantas de um modo geral, constituem um verdadeiro laboratório natural, onde são sintetizadas substâncias que podem ter efeito tanto benéfico quanto maléfico para o organismo humano (Corrêa et al. 1999). Algumas substâncias que encerram um preparo popular podem conter ações sinérgicas que, quando tomadas isoladamente não produzem efeitos. Entretanto, essas mesmas ações sinérgicas podem produzir, ao longo do tempo, efeitos desconhecidos, que podem assumir uma natureza tóxica, como por exemplo: Pau D'arco (*tabebuia avellanedae*, Lor), Confrei (*Symphytum officinale*, L.), (Almeida, 1993). Assim sendo, a utilização de plantas desconhecidas do ponto de vista toxicológico, pode causar eventos mutacionais somáticos ou germinativos desencadeando doenças, ou desordens hereditárias múltiplas, em seres humanos (Corrêa et al. 1999). Portanto, várias espécies apresentam efeitos potencialmente tóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos (Eren et al. 2015).

Em contraste, algumas plantas contém substâncias inibidoras que interferem nas etapas dos eventos mutagênicos, apresentando efeitos moduladores da mutagênese (Waters et al. 1990). Embora evidências diretas sobre a origem mutacional das doenças somáticas humanas sejam limitadas, inferências obtidas a partir de resultados experimentais em vários organismos fornecem apoio consistente para a visão de que muitas doenças têm suas raízes nas mutações. Isto é particularmente verdadeiro para a relação entre mutação somática e câncer. A grande maioria dos carcinógenos iniciam sua atividade tumoral através de interações específicas com o DNA das células, levando a lesões genéticas permanentes que, geralmente, se expressam como mutações gênicas e/ou alterações cromossômicas. Por outro lado, a identificação de genes específicos envolvidos na indução do câncer – os proto-oncogênes – e sua ativação por alterações genéticas a nível de DNA vêm colaborar com a idéia da associação entre mutagênese e carcinogênese. (Ziljstra and Vogel, 1988). As pesquisas no campo da mutagênese, não somente servem como um meio de acesso para determinar o risco genético para as progênies, mas, também, como uma ferramenta para avaliar os riscos potências de desenvolvimento de tumores malignos nos indivíduos ou populações expostas a agentes genotóxicos químicos ou físicos (Würgler et al.1984).

De Flora e Ramel (1988), concluíram que a ocorrência de efeitos genotóxicos em células somáticas pode levar à iniciação do câncer. Mesmo assim, este passo é a expressão final de uma intrincada cadeia de complexos eventos mutacionais, envolvendo uma relação entre um determinado composto e sua distribuição e transporte para órgãos e tecidos, a penetração em células metabolizantes e/ou objetivas, o acesso para o núcleo, danos para a molécula de DNA e finalmente a fixação de danos genotóxicos. Todos estes estágios precedentes da iniciação, assim como os passos subseqüentes da carcinogênese, são afetados por fatores hospedeiros e são governados por um sistema entre forças opostas, tais como a ativação e detoxificação de produção metabólica, formação de derivados eletrofílicos e o bloqueio nucleofílico, espécies reativas de oxigênio e limpadores antioxidantes, danos causados na molécula do DNA e o processo de reparação. Portanto os inibidores da mutagenicidade e carcinogenicidade atuam de maneira oposta neutralizando ou modulando a complexa cascata de eventos envolvidos nos passos consecutivos, que levam formação de mutação e câncer. De acordo com Ehling et al. (1983), respostas para agentes carcinogênicos em qualquer estágio desta sequência de eventos pode resultar de algum fenômeno inicial, que ainda é uma questão aberta. Mesmo assim, parece ter pouca dúvida que a intercepção de agentes deletérios ou inibitórios, em vários estágios dos seus efeitos no organismo constituem fatores decisivos no desenvolvimento de condições patológicas.

A incidência de doenças genéticas pode ser reduzida pelo decréscimo nas taxas de mutação, uma das estratégias para a proteção das populações humanas seria, portanto, a identificação dos agentes mutagênicos, seguida da implementação de medidas de controle do risco genético, através da diminuição da exposição humana a estes agentes (De Flora, 1998). Assim, surge uma nova possibilidade para a proteção da saúde humana, que é a identificação e caracterização de substâncias naturais ou sintéticas que são capazes de modular os efeitos da mutagênese e são ditas antimutagênicas (Waters et al. 1990; Hartaman e Shankel, 1990). Estudos relatam que substâncias extraídas de frutas, vegetais e plantas contém compostos como os polifenóis, dentre outros, que apresentam um efeito protetor do organismo contra doenças (Kaur et al. 2015).

Os agentes antimutagênicos que atuam no processo de inibição da mutagênese estão agrupados em duas categorias que são os desmutagênicos e os bioantimutagênicos. De acordo com esta hipótese (Kada et al. 1982), os desmutagênicos bloqueiam substâncias mutagênicas, impedindo-as de atuarem no DNA, e os bioantimutagênicos por serem capazes de suprimir a mutação interferindo sobre o processo de reparação celular (Devi et al. 2015). A exposição das células-alvo aos moduladores pode tanto preceder, co-existir ou seguir à exposição ao agente mutagênico caracterizando respectivamente, o pré, co e pós-tratamento (Kada et al. 1982). Os possíveis mecanismos envolvidos na modulação da resposta mutagênica em sistemas bacterianos, permite a verificação no pré-tratamento, de reações intracelulares do modulador com o mutagênico ou interferência com mecanismos celulares que geram a sua genotoxicidade. No co-tratamento possibilita investigar as reações extracelulares do modulador com o mutagênico ou com componentes do sistema metabólico exógeno e no pós-tratamento os efeitos do modulador sobre os mecanismos de reparação envolvidos na eliminação das lesões pré-mutacionais induzidas pelo mutagênico no DNA das células-alvo (De Flora, 1998). Compostos antígenotóxicos e antimutagênicos podem ser usados como agentes quimiopreventivos contra o câncer. O efeito modulador de tais compostos pode ocorrer através de diferentes mecanismos, tais como a proteção das células contra danos oxidativos, a melhoria dos sistemas de reparação de DNA, ou interagir diretamente com o agente clastogênico impedindo-o de interagir com a molécula do DNA (Silva et al. 2014).

1.1 *Drosophila melanogaster* como organismo teste

Testes para a verificação da mutagênicidade de agentes físicos e químicos têm sido desenvolvidos em *D. melanogaster* pela capacidade de medir um amplo aspecto de danos genéticos induzidos em células germinativas e somáticas (Graf e Singer, 1992).

A *D. melanogaster*, eucarioto invertebrado, foi um dos primeiros animais a serem intensivamente estudados geneticamente. No Laboratório de T. H. Morgan nos Estados Unidos e em seguida com o redescobrimto dos Trabalhos de Mendel, a *Drosophila* foi reconhecida como animal experimental ideal para estudos genéticos devido seu reduzido tamanho: criação em grande número e de forma econômica e

fácil; tempo de geração curto (cerca de 10 dias, a 25°C e 60% de umidade); reduzido número de cromossomos ($2n=8$); cromossomos politênicos gigantes nas glândulas salivares, os quais são bastante favoráveis para análise, permitindo a construção de mapas cromossômicos detalhados, sendo estes um instrumento adicional para o estudo de mutações e devido sua capacidade de metabolização assemelhar-se à do Homem, diferenciando apenas pelo órgão envolvido (Graf e Singer, 1992). Nos seres humanos o fígado se encarrega, através de enzimas catalíticas, dos processos oxidativos de degradação, transformando as substâncias em compostos mais ou menos tóxicos ao indivíduo, os quais poderiam ter ou não capacidade mutagênica ou cancerígena. Em *Drosophila* não existe um órgão central de desintoxicação/ativação, ocorrendo tais atividades enzimáticas principalmente no corpo gorduroso, túbulos de Malpighi e várias partes do tubo digestivo (hepatopâncreas e cecos gástricos), que decompõem as substâncias filtrando a hemolinfa para remover as excreções (Ferreira e Terra, 1991).

D. melanogaster oferece vantagens e possibilidades especiais, uma vez que possui uma variedade de marcadores genéticos que permitem a criação de vários sistemas-testes capazes de detectar os mais variados tipos de eventos mutacionais como: mutações gênicas de efeitos deletérios; pequenas deleções que serão efetivamente transmitidas; pequenas duplicações que surgem provavelmente por instabilidade na replicação do DNA; rearranjos cromossômicos estruturais como inversões e translocações; não-disjunção, levando a aberrações cromossômicas numéricas e recombinação genética. Estes efeitos podem ser detectados em (i) tecidos gonadais – originando mutações que são transmitidas à progênie, ou (ii) em células somáticas – permitindo o prognóstico da formação de clones de células mutantes que se expressam como mosaicos nos indivíduos expostos a agentes mutagênicos. Adicionalmente, os resultados obtidos nas células somáticas podem fornecer evidências indiretas quanto ao potencial carcinogênico da substância analisada (Zijlstra and Vogel 1988).

Os testes de curta duração feitos com *D. melanogaster* envolvendo estudos de Genética Toxicológica, em células germinativas baseia-se na detecção de letal recessivo ligado ao sexo (SLRL) e na perda do cromossomo X em anel – RING-X-LOSS (RXL). O teste SLRL detecta danos genéticos transmissíveis que ocorrem nas células germinativas de um organismo eucarioto intacto, analisando-se

a segunda geração; esses danos podem ocorrer desde simples trocas de pares de bases do DNA até efeitos associados com aberrações cromossômicas (Zijlstra and Vogel 1988). Já o teste RXL oferece resultados em apenas uma geração, onde são fornecidas informações sobre efeitos clastogênicos, deleções e não-disjunções (Valencia et al. 1984).

Por outro lado, os testes rápidos em células somáticas de *D. melanogaster* têm-se tornado cada vez mais estabelecidos. O teste de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation and Recombination Test – SMART) de asa ou olho, baseia-se na detecção de manchas nos pêlos das asas ou omatídeos mutantes nos olhos dos adultos. O primeiro sistema de teste somático – SMART – foi desenvolvido para identificar danos genéticos no olho, usando marcadores hetero-alélicos *white (w)* e *white-coral (w^{co})* (Mollet e Würigler, 1974), sendo substituído por um teste mais eficiente *white/white* (Vogel e Zijlstra, 1988); o SMART de asa foi desenvolvido usando os marcadores celulares *multiple wing hair (mwh)* e *flare (flr)*, nas asas (Graf et al. 1984). Esses dois sistemas de testes têm sido bem validados, uma vez que, ambos permitem a detecção de recombinação mitótica e todos os outros tipos de eventos mutacionais que podem originar manchas mutantes como mutação de ponto, deleção, tipos específicos de aberrações cromossômicas e, possivelmente, conversão gênica. Um outro sistema de teste somático com *D. melanogaster* para a detecção de mutágenos ambientais usa uma mutação para o gene cor do olho (*wⁱ*)- teste da mancha do olho *white-ivory*. Este teste baseia-se na reversão de uma mutação *wⁱ* numa quadruplicação em tandem, que conduz à formação de clones com manchas tipo selvagem (*w⁺*) de omatídeos dos olhos de moscas adultas; essa reversão pode ocorrer por recombinação intracromossômica, recombinação intracromossômica parcial ou conversão gênica. Entretanto, esse teste não detecta mutações de ponto, pequenas deleções, perdas cromossômicas e não disjunções (Consuegra et al.1996), bem como, recombinações intercromossômicas (Ferreiro et al. 1995), distinguindo-o dos já bem estabelecidos SMART – asa e olho. Estudos realizados com SMART–olho demonstram que o teste *white-ivory (wⁱ)* não detecta compostos químicos que tenham uma alta recombinogenicidade como se pode observar no teste da mancha da asa de *D. melanogaster* (Graf e Würigler, 1996).

1.2 Testes bacterianos

Existem vários testes de detecção na avaliação da potencialidade mutagênica de compostos químicos. Estes testes, que podem ser realizados em diversos níveis celulares, tanto em procariotos como em eucariotos, foram desenvolvidos em decorrência do fator ético que limita a utilização da espécie humana em experimentos que possam oferecer riscos à saúde humana. Estes testes que podem ser de longa ou curta duração, envolvendo ou não exames citogenéticos, vieram contribuir, de forma valiosa, para amenizar as consequências desvantajosas da utilização de determinadas substâncias, fornecendo subsídios para deliberações quanto à conveniência de sua utilização (Varella-García, 1987).

Os testes a longo prazo, consistem basicamente na observação de animais por um período relativamente longo ou até, se possível, pela vida inteira, induzindo-se o desenvolvimento de neoplasias com uma ou várias doses de uma substância, testada através de protocolos apropriados. Tais testes requerem um planejamento cuidadoso, uma documentação e controle adequados dos animais, um alto padrão de análise patológica e, principalmente, uma análise estatística bastante imparcial, além desses requisitos, é um teste que tem o custo bastante elevado, além de que a ocorrência de neoplasias é muito demorada, exigindo freqüentemente vários anos, o que é incompatível com as necessidades da sociedade moderna (Bannasch et al. 1986).

Os testes rápidos foram desenvolvidos, para detectar alterações genéticas induzidas por diferentes substâncias e compostos químicos em microorganismos, células de mamíferos, culturas de tecido e em várias plantas e animais (Kilbey et al. 1984).

Embora existam divergências quanto à validade dos testes bacterianos em relação à carcinogenicidade das substâncias, tem se tornado claro que existe uma significativa correlação entre efeitos genotóxicos em bactérias, e indução de mutações e/ou neoplasias em mamíferos (Purchase, 1982).

Desde 1975, muitos “testes bacterianos a curto prazo” têm sido propostos. O desenvolvimento destes testes se deve principalmente ao avanço dos conhecimentos adquiridos com as respostas bacterianas aos agentes químicos e físicos que produzem lesões no DNA, bem como da natureza dessas, dos seus

processos de reparação assim como dos mecanismos da mutagênese e da regulação enzimática. Isto se completa com o progresso alcançado com o desenvolvimento de uma série de cepas bacterianas que permitem detectar diferentes tipos de lesões produzidas por esses agentes (Vennit et al. 1986).

Muitas substâncias carcinogênicas que tendem a causar câncer em ratos e em camundongos em múltiplos sítios, podem apresentar lesões no DNA, que são detectados em testes de genotoxicidade bacteriana (Ames, 1983). Conseqüentemente, testes bacterianos a curto prazo desempenham um papel importante na identificação de agentes genotóxicos e compostos carcinogênicos e podem fornecer subsídios para a regulação do uso desses compostos (Vennit et al. 1986).

1.3 Teste de perda do cromossomo X em anel (Ring-x-loss)

Bridges, (1916), propôs uma teoria sobre a não-disjunção cromossômica na hereditariedade. Anderson, (1925), apresentou dados sobre o processo de crossing-over em cromossomo X de *D. melanogaster*. Ambos os trabalhos, tiveram grande importância na genética de um modo geral. Posteriormente estas teorias, foram sendo aplicadas em técnicas específicas de protocolos experimentais. Muller, (1927), foi o primeiro a demonstrar que os efeitos mutagênicos do raio X, induzem letais recessivos no cromossomo X de *Drosophila*. A partir desta época, houve um interesse maior nas investigações sobre mutagenicidade com *Drosophila*.

O princípio básico do teste ring-x-loss foi apresentado por Morgan, (1933), em seu estudo sobre o cromossomo X em *D. melanogaster*, incluindo características sobre o cruzamento das moscas, das progênies obtidas, assim como o aspecto fenotípico herdado, e sobre as mutações que foram detectadas e incluídas em diferentes classes fenotípicas. Baurer, (1939), apresentou resultados sobre a dose dependente de raios X em mutações cromossômicas em cromossomo X em anel de *D. melanogaster*. Lewis e Bacher, (1968), demonstraram uma metodologia para alimentação de machos de *Drosophila melanogaster*, portadores desse cromossomo anelar. Estudos sobre marcadores genéticos de *Drosophila melanogaster* foram desenvolvidos por Lindsley e Grell, (1968). Em seus estudos sobre “testes de mutagenicidade - mutações cromossômicas em “*Drosophila melanogaster*”, Valência et al. (1984), descreveram sobre as classes fenotípicas utilizadas no teste ring-x-

loss. Para testar as hipóteses formuladas no teste ring-x-loss, foi proposto por Kastenbaum e Bowman, (1970), um método estatístico capaz de analisar essas mutações. Atualmente, tem sido utilizado em testes como o ring-x-loss, SMART-asa/olho o teste estatístico Qui-quadrado, proposto por Frei e Würigler, (1988).

O teste para detecção do cromossomo X em anel, é sensível a mutágenos físicos e químicos quando comparado ao cromossomo normal em bastão. Esse teste é de protocolo simples, uma vez que permite a detecção de efeitos clastogênicos em células germinativas pós-meióticas de machos ring-x tratados em apenas uma geração. Assim, esse teste fornece resultados de quebras cromossômicas que levam a efeitos do tipo perda do cromossomo X em anel, perda parcial do cromossomo Y, mosaicismo e não-disjunção (Cunha et al. 1992). Os machos caracterizam-se por possuir um cromossomo X em anel com marcadores para as mutações y (yellow - corpo com coloração amarela) e B (bar-olhos reduzidos em forma de barra) e um cromossomo Y com marcadores y+ (corpo com coloração cinza selvagem), localizado na posição curta e B^s (bar stone- olhos muito reduzidos em forma de barra), localizado na extremidade maior (possibilita detectar perdas parciais do cromossomo Y). As fêmeas (ywsn³) caracterizam-se por apresentarem, em seus cromossomos X, marcadores para as mutações y (yellow-corpo com coloração amarela), w (white- olhos redondos e com coloração branca e sn³ (singed-cerdas retorcidas). (Valencia et al. 1984; Zijlstra e Vogel, 1988). As constituições genóticas das linhagens marcadoras ring-x e fêmeas virgens ywsn³, são respectivamente, C1 (2) yB/ y+ YB^s e ywsn³ /ywsn³ (Lindsley e Grell, 1968; Lindsley e Zimm 1992).

O método de ninhadas é utilizado no teste RXL para discriminar a sensibilidade de células pós-meióticas, de machos ring-x tratados, e cruzados com fêmeas virgens ywsn³ em intervalos de 3 e 2 dias. Cada ninhada corresponde a uma fase do estágio da espermatogênese: ninhada 1: espermatozóide; ninhada 2: espermátides adultas; ninhada 3: espermátides jovens. Os resultados obtidos são avaliados de acordo com os critérios estabelecidos por 11 classes fenotípicas (Zijlstra & Vogel, 1988).

A revisão bibliográfica realizada por Valencia et al. (1984), relata 161 compostos químicos pertencentes a 47 classes distintas, que foram avaliados para

detectar possíveis efeitos clastogênicos em células germinais de modelos experimentais de *D. melanogaster*. Os autores observaram, uma co-relação entre estudos prévios sobre carcinogenicidade em mamíferos ou mutagenicidade em diferentes sistemas biológicos e a ocorrência de translocações herdáveis, perda de cromossomo X e não-disjunção induzidas em células germinativas de *D. melanogaster* de 90, 74 e 44%, respectivamente.

1.4 Teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (SMART)

As primeiras tentativas de realização do teste para atividade mutagênica com carcinógenos químicos ocorreram, a partir de 1940. Desde aquele tempo muitas substâncias químicas, incluindo carcinógenos e não-carcinógenos, foram testadas para mutagenicidade em *D. melanogaster*. Protocolos de teste com um padrão internacional foram desenvolvidos para o trabalho de rotina nas investigações (Graf et al. 1990). Os testes de mutagenicidade se encontram validados com um grande número de agentes químicos e misturas complexas (mais de 400), e estão bem adaptados para estudos de antimutagenicidade (Graf et al. 1998).

O teste SMART realizado com manchas de asas, permite medir um espectro de agentes genotóxicos que induz mutações em células somáticas de *D. melanogaster* (Würgler et al. 1984). Este teste é sensível a uma variedade de agentes mutagênicos com ação direta ou que requer bioativação (Graf, 1995). A indução da perda de heterozigose dos marcadores nas células dos discos imaginiais das larvas tratadas com compostos genotóxicos, conduz à formação de células mutantes que após o processo da metamorfose se expressam como manchas nas asas do corpo da mosca adulta (Spanó e Graf, 1998).

Utiliza-se para a realização do teste SMART-asa linhagens de *D. melanogaster* que são marcadores capazes de detectar mutações e recombinações somáticas em células de asas de acordo com o método desenvolvido por Graf et al. (1984). As três linhagens mutantes usadas são; 1- multiple wing hairs (*mwh*), que possui um gene mutante (*mwh*) no cromossomo nº3 (3-0,3) em condição homozigota, que corresponde a um mutante recessivo que determina que as células da asa apresentem três ou mais pêlos, no lugar de um, com a constituição cromossômica *y; mwh jv* (Graf et al. 1984, Graf et al. 1989).; 2- flare-3 (*flr³*), que possui um gene marcador recessivo em hemizigose (*flr³*) no cromossomo nº3 (3-

38,8), que afeta os pêlos das células da asa, modificando-os, conferindo uma aparência de chama (Guzmán-Rincón et al. 1994), com a constituição genética *flr³ In(3Lr)TM3, ri pp sep I(3)89Aabx^{34e} e Bd^s* (Graf et al. 1989). 3- linhagem ORR; flare- (ORR; *flr³*) que possui um gene marcador recessivo em hemizigose (*flr³*) no cromossomo nº3 (3-38,8), que afeta os pêlos das células das asas, modificando-os, parecendo uma chama, e um cromossomo 2, transferido de uma linhagem selvagem Oregon R (ORR), resistente ao DDT (Dapkus e Merrel, 1977), caracterizada por um aumento na atividade de enzimas do complexo citocromo P450 (Hällström, 1985; Guzmán-Rincón e Graf, 1995); com constituição genética ORR; *flr3/In(3LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx34e e Bd^s* (Graf et al. 1989).

Frölich e Würigler (1989), visando desenvolver uma linhagem de moscas capaz de ativar promutágenos, de uma forma mais eficiente, que dependem da ativação metabólica por enzimas do processo do citocromo P-450, construíram uma nova linhagem que carrega os cromossomos 1 e 2 de uma outra linhagem Oregon R (ORR) resistente ao DDT (Dapkus e Merrel, 1987). Portanto, esta nova linhagem ficou conhecida por possuir Alta Capacidade de Bioativação (“High Bioactivation – HB), o que permite a produção de altos níveis de citocromo P-450.

As linhagens “flare-3” e ORR; flare-3”, possuem o gene *flr³* que é letal em homozigose. Portanto, ambas linhagens possuem o gene *flr³* em hemizigose, sendo que o cromossomo homólogo, balanceador (TM3, Bd^s), apresenta inversões múltiplas (Graf et al. 1984).

Diversos tipos de agentes genotóxicos não reagem diretamente com os ácidos nucleicos *in vitro*, entretanto são transformados *in vivo* por processos metabólicos, que conferem a capacidade de se ligarem covalentemente ao DNA, RNA e proteínas. Muitas dessas transformações são realizadas pelas enzimas citocromo P450, cuja função geral é degradar compostos estranhos ao organismo (Blackburn e Gait, 1992). As substâncias antimutagênicas são capazes de reduzir a freqüência de mutações espontâneas ou induzidas. A dieta alimentar humana contém uma grande variedade de agentes mutagênicos e carcinogênicos assim como muitos agentes antimutagênicos e anticarcinogênicos naturais (Ames, 1983). Dessa maneira, os mecanismos pelos quais os extratos de plantas modulam os efeitos genotóxicos, indicam que certos compostos específicos, tais como o ácido

ascórbico e fibras vegetais, podem atuar de forma tão específica, agindo como agentes redutores, seqüestrando radicais livres ou mesmo se ligando ao mutágeno (Sarkar et al. 1996).

1.5 Teste de Ames

O teste de Ames foi desenvolvido por Bruce Ames e colaboradores na década de 70, na Universidade de Berkeley, California (Ames et al. 1975) e foi aperfeiçoado em 1983 por Maron e Ames.

Este ensaio tem por objetivo avaliar a capacidade de determinados compostos químicos ou misturas complexas induzirem mutações no genoma de linhagens de *S. typhimurium* através da reversão do fenótipo histidina negativo. (Maron e Ames, 1983).

As linhagens de *S. typhimurium* utilizadas neste teste, foram construídas especificamente para detectar produtos que podem induzir a mutações gênicas, causando deslocamento no quadro de leitura (frameshift) ou substituição de pares de base do DNA. As mutações que ocorrem além do operon da histidina, podem ainda ser do tipo *rfa*, *uvrB* e plasmídeos pkM101, que conferem maior sensibilidade na detecção de agentes genotóxicos (Maron e Ames, 1983).

O ensaio tem sido amplamente utilizado na identificação de substâncias mutagênicas, devido à sua simplicidade, sensibilidade, reprodutibilidade e versatilidade. Segundo o Environmental Mutagen Information Center Index (EMIC), USA, até o ano de 1982 já tinham sido testados mais de 5.000 produtos, na determinação da mutagenicidade de compostos químicos puros ou fracionados (Maron e Ames, 1983).

O método se baseia no uso de linhagens bacterianas de *S. typhimurium* previamente selecionadas para dependência ao aminoácido histidina e apresentando a mutação reversa quando colocado em contacto com agentes indutores que atuam ao nível do DNA bacteriano (Ames et al. 1975; Maron e Ames, 1983; Cariello e Piegorsch, 1996). Após um determinado período de incubação (48 horas a 37°C), as colônias revertentes das placas teste são contadas e comparadas com o número de revertentes das placas controle. Dada a composição do meio de cultura, só formarão colônias as células prototróficas em relação à histidina,

provenientes de mutações espontâneas ou originadas de mutações provocadas pela substância química ou amostra em teste. Controles positivos e negativos são sempre incluídos em cada ensaio. No presente trabalho, utilizou-se o teste de Ames (sem metabolização enzimática) com as cepas TA97a TA98 TA100 e TA102 de *S. typhimurium* (Maron e Ames, 1983).

O teste de Ames também permite a realização da triagem de poluentes ambientais, o monitoramento de populações humanas expostas a produtos de riscos químicos, a verificação de mutagenicidade em plantas medicinais e em produtos utilizados em quimioterapia (Rabelo-Gay et al. 1991).

Resultados positivos no teste de Ames, indicam que a substância em teste induz mutações de ponto por substituição de bases ou deslocamento no quadro de leitura no genoma desse microorganismo (Rabelo-Gay et al. 1991). Por outro lado, o teste de Ames tem sido amplamente empregado na identificação de substâncias moduladoras da mutagênese (Chen e Yen, 1997). O desenvolvimento de pesquisas na área de antimutagênese e anticarcinogênese foi direcionado, principalmente, para a detecção de fatores anti-risco presentes na dieta humana, empregando testes de curta duração *in vitro* e *in vivo*. As primeiras indicações sobre a atividade antimutagênica de diferentes substâncias foram obtidas em sistemas bacterianos (De Flora, 1998). Estudos recentes tem demonstrado que uma série de substâncias, encontradas em alimentos naturais, são capazes de modular efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos de vários tipos de agentes genotóxicos como o chá verde, que apresentou um efeito modulador contra a ação do agente indutor de nitrosação (Tanaka et al. 1998) e o extrato liofilizado da casca de romã, que apresentou um efeito antioxidante e antimutagênico contra a ação mutagênica da azida sódica na cepa TA 100 de *S. typhimurium* (Negi et al. 2003).

A planta medicinal *D. furfuracea* é amplamente utilizada pela população brasileira e ainda é desconhecida do ponto de vista mutagênico e/ou antimutagênico. Dessa maneira, é de fundamental importância avaliar a atividade mutagênica e antimutagênica da mesma.

1.6 *Duguetia furfuracea*

A planta *Duguetia furfuracea* (St. Hil.) Benth & Hook. f. (*Annonaceae*), é freqüentemente encontrada na região do Cerrado brasileiro principalmente no Brasil

Central, apresentando populações com vários indivíduos (Silva, 1998). O chá da raiz tem sido usado como calmante, antirreumático, no tratamento de dores nos rins e lombalgias. O chá da folha tem sido utilizado para combater afecções renais (Figura 1A).

A floração ocorre entre janeiro e junho, a frutificação de fevereiro a outubro. O fruto é consumido “*in natura*” (Silva, 1998). As características morfológicas de *D. furfuracea* são de um subarbusto de aproximadamente 1,70m de altura, que possui ramos jovens cilíndricos, recobertos por pêlos ferrugíneos, que exibem folhas simples, alternas, elíptico, lanceoladas e coreáceas, acuminadas no ápice e cuneadas na base, com cerca de 16 cm de comprimento e aproximadamente 5,5cm de largura, apresentando em ambas as faces, pêlos ferrugíneos escamosos. As flores são isoladas e apresentam uma coloração vermelho claro. Os pedicelos tem cerca de 2cm de comprimento, com pêlos escamosos em toda a sua superfície, enquanto seu cálice é constituído de três sépalas, livres, com pêlos ferrugíneos em ambas as faces. A corola é constituída de seis pétalas, livres, com manchas vermelhas evidentes na base de cada pétala, que apresenta em ambas as faces pêlos escamosos. Os estames são numerosos, laminares, apresentando coloração vermelho claro. O gineceu é apocarpico. Possui o fruto composto, com cerca de 8cm de comprimento, de cor verde, com pêlos escamosos distribuídos em toda a superfície. O sistema radicular é do tipo pivotante, muito profundo, com raízes secundárias partindo da principal mais ou menos em ângulo reto e mantendo-se paralelas à superfície em praticamente toda a sua extensão (de 8 a 12 metros). Estas raízes secundárias não apresentam raízes terciária (Cesar e Arens, 1969). As amostras para o presente trabalho foram coletadas na região de Paraúna – GO.

As anonáceas são consideradas plantas de variado aproveitamento e tradicionalmente usados na medicina popular, sendo seu fruto e sementes comestíveis. Suas finalidades terapêuticas abrangem: uso da polpa do fruto maduro como tônico e adstringente; das folhas como indutoras do fluxo menstrual, antisifilítico e antirreumático; das cascas como antidiarréico e do pó das sementes para o tratamento de ferimentos, picadas de cobra e pediculose (Cruz, 1979; Almeida et al. 1987).

A família *Annonaceae* pertence à classe *Magnoliopsida*, sub-classe *Magnoliidae* e ordem *Magnoliales*. Compreende cerca de 120 gêneros e mais de 2000 espécies. As plantas dessa família são formadas por árvores e arbustos tropicais e subtropicais e são conhecidas por produzirem diversos derivados alcalóidicos isoquinolínicos. A triagem de espécies vegetais dessa família é de grande importância uma vez que tem sido indentificadas substâncias com diferentes atividades biológicas, como por exemplo, citotóxica, antiplasmódica, antiprotozoária, antiparasitária, pesticida antimicrobiana, antifúngica antimalária, imunossupressora, antioxidante e antitumoral (Sousa et.al. 2000; Frana et al. 2000; Garcia, et al. 2000).

Agostini et al. (1995), na determinação da caracterização química da polpa do marolo, (*Annona coriacea*) (*Annonaceae*) encontraram taninos, vitamina A, e vitamina C. Os resultados obtidos, revelaram que o teor de vitamina C, foi eqüivalente aos encontrados em abacate, abacaxi e melancia, e os da vitamina A, eqüivalente aos encontrados em mamão, pêsego, goiaba e várias outras frutas tropicais.

Fechine, et al. (2000), verificaram pelo estudo fitoquímico da planta *Hornschuchia obliqua* (*Annonaceae*), a presença dos seguintes alcalóides: roemerina, guadiscina, liriodenina, cleistopholina e o alcalóide do tipo azantraquinona, já descritos na literatura, mas encontrados pela primeira vez nesse gênero.

Silva et al. (2000), avaliaram a atividade analgésica e antiinflamatória da *Annona glabra* (*Annonaceae*) em camundongos. Os resultados mostraram que os extratos estudados possuem atividade antinociceptiva de modulação periférica sem, no entanto apresentarem atividade antiinflamatória.

Frana et al. (2000), estudando sobre a família *Annonaceae* determinaram a atividade citotóxica do extrato de cascas de *Duguetia sp* em *Artemia salina*.

Siqueira et al., (1998) realizaram estudos fitoquímicos biomonitorado das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* (*Annonaceae*), onde testaram ensaios sobre toxicidade em *Artemia salina*. Assim, verificou-se que a toxicidade de alcalóides sobre esse organismo marinho possui uma boa correlação com atividade antitumoral.

Silva et al. (1998), realizaram estudos sobre os extratos de *Annona crassiflora* e *Hyptis ovalifolia* em isolados de *Cryptococcus neoformans* que é o fungo que causa a micose sistêmica, denominada criptococose que afeta sobretudo indivíduos imunocomprometidos (AIDS). Atualmente o tratamento da criptococose é limitado devido a toxicidade apresentada como efeito colateral. Os ensaios feitos com o extrato bruto etanólico das folhas de *A. crassiflora* e *H. ovaliflora* mostraram que a mistura dos extratos das referidas plantas (sobretudo a fração aquosa) possuem efetivo poder inibitório para a proliferação de *C. neoformans*.

Garcia et al. (2000), realizaram a triagem de extratos vegetais nas famílias *Combretaceae*, *Apocynaceae*, *Annonaceae* para a verificação da possível atividade antitumoral e isolamentos biomonitorado de substâncias ativas, no organismo *Artemia salina*. Os resultados encontrados, demonstraram que dentre as espécies testadas, a *Annona coriacea* apresentou maior toxicidade em *A. salina*. A substância acetogenina tetra-hidrofurânica, possivelmente a (+) - gigantecina, foi isolada das folhas de *A. coriacea* e mostrou-se ativa em células de carcinoma mamário humano.

Estudos realizados com a família *Annonaceae*, têm indicado a presença de outros constituintes com comprovada atividade biológica, como o cálcio, fósforo, ferro, carotenóides, vitamina B1 e B2 e vitamina C (Agostini et al. 1995; Almeida et al. 1987), além da classe das acetogeninas, que representa um grande interesse nos estudos fitoquímicos de *Annonaceae*, particularmente do gênero *Annona* (Santos et al. 1994).

Jolad et al. (1982), testaram o extrato etanólico das raízes de *Uvaria accuminata* e dele isolaram a primeira acetogenina de *Annonaceae*, uma substância que apresentou atividade citotóxica, antiparasitária e antitumoral no sistema PS (leucemia linfocítica em ratos) *in vivo*.

A grande maioria dessas acetogeninas apresentaram atividade antitumoral em testes *in vitro* e *in vivo* contra diferentes linhagens de células neoplásicas. Algumas delas são também efetivas na inativação de linhagens de células resistentes às drogas, e são relativamente não tóxicas às células tumorais humanas. Atividades antimetabólica, antimicrobiana e antimalárica também foram atribuídas às acetogeninas de *Annonaceae* (Oberlies et al. 1997; Sousa et al. 2000).

A possível ação antitumoral desta classe de acetogeninas, demonstrada experimentalmente, foi atribuída pelo impedimento da produção de ATP através da inibição da enzima oxi-redutase ubiquinona-NADH (Complexo I) do sistema transportador de elétrons mitocondrial (Londershausen, et al. 1991; Hollingworth et al. 1994; Pollo-Zafra et al. 1996) e da enzima oxidase ubiquinona-NADH de membranas plasmática de células tumorais (Morre, et al. 1995).

Santos et al. (1995), isolaram e determinaram a estrutura de uma nova acetogenina, a partir do extrato etanólico de sementes de *Annona crassiflora* Mart. que foi denominada de crassiflorina. Dessa maneira, crassiflorina, bulatanocina e cherimolina-2 são denominações diferentes para a mesma substância que foi isolada em três países diferentes: Brasil, Estados Unidos e França, a partir de espécies do gênero *Annona*, a saber *Annona crassiflora*, *Annona Bullata* e *Annona cherinolia* (Cortes et al. 1993). A crassiflorina, demonstrou, *in vitro*, significativa atividade contra linhagens de células tumorais humanas quando comparada com adriamicina, agente conhecido antineoplásico (Santos et al. 1995) A presença de atividade antitumoral da crassiflorina tem despertado um grande interesse por *Annona crassiflora* Mart. (Araticum) como uma possível fonte potencial de agente antineoplástico natural (Santos et al. 1994).

Estudos realizados com plantas da família *Annonaceae* vem demonstrar a importância da continuidade de investigações específicas sobre o extrato de várias espécies e sua aplicabilidade na medicina (Silva et al. 1998).

Nos últimos anos, vários tipos de testes tem sido aplicados para a avaliação de efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos de fitoterápicos (Varella-García, 1987).

O uso indiscriminado das plantas medicinais brasileiras pela população, tem despertado o interesse científico para o desenvolvimento de pesquisas sobre a verificação dos possíveis efeitos mutagênico e/ou antimutagênicos das mesmas (Chen-Chen e Sena, 2002). Portanto, o presente trabalho propôs investigar estes possíveis efeitos na planta medicinal *Duguetia furfuracea* pelo teste Ring-x-loss, que permite a detecção da possível atividade genotóxica em *D. melanogaster* por oferecer respostas de células germinativas a mutágenos obtidos pelo teste da perda do cromossomo X em anel (Cunha et al. 1992), ou pela atuação de mutágenos em

células somáticas pelo teste de mutação e recombinação somática (SMART-asa), Graf et al. (1984), bem como o teste de Ames, que permite medir a mutagenicidade da bactéria pelo número de células revertentes para a prototrofia de histidina (Maron e Ames, 1983).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar:

- A atividade genotóxica da planta *D. furfuracea* em células germinais de *D. melanogaster* com o teste da perda total do cromossomo X em anel (RXL);
- A atividade genotóxica e antigenotóxica de *D. furfuracea* em células somáticas *D. melanogaster* pelo teste de mutação e recombinação somática SMART-asa;
- A atividade mutagênica e antimutagênica de *D. furfuracea* pelo teste de AMES em cepas de *S. typhimurium* TA 97a, TA 98, TA 100 e TA 102.

3. EXPERIMENTO I

3.1 Teste para a detecção da perda do cromossomo X em anel

O teste ring-x-loss, é um teste de curta duração que permite avaliar a atividade mutagênica de compostos, pela indução de mutações gênicas e quebras cromossômicas em células germinais de *D. melanogaster*. A utilização de testes como o (RXL), em um único estágio da espermatogênese pode conduzir a resultados falsos negativos. Entretanto, quando se realiza este teste, utilizando a metodologia de ninhadas, que consiste no cruzamento sucessivo dos machos tratados, com novas fêmeas virgens a intervalos de 3, 2 ou 1 dia respectivamente, obtém-se células tratadas em diferentes estágios da espermatogênese, permitindo a separação de células sexuais progressivamente mais jovens ao tempo do tratamento, garantindo assim, a eficácia dos resultados obtidos (Zijlstra e Vogel, 1988).

3.2 Material e método

3.2.1 Linhagens de *D. melanogaster*

Utilizou-se machos da linhagem marcadora ring-x e fêmeas virgens $ywsn^3$, cujas constituições genótípicas são respectivamente, C1 (2) $yB/ y+ YB^S$ e $ywsn^3 /ywsn^3$ (Lindsley e Grell, 1968; Lindsley e Zimm, 1992).

3.2.2 Definição das doses de *Duguetia furfuracea*

Como o teste ring-x-loss visa analisar o efeito clastogênico de certos compostos químicos ou físicos, entre os descendentes de machos tratados (Zijlstra & Vogel, 1988), a curva de toxicidade da *D. furfuracea* permite estabelecer a sobrevivência em meio de cultura. Entretanto, existem certos compostos com elevada citotoxicidade, capazes de inibir totalmente as divisões celulares, por isso, no caso do teste ring-x-loss, é fundamental que a meiose continue seu curso após o tratamento dos machos. (Galloway et. al. 1994).

Concentrações altamente tóxicas conduzem a poucos descendentes, o que torna a análise estatística inviável. Dessa maneira, busca-se concentrações que permitem uma maior sobrevivência e, conseqüentemente, uma melhor análise estatística dos dados (maior número de descendentes), (Galloway et al. 1994).

Com o objetivo de definir as doses de *Duguetia furfuracea* que permitem uma sobrevivência em meio de cultura garantindo assim um bom número de indivíduos, realizou-se a curva de sobrevivência da seguinte maneira: inicialmente as folhas de *D. furfuracea* utilizadas no preparo das doses, foram previamente coletadas no campo (Figura,1A) e posteriormente submetidas ao processo de lavagem com água destilada e secagem em estufa à 45°C. As folhas secas foram preparadas em infusão por 20 minutos. As dosagens foram estabelecidas a partir dessa curva de sobrevivência, onde se elegeram as diluições com menor índice de mortalidade. Para a realização dessa curva, foram feitos três experimentos com machos da linhagem marcadora ring-x, com 2-3 dias de idade, que foram submetidos a um jejum por 4 horas. Após este período, as moscas foram transferidas para tubos de fundo chato, preparados com algodão (camada \pm 1.0 cm) e cobertos com papel filtro contendo 2 ml de diferentes diluições da solução mãe (17g de *D. furfuracea* em 100ml de água destilada por infusão). Foram colocados 10 indivíduos por tubo, perfazendo 10 repetições por tratamento. Para o controle negativo utilizou-se água destilada esterilizada. As moscas permaneceram neste tratamento (via ingestão), durante 24 horas. A partir dessa solução mãe foram realizadas diluições (75%, 50%, 25%, 20%, 12,5%, 10% e 8%) que foram testadas para se estabelecer uma curva de sobrevivência. Dentre os resultados obtidos, foram selecionadas 3 diluições por apresentarem em média os seguintes números de sobrevivência: 49% de sobreviventes para a dose de 50% da solução mãe; 65% de sobreviventes para a dose 25%; e 72% de sobreviventes para a dose de 8%. Portanto as diluições de 50%, 25% e 8% da solução mãe, passaram a ser as doses 1, 2 e 3 utilizadas nos capítulos I e II, dos experimentos com *D. melanogaster*. Desse modo, a dose-1 corresponde a uma diluição de 50% da solução mãe, ou seja, o equivalente a 0,085g/ml; a dose-2 corresponde à diluição de 25% da solução mãe, ou o equivalente a 0,042g/ml; e a dose-3 corresponde à diluição de 8% da solução mãe, equivalente à 0,014g/ml (Lewis e Bacher,1968 com modificações).

3.2.3 Controles

O composto uretano (etil carbamato; etil uretano; ácido ester carbâmico), $C_3H_7NO_2$ foi utilizado para o controle positivo por apresentar elevada toxicidade e ação carcinogênica (Choy et al. 1996).

Para o controle negativo utilizou-se água destilada esterilizada.

3.2.4 Meio de cultura

Para a manutenção do estoque foram utilizados frascos de 250ml contendo meio de cultura para *D. melanogaster* (820ml de água, 25g de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*), 11g de ágar, 156g de banana, 1g de nipagin (Graf et al. 1984).

3.2.5 Procedimento

Machos da linhagem marcadora ring-x, com 2-3 dias de idade, foram submetidos a um jejum por 4 horas. Em seguida foram tratados por ingestão, durante 24 horas, com 3 diferentes doses do chá por infusão da planta *D. furfuracea* (0,085g/ml; 0,042g/ml; 0,014g/ml). Para o controle positivo usou-se o uretano na concentração de 20mM e para controle negativo água destilada esterilizada. Foram distribuídos 2 ml de cada solução dos tratamentos por tubo de fundo chato, previamente preparados com algodão (camada \pm 1.0cm) em seguida, cobertos com papel filtro, para evitar aderência das moscas. Foram colocados 10 machos por tubo, perfazendo 20 repetições por tratamento. Decorrido o período de tratamento os machos foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio banana-ágar para os cruzamentos com fêmeas virgens não tratadas da linhagem marcadora ywsn³, com 2-3 dias de idade, na proporção de 1:1 por tubo, durante três dias, para a obtenção da primeira ninhada. Em seguida, as fêmeas foram descartadas e os machos foram transferidos e submetidos a outro cruzamento com novas fêmeas virgens ywsn³ por dois dias, obtendo-se assim a segunda ninhada. Novamente, as fêmeas foram descartadas e os machos transferidos e submetidos ao terceiro cruzamento por mais dois dias para a obtenção da terceira ninhada. Assim, foram obtidas 3 ninhadas que representam amostras homogêneas de células germinativas tratadas em diferentes estágios da espermatogênese. Os ensaios foram conduzidos à temperatura de aproximadamente 25° \pm 1°C e à umidade relativa de mais ou menos 60% (Lewis e Bacher, 1968). O experimento foi realizado com três repetições.

3.2.6 Análise da geração F1

Após dez dias do cruzamento de machos ring-x tratados com fêmeas virgens ywsn³ nas condições laboratoriais descritas, obteve-se o início da

emergência da geração F1 de *D. melanogaster* que foi analisada, observando-se os fenótipos encontrados. Os indivíduos desta progênie foram agrupados em 11 classes fenotípicas, sendo que as classes 1 e 2 correspondem aos descendentes normalmente esperados (não-mutantes); e as demais às classes mutantes de 3 a 11. (Valencia et al. 1984; Zijlstra e Vogel, 1988).

A geração F1 proveniente do cruzamento de machos ring-x tratados com fêmeas virgens yw^{sn^3} , foi analisada de acordo com os critérios agrupados em 11 classes fenotípicas, sendo a Classe 1: fêmea (X_p/X_m) - olho vermelho e reniforme, corpo amarelo e cerdas normais (Figura 1B,a). Classe 2: macho ($X_m/y+YB^s$) - olho branco e em barra corpo selvagem e cerdas retorcidas (Figura 1B,a). Classe 3: macho ($X_m/0$) - perda total do cromossomo X em anel: olho branco e redondo (normal), corpo amarelo e cerdas retorcidas (Figura 1B,b). Classe 4: mosaico ($X_m/0-X_m/X_p$) - perda total do cromossomo X em anel na porção masculina: lado masculino: olho branco e redondo, corpo amarelo e cerdas retorcidas e lado feminino: olho vermelho e reniforme, corpo amarelo e cerdas normais (Figura 1C,a). Classe 5: fêmea ($X_m/X_p/y+YB^s$) - não-disjunção no macho, olho vermelho e em barra, corpo selvagem e cerdas retorcidas. Classe 6: macho ($X_m/y+Y$) - perda parcial do cromossomo Y, olho branco e redondo, corpo selvagem e cerdas retorcidas (Figura 1C,b). Classe 7: macho (X_m/YB^s) - perda do cromossomo Y olho branco e em barra, corpo amarelo e cerdas retorcidas. Classe 8: mosaico ($X_m/y+YB^s-X_m/YB^s$) - perda parcial do cromossomo Y, na extremidade curta; lado A: olho branco e em barra, corpo selvagem e cerdas retorcidas e lado B: olho branco e em barra corpo amarelo e cerdas retorcidas. Classe 9: fêmea ($X_m/X_{my}+YB^s$) - não disjunção na fêmea, olho branco e em barra, corpo selvagem e cerdas retorcidas. Classe 10: fêmea (X_m/X_m) - não-disjunção na fêmea, olho branco e redondo, corpo amarelo e cerdas retorcidas. Classe 11: macho (X_p/o) - não-disjunção na fêmea, olho vermelho e reniforme (Fig.2F), corpo amarelo e cerdas normais (Valencia et al. 1984; Zijlstra e Vogel, 1988).

Os dados obtidos pela soma dos três experimentos independentes, foram comparados por qui-quadrado. A frequência de perda completa do cromossomo X em anel foi calculada pela somatória entre os indivíduos pertencentes à classe 3 ($X_m/0$) e os indivíduos da classe 4 - mosaico - ($X_m/0-X_m/X_p$) dividida pela somatória dos indivíduos pertencentes às classes: 1(X_p/X_m); 3 ($X_m/0$); 4 ($X_m/0-X_m/X_p$); 5

($X_m/X_p/y+YB^s$) e 11 (X_p/o) de cada experimento, e o resultado, foi obtido pela média dos três experimentos (Zijlstra and Vogel, 1988; Frei & Würigler 1988).

3.2.7 Análise estatística

A análise estatística para o experimento ring-x-loss foi realizada considerando-se duas hipóteses simultaneamente: H_0 : hipótese nula e H_a ; hipótese alternativa, que permitem classificar os resultados como: positivo, negativo, fracopositivo ou inconclusivo. (Quadro 1A). Comparou-se os valores de X^2 encontrado com o X^2 , unilateral = 2.706 e com 0.05 (1GL), podendo-se aceitar ou não H_0 , dependendo do resultado (Frei & Würigler 1988).

3.3 Resultados e discussão

O presente trabalho avaliou a possível atividade clastogênica da planta medicinal *D. furfuracea* em células germinativas de *D. melanogaster* pelo teste ring-x-loss.

Foram realizados três experimentos independentes, cada um composto por três ninhadas que representam diferentes etapas da espermatogênese. As ninhadas 1, 2 e 3 representam células tratadas nas fases de espermatozóides, espermátides adultas e espermátides jovens, respectivamente. Essa é uma técnica que permite detectar efeitos genéticos em células germinativas pós-meióticas adultas e mais jovens, refletindo sua sensibilidade ao composto (Sankaranarayanan e Sobels, 1976; Wijen et al. 2001).

A utilização da metodologia de ninhadas, associada ao tratamento via ingestão nos machos ring-x-loss, possibilitou sugerir que a ausência de efeito genotóxico de *D. furfuracea* ocorreu tanto em células germinais masculinas proficientes em enzimas envolvidas na ativação metabólica; como é o caso de espermátocito e espermatozóide – quanto em células enzimaticamente inativas no que se refere à metabolização – os espermatozóides. De acordo com Sankaranarayanan e Sobels (1976), os espermatozóides maduros de *D. melanogaster* não possuem a maquinaria bioquímica necessária para restaurar as lesões pré-mutacionais ou convertê-las em mutações. As enzimas comprometidas com o metabolismo do DNA são controladas pelo genótipo materno, estando presentes no citoplasma dos oócitos no momento da fertilização. Dessa maneira, a

reparação das lesões espontâneas ou induzidas nos espermatozóides é realizada por mecanismos presentes nos oócitos – caracterizando o chamado reparo materno (Graf et al. 1979 e Frei, 1982).

O uretano, utilizado como controle positivo é um agente genotóxico formador de adutos de DNA, provenientes de sua transformação metabólica em vinilcarbamato seguida de epoxidação a N-hidroxietil carbamato, visto que, na sua forma original (etil-carbamato), não contém estruturas ativas (Gupta e Dani 1989). O uretano tem sido utilizado como agente genotóxico em testes somáticos – SMART: asa e olho (Frölich e Würigler, 1990; Graf e Van Schaik, 1992; Vogel e Nivard, 1993; Abraham e Graf, 1996), bem como em células germinativas dos testes SLRL (Fouremant et al. 1994) e RXL (Leigh, 1976) de *D. melanogaster*.

A tabela 1A, apresenta os resultados obtidos nas três repetições dos experimentos da avaliação da atividade mutagênica pelo teste ring-x-loss, com a frequência de perda completa do cromossomo X em anel, perda parcial do cromossomo Y, mosaicismos e não disjunção em células germinativas de machos adultos de *D. melanogaster* tratados com *D. furfuracea*.

Pela repetição I, pode-se observar que os descendentes de *D. melanogaster* provenientes de machos da linhagem marcadora ring-x tratados com *D. furfuracea* nas doses 0,085g/ml, 0,042g/ml e 0,014g/ml, cruzados com fêmeas virgens ywsn³, não apresentaram um aumento de perda completa do cromossomo X em anel, perda parcial do cromossomo Y, mosaicismos e não disjunção, estatisticamente significativos ($P > 0,05$) para as ninhadas 1, 2 e 3, quando comparados por qui-quadrado com o controle negativo.

As frequências de perda completa do cromossomo X em anel, perda parcial do cromossomo Y, mosaicismos e não disjunção, observadas na repetição II, com os descendentes do cruzamento de machos ring-x tratados com *D. furfuracea* (0,085g/ml, 0,042g/ml e 0,014g/ml) e fêmeas virgens ywsn³, não apresentaram aumento estatisticamente significativo ($P > 0,05$) nas diferentes ninhadas, quando comparadas por qui-quadrado com o controle negativo.

Pela repetição III, observou-se que os descendentes de machos ring-x tratados com *D. furfuracea* nas doses 0,085g/ml, 0,042g/ml e 0,014g/ml e cruzados com fêmeas virgens ywsn³, não apresentaram aumento estatisticamente significativo

($P > 0,05$) para as 3 ninhadas, quando comparados por qui-quadrado com o controle negativo.

O controle positivo (Uretano 20mM) apresentou nas repetições I, II e III, perda completa do cromossomo X em anel, perda parcial do cromossomo Y, mosaicismo e não disjunção, entre os descendentes do cruzamento de machos ring-x tratados e cruzados com fêmeas virgens ywsn³. Pelos resultados obtidos, verificou-se que houve um aumento estatisticamente significativo ($P > 0,05$) para as ninhadas 1, 2 e 3 quando comparados com o controle negativo, pelo teste de qui-quadrado.

Pela tabela 1A, pôde-se observar que as ninhadas 1, 2 e 3 tratadas com uretano (20mm), apresentaram resultados positivos para as classes 1 (Xp/Xm) fêmeas regulares; classe 2 (Xm/y+ YB^s) machos regulares; classe 3 (Xm/0) perda completa do cromossomo X em anel; classe 4 (Xm/0-Xm/Xp) mosaico; classes 6, 7 e 8 (Xm/y+Y; Xm/YB^s ; Xm/y+YB^s-Xm/YB^s) perda parcial do cromossomo Y. Com base nos dados das classes 5, 9, 10 e 11 (Xm/Xp/y+YB^s ; Xm/Xmy+YB^s; Xm/Xm e Xp/o), verificou-se que a porcentagem de perda do cromossomo X em anel para a ninhada 1 foi de 6.42% (± 0.79); para a ninhada 2 de 7.40% (± 1.10); para a ninhada 3 de 6.43% (± 0.50).

Pelos dados obtidos das ninhadas 1, 2 e 3, tratadas com água destilada esterilizada (controle negativo), observou-se que para a classe 1 (Xp/Xm) fêmeas regulares; classe 2 (Xm/y+ YB^s) machos regulares; classe 3 (Xm/0) perda completa do cromossomo X em anel; classe 4 (Xm/0-Xm/Xp) mosaico; classes 6, 7 e 8 (Xm/y+Y; Xm/YB^s ; Xm/y+YB^s-Xm/YB^s) perda parcial do cromossomo Y ; classes 5, 9, 10 e 11 (Xm/Xp/y+YB^s ; Xm/Xmy+YB^s; Xm/Xm e Xp/o), o resultado foi negativo. A porcentagem de perda do cromossomo X em anel para a ninhada 1 foi de 1.12% (± 0.14); para a ninhada 2; 1.33% (± 0.39); e para a ninhada 3 de 1.21% (± 0.11).

Os resultados alcançados nas ninhadas 1, 2 e 3 tratadas com a dose-1 (0.085g/ml), foram negativos para as classes 1 (Xp/Xm) fêmeas regulares; classe 2 (Xm/y+ YB^s) machos regulares; classe 3 (Xm/0) perda completa do cromossomo X em anel; classe 4 (Xm/0-Xm/Xp) mosaico; classes 6, 7 e 8 (Xm/y+Y; Xm/YB^s ; Xm/y+YB^s-Xm/YB^s) perda parcial do cromossomo Y ; classes 5, 9, 10 e 11 (Xm/Xp/y+YB^s ; Xm/Xmy+YB^s; Xm/Xm e Xp/o) não-disjunção. Os resultados obtidos com a dose 0,085g/ml na ninhada 1, apresentaram uma média de perda completa

do cromossomo X em anel de 1.38% (± 0.06). Observou-se entretanto, que esta dose não levou a um aumento estatístico significativo em relação ao controle negativo que nesta ninhada apresentou uma média de 1.12% (± 0.14). Para a ninhada 2 a média média foi de 1.15% (± 0.03), este valor assemelha-se com o valor do controle negativo da ninhada 1 que apresentou uma média de 1.12% (± 0.14). Para a ninhada 3, a média de 1.18% (± 0.11), um valor próximo do controle negativo que nesta ninhada foi de 1.21% (± 0.11).

Pôde-se observar pelos dados obtidos das ninhadas 1, 2 e 3 tratadas com a dose 0.042g/ml, que para as classes 1 (Xp/Xm) fêmeas regulares; classe 2 ($Xm/y+YB^s$) machos regulares; classe 3 ($Xm/0$) perda completa do cromossomo X em anel; classe 4 ($Xm/0-Xm/Xp$) mosaico; classes 6, 7 e 8 ($Xm/y+Y$; Xm/YB^s ; $Xm/y+YB^s-Xm/YB^s$) perda parcial do cromossomo Y; classes 5, 9, 10 e 11 ($Xm/Xp/y+YB^s$; $Xm/Xmy+YB^s$; Xm/Xm e Xp/o) não-disjunção, os resultados foram negativos, apresentando na ninhada 1, uma média de 1.17% (± 0.11); este valor está bem próximo do controle negativo que nesta ninhada apresentou uma média de 1.12% (± 0.14) e que na ninhada 3 apresentou uma média de 1.21% (± 0.11). O tratamento com esta mesma dose apresentou na ninhada 2 uma média de 1.22% (± 0.12), ou seja, um valor bem próximo do controle negativo da ninhada 3, que apresentou uma média de 1.21% (± 0.11). A ninhada 3 apresentou para esta dose, uma média de 1.18% (± 0.11), valor semelhante ao controle negativo desta ninhada que foi de 1.21% (± 0.11).

Observou-se que as ninhadas 1, 2 e 3 tratadas com a dose-3 (0.014g/ml), apresentaram um resultado negativo para as classes 1 (Xp/Xm) fêmeas regulares; classe 2 ($Xm/y+YB^s$) machos regulares; classe 3 ($Xm/0$) perda completa do cromossomo X em anel; classe 4 ($Xm/0-Xm/Xp$) mosaico; classes 6, 7 e 8 ($Xm/y+Y$; Xm/YB^s ; $Xm/y+YB^s-Xm/YB^s$) perda parcial do cromossomo Y; classes 5, 9, 10 e 11 ($Xm/Xp/y+YB^s$; $Xm/Xmy+YB^s$; Xm/Xm e Xp/o) não-disjunção. A ninhada 1, apresentou uma média de 1.17% (± 0.15). Pôde-se observar, que esta dose não induziu a um aumento estatístico significativo em relação ao controle negativo, que nesta ninhada apresentou uma média de 1.12% (± 0.14). Na ninhada 2, esta dose apresentou uma média de 1.14% (± 0.16), sendo um valor próximo do controle negativo da ninhada 1, que apresentou uma média de 1.12% (± 0.14). Esta dose

pode ser correlacionada também com o valor do controle negativo da ninhada 3, que apresentou uma média de 1.21% (± 0.11).

Nunes e Carvalho, (2003) relataram que a perda completa de cromossomo X em anel (classe 3) pode estar relacionada com eventos do tipo quebras cromossômicas (Leigh, 1976; Vogel e Natarajan, 1979). Entretanto, algumas evidências experimentais indicam que a ocorrência de trocas entre cromátides irmãs pode ser um mecanismo alternativo que conduz à perda completa de cromossomo X em anel (Würgler e Graf, 1980). Conseqüentemente, a perda completa de cromossomo X em anel pode refletir dois tipos de fenômenos relacionados tanto com quebras cromossômicas simples ou duplas, quanto com trocas de cromátides irmãs (Valencia et al. 1984). O mosaicismos verificado nas classes 4 e 8, pode ser causado por perda do cromossomo X durante a divisão, mesmo o mosaicismos pode também ser produzido por crossing-over (Leigh, 1976, Zijstra e Vogel, 1988). A perda parcial do cromossomo Y (classes 6 e 7) pode ser devido à perda dos marcadores para as partes curtas e longas deste cromossomo. Neste caso a maioria das perdas parciais dos cromossomos ocorreram devido a quebras cromossômicas. Tais eventos, são relativamente raros no cromossomos Y em comparação com o cromossomo X em anel. A perda dos *B* marcadores situados na parte longa do Y cromossomo está relacionada ao resultado da quebra do cromossomo, enquanto que a perda da parte curta *y+* do marcador pode resultar em deleções ou mutações de ponto. Valencia et al. (1984), analisando o teste ring-x-loss, propuseram que os resultados da não-disjunção verificada nas classes 5,9,10 e 11, ocorreram devido a perda ou ganho de cromossomos inteiros em função da interferência causada pelo composto testado. O presente estudo, mostrou uma correlação com a literatura acima citada, devido à ocorrência de mutações espontâneas no controle negativo, assim como das mutações induzidas por *D. furfuracea* (valor próximo das mutações espontâneas), e no controle positivo, por apresentar indução da atividade mutagênica nas classes analisadas.

Pelos resultados obtidos (Tabela 1A), pôde-se observar que o controle positivo apresentou uma alta freqüência de perda do cromossomo X anel, oscilando entre 6.42% (± 0.79) a 7.40% (± 1.10). De acordo com a literatura, verificou-se que o uretano atuou apresentando uma ação genotóxica nas células germinativas de todas as ninhadas analisadas (Fouremant et al. 1994).

Observou-se pelos resultados do controle negativo, que a frequência de perda espontânea do cromossomo X em anel, variou entre 1.12% (± 0.14) a 1.33% (± 0.39). Estes resultados encontram-se de acordo com Wijen *et al.*, (2001), que em seus experimentos com células germinativas, demonstraram uma frequência de mutação espontânea média de 2.0%. Segundo Leigh *et al.* (1976), as variações entre as frequências de perda espontânea podem ser devidas às influências de fatores nutricionais bem como às idades materna e paterna.

Abrahan e Kesavan (1998), na Índia, estudaram com *Drosophila* a possível genotoxicidade de alguns condimentos e especiarias usados como constituintes da dieta, como o gengibre, o cravo da Índia, a canela e outros, obtidos como extratos aquosos a quente, e administrados isolados ou em combinação com cafeína ou teofilina, via teste de “Perda do Cromossomo X em Anel” e teste do “Recessivo Letal Ligado ao Sexo”. Os resultados mostraram que, quando ministrados isolados, nenhum destes compostos induziu um aumento significativo de frequência de perdas do cromossomo X em anel e/ou de mutações ligadas ao sexo.

Graf e Würgler (1986), investigaram a genotoxicidade do café instantâneo e do café congelado a seco preparado em casa, através de ensaios de mutagenicidade em células germinativas de *D. melanogaster*, dentre eles, o teste de “Perda do cromossomo sexual”, sendo que nenhum efeito genotóxico pôde ser detectado nos ensaios.

Cunha *et al.* (1992) estudando o potencial mutagênico do ácido tânico, em células germinais de *Drosophila melanogaster*, via testes da “Perda do Cromossomo X em Anel” (“Ring-Loss”) e do “Letal Recessivo Ligado ao Sexo (SLRL), concluíram que o mesmo não possui atividade mutagênica e/ou clastogênica.

Guerra (1994), com o teste ring-x-loss, analisou a possível ação genotóxica da planta medicinal boldo (*Vernonia condensata*), deduzindo que as perdas totais ou parciais e não-disjunção em células pós-meióticas de *D. melanogaster*, não foram significativas.

Pereira (1999), desenvolvendo o teste ring-x-loss para verificar sobre o possível efeito genotóxico da planta (*Hiptidendron canun*) observou que a mesma não exerceu atividade clastogênica no que se refere à perda total do cromossomo X

em anel, mosaicismos, perda parcial do cromossomo Y e não-disjunção em células germinais de *D. melanogaster*.

Nunes e Carvalho (2003), avaliaram o potencial mutagênico da planta algodãozinho-do-campo (*Cochlospermum regium*), em células germinais de *D. melanogaster*, através do teste ring-x-loss, obtendo com a dose 0,013g/ml na ninhada 3, um valor de perda do cromossomo x em anel de 1.13%. Este valor está próximo ao valor encontrado com *D. furfuracea* na dose 0,085g/ml, na ninhada 2, que apresentou uma perda de cromossomo x em anel de 1.15 % (± 0.03).

Os resultados alcançados com *D. furfuracea* pelo teste ring-x-loss, podem ser correlacionados com o trabalho de Souza et al. (2003), quando investigaram sobre o efeito de (*Stryphnodendron adstringens*), em células germinativas de *D. melanogaster* e encontraram com a dose 66% do extrato dessa planta, o valor de 1.37% de perda completa do cromossomo X em anel para a ninhada 3; ou seja, um valor bem próximo ao que foi encontrado com *D. furfuracea* na dose 0,085g/ml, que na ninhada 1 foi de 1.38% (± 0.06). Foi verificado uma semelhança em relação ao controle negativo, que para *S. adstringens* foi de 1.82% para a ninhada 2 e para *D. furfuracea* na ninhada 3, este valor foi de 1.21% (± 0.11). O controle positivo utilizado em ambos os trabalhos foi o uretano (20mM) e para o teste com *S. adstringens* a perda completa do cromossomo X em anel para a ninhada 1 foi de 4.58%; para a ninhada 2 de 7.71%; para a ninhada 3 de 7.52%. No presente trabalho, o controle positivo apresentou um resultado semelhante sendo 6.42% (± 0.79) na ninhada 1; 7.40% (± 1.10) na ninhada 2 e de 6.43% (± 0.50) na ninhada 3. Dessa maneira, foi possível constatar que os resultados obtidos com *D. furfuracea* estão de acordo com a literatura.

Resultados contrários ao presente trabalho foram encontrados por Pinho et al. (2014), na avaliação do potencial de toxicidade hidroalcoólica em extratos de folhas de *D. furfuracea* (HEDF) em um modelo de *Drosophila melanogaster*. A toxicidade foi avaliada como variação de desempenho locomotor, atividade mitocondrial, estresse oxidativo, MAPKs fosforilação, e indução de apoptose após exposição às concentrações HEDF (1-50 mg / mL) durante 7 dias. Os resultados obtidos sugerem o estresse oxidativo como um importante mecanismo subjacente à sua toxicidade.

Silva et al (2012), avaliaram a genotoxicidade e citotoxicidade do extrato liofilizado de folhas de *Duguetia furfuracea* utilizando os testes de indução profago λ (SOS-Induteste) e do micronúcleo em medula óssea de camundongos. Os resultados mostraram que *D. furfuracea* não apresentou um aumento na indução do profago λ ($P>0,05$) no Induteste-SOS e também não foi observado aumento do número de eritrócitos policromáticos micronucleados ($P>0,05$), no Teste do Micronúcleo, sugerindo ausência de genotoxicidade em ambos os testes. Por outro lado, uma diminuição significativa no número de bactérias, ($P<0,05$), bem como uma diminuição significativa na relação entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos, ($P<0,05$), foram observadas, mostrando ação citotóxica do extrato liofilizado de folhas de *D. furfuracea*. Assim, esta planta não apresentou ação genotóxica, mas mostrou um efeito citotóxico em ambos os testes utilizados.

Diante dos resultados apresentados, foi possível verificar que *D. furfuracea* não induziu um aumento significativo das freqüências de aberrações cromossômicas, não-disjunção ou mosaicismo em células germinais de *D. melanogaster* pelo teste ring-x-loss.

4. EXPERIMENTO II

4.1 Teste para detecção de mutações e recombinações somáticas (SMART)

O teste SMART-asa é baseado na indução de manchas mutantes (clones) que surgem a partir da perda da heteroziguidade de células em desenvolvimento, as quais são heterozigotas para um gene recessivo marcador, presente nas células das asas de *D. melanogaster* (Frei e Würigler, 1995).

No teste de mancha utiliza-se dois tipos de cruzamentos para gerar populações de larvas experimentais: o padrão (ST) e o de alta bioativação (HB) que é caracterizado por um aumento na atividade de enzimas P450. Ambos os cruzamentos produzem dois tipos de progênie: (i) marcador-heterozigoto, onde as manchas podem ser devido a recombinação mitótica e outros eventos mutacionais; (ii) balanceador-heterozigoto, que detecta apenas eventos mutacionais, eliminando todos os eventos recombinacionais devido a inversão múltipla do balanceador TM3 (Spanó et al. 2001).

A realização desse ensaio teve por finalidade verificar a possível presença da atividade genotóxica e/ou antigenotóxica de *D. furfuracea* em células somáticas de *D. melanogaster*. Utilizou-se para a detecção de mutação e recombinação somática, linhagens de *D. melanogaster* portadoras de marcadores específicos localizados no cromossomo 3.

4.2 Material e Método

4.2.1 Cruzamentos entre as linhagens mutantes

O cruzamento entre as linhagens *mwh/mwh* e *flr³/TM3, Bd^s* (Figura 2A), produz dois tipos de descendentes: os marcadores trans-heterozigotos (MH: *mwh + / + flr³*) que apresentam asas fenotipicamente selvagens; e o balanceador heterozigoto (BH: *mwh + / TM3, Bd^s*) que apresenta asas do tipo serrilhada (Graf et al. 1984). Para a realização do cruzamento padrão (ST – “Standard Cross”), utilizou-se fêmeas virgens *flr3 /In(3LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx34e e Bd^s* que foram cruzadas com machos *mwh/mwh* (Graf et al. 1989). Para a realização do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB – “High Bioactivation Cross”), utilizou-se fêmeas virgens ORR; *flr3/In(3LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx34e e Bd^s* que

foram cruzadas com machos *mwh/mwh* (Graf e Van Schaick,1992). As linhagens foram mantidas em frascos contendo meio de cultura sintético para *D. melanogaster*.

4.2.2 Definição das doses de *Duguetia furfuracea*

As doses de *D. furfuracea* usadas neste experimento foram as mesmas descritas no experimento I (item 3.2.2.).

4.2.3 Controles

Os controles usados neste experimento foram os mesmos descritos no experimento I (item 3.3.3.).

4.2.4 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para a manutenção do estoque de *D. melanogaster* neste experimento, encontra-se descrito no experimento I (item 3.2.4.).

Para a manutenção das larvas de terceiro estágio até a eclosão dos adultos, utilizou-se o meio de cultura instantâneo (Fórmula 4-24 Carolina Biological Supply Company, Burlington, North Carolina), (Graf et al. 1984).

4.2.5 Procedimento

O procedimento experimental foi realizado para os dois tipos de cruzamentos (ST e HB) com machos da linhagem marcadora *mwh*, com 2-3 dias de vida, que foram cruzados com fêmeas virgens *flr³* ou *ORR; flr³*, com 1-2 dias de vida, em meio de cultura padrão por 8 horas, na proporção de um macho para duas fêmeas. Decorrido o período do cruzamento, os casais foram transferidos para frascos (250ml) contendo meio de ovoposição, onde permaneceram por 8 horas. Após este intervalo os adultos foram descartados. Aproximadamente 72±4h após o início da ovoposição, foram coletadas larvas de terceiro estágio, por flotação em água destilada. Para o teste de mutagenicidade foram distribuídas cerca de 50 larvas em cada tubo de fundo chato contendo 1,5g de meio sintético e adicionados 5ml das diferentes doses da planta *D. furfuracea* (0,085g/ml; 0,042g/ml; e 0,014g/ml). Para o co-tratamento (Figura 2B), utilizou-se as mesmas dosagens acrescidas de uretano a 20mM. Para o controle negativo utilizou-se água destilada e para o controle positivo uretano 20mM. As larvas submetidas ao tratamento crônico, via co-tratamento, permaneceram por um período de aproximadamente 48 horas, até alcançarem o estágio de pupa. Os adultos foram estocados em etanol a 70%. Os

experimentos foram desenvolvidos à temperatura de aproximadamente $25^{\circ} \pm ^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 60%. Os experimentos foram realizados com três repetições (Graf et al. 1984; Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

4.2.6 Preparo de asas

As asas dos imagos foram retiradas do corpo, com o auxílio de um bisturi e uma pinça de ponta fina, estendidas e fixadas sobre a superfície de lâminas secas com solução de Faure (30g de goma arábica, 20ml de glicerol, 1,5g de hidrato de cloral, e 50ml de água destilada). Foram dispostas 10 asas provenientes de fêmeas e 10 de machos em cada lâmina, permanecendo na estufa a 40°C , por 24 horas. Após este período, colocou-se uma lamínula com uma gota de solução de Faure. A lâmina com a lamínula permaneceram por mais 24 horas na estufa a 40°C , sendo pressionadas por cubos de metal de 400g, para dar mais aderência das asas à lâmina, bem como evitar bolhas de ar na superfície da lâmina (Graf et al. 1984).

4.2.7 Análise de lâminas

As asas foram analisadas em suas superfícies dorsal e ventral em microscópio ótico de luz (objetiva 400X). Para a detecção de manchas, considerou-se os tricomas presentes nas asas, onde cada um representa uma célula. As manchas foram classificadas de acordo o tamanho, a posição em que foram detectadas na asa e os tipos encontrados que podem ser simples ou gêmeas (Graf et al. 1984).

4.2.8 Análise estatística

Para a avaliação dos possíveis efeitos mutagênicos de *D. furfuracea* foi realizada a análise estatística com o procedimento de decisão múltipla (Quadro 1A), que permite distinguir entre quatro diferentes resultados: positivo, fraco positivo, negativo ou inconclusivo (Frei e Würigler, 1988). Para a avaliação dos experimentos de antimutagenicidade, utilizou-se o teste estatístico para um nível de significância de 5%, desenvolvido por Frei e Würigler (1995).

4.3 Resultados e discussão

Com o objetivo de avaliar o possível efeito genotóxico e/ou antigenotóxico da planta *D. furfuracea* nas doses; 0,085g/ml; 0,042g/ml e 0,014g/ml, utilizou-se o teste (SMART) em células de asas de *D. melanogaster*. Para o controle positivo

utilizou-se o uretano (20mM) e para o controle negativo água destilada esterilizada. O presente trabalho utilizou o tratamento crônico (48hs) tanto para os descendentes do cruzamento ST, como para os descendentes do cruzamento HB (Figura 2B).

4.3.1 Verificação sobre a possível atividade mutagênica de *D. furfuracea* em células somáticas de *D. melanogaster*

A tabela 2A apresenta as freqüências de manchas observadas nos adultos emergentes com marcadores trans-heterozigotos do cruzamento padrão (MH: *mwh + / + flr³*) de *D. melanogaster* tratados com as diferentes doses de *D. furfuracea*, além dos controles positivo e negativo.

Os descendentes MH (marcadores heterozigotos) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST), tratados com *D. furfuracea* na dose de 0,085g/ml, não apresentaram um aumento estatisticamente significativo ($P > 0,05$) para as freqüências de manchas pequenas simples, grandes simples, gêmeas e para o total de manchas, quando comparadas com o controle negativo (Figura 2C).

O tratamento com *D. furfuracea* na dose de 0,042g/ml observado nos descendentes MH do cruzamento (ST), apresentou um aumento estatisticamente significativo ($P > 0,05$), para as manchas pequenas simples, grandes simples, gêmeas e para o total de manchas, quando comparadas com o controle negativo (Figura 2C).

Também não se observou um aumento estatisticamente significativo ($P > 0,05$), para as manchas pequenas simples, grandes simples, gêmeas e para o total de manchas, quando comparadas com o controle negativo (Figura 2C), entre os descendentes MH do cruzamento padrão (ST) tratados com *D. furfuracea* na dose de 0,0014g/ml.

Ainda na tabela 2A, pode-se observar as freqüências de manchas entre os descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento de alta capacidade de bioativação (BH: *mwh + / TM3, Bd^s*) tratados com diferentes doses de *D. furfuracea*, assim como os controles positivo e negativo.

As freqüências de manchas pequenas simples, grandes simples, gêmeas e total de manchas obtidas entre os descendentes MH do cruzamento HB na dose

0,085g/ml de *D. furfuracea*, não foram estatisticamente significativas ($P>0,05$) quando comparadas com o controle negativo (Figura 2D).

Nas larvas descendentes do cruzamento HB tratadas com *D. furfuracea* (0,042g/ml), verificou-se que para as freqüências de manchas pequenas simples, grandes simples, gêmeas e para o número total de manchas, não houve aumento significativo ($P>0,05$) quando comparadas com o controle negativo (Figura 2D).

Também as freqüências de manchas obtidas nos descendentes do cruzamento HB com *D. furfuracea* (0,014g/ml), não apresentaram aumento estatisticamente significativo ($P>0,05$) para as manchas pequenas simples, gêmeas e para o número total de manchas, quando comparadas com o controle negativo (Figura 2D).

O controle positivo apresentou para os descendentes MH (ST e HB) um aumento estatisticamente significativo nas freqüências de manchas pequenas simples (Figura 2G,a), grandes simples (Figura 2H,a), gêmeas (Figura 2H,b) e no total de manchas quando comparadas com o controle negativo. As freqüências de manchas espontâneas (Figura 2G,a), obtidas no controle negativo, observadas nos descendentes do cruzamento ST e HB, estão compatíveis com a literatura (Graf e Van Schaik, 1992).

O uretano utilizado como controle positivo, é um agente que possui efeitos comprovadamente genotóxicos no teste da mancha da asa de *D. melanogaster*. Os resultados obtidos no controle positivo com os experimentos ST e HB demonstraram sua eficaz ação por induzir pró-mutagenos, elevando significativamente a freqüência de manchas observadas, apresentando assim um perfil comparável à literatura (Idaomar et al. 2002). As freqüências de manchas espontâneas, obtidas no controle negativo, observadas nos descendentes dos cruzamentos ST e HB, estão de acordo com a literatura (Graf e Van Schaik, 1992).

Frölich e Würigler (1990), estudaram sobre a genotoxicidade do ethyl carbamate (uretano), em *D. melanogaster* com teste SMART-asa. Os resultados obtidos com o cruzamento padrão (ST) na concentração de 20(mM) demonstraram que para as manchas pequenas simples (1-2 células) a freqüência de indução foi de 1.50(180) +; para as manchas grandes simples (>2 células) a freqüência de indução

foi de 0.17(21) +; para as manchas gêmeas a freqüência de indução foi de 0.11(13) + e o total de freqüências induzidas foi de 1.78(214) +. No cruzamento HB, o total de freqüência de manchas induzidas na concentração de 10(mM) foi de 0.79(63) +; e na concentração de 30(mM) foi de 2.47(198)+. Dessa maneira, foi possível evidenciar a eficiência do agente uretano como indutor de genotoxicidade.

Os resultados obtidos no presente trabalho, com o controle positivo no teste de mutagenicidade (SMART-asa), apresentaram uma correlação com o trabalho de Frölich e Würigler (1990), sendo que no cruzamento padrão (ST), o uretano (20mM), apresentou para as manchas grandes simples (>2 células) uma freqüência de indução de 0.76(46)+, enquanto que no trabalho acima citado foi de 0.17(21)+; para as manchas gêmeas a freqüência de indução foi de 0.76(46)+, sendo que Frölich e Würigler (1990), alcançaram um valor de 0.11(13)+ ; o total de freqüência induzida foi de 1.76(106)+, enquanto a literatura citada apresenta um valor bem próximo, sendo 1.78(214)+. No cruzamento (HB), o resultado obtido no presente trabalho, com o total de freqüência de manchas induzidas foi de 1.33(124)+. Dessa maneira, pôde-se observar, que muito embora Frölich e Würigler (1990), não tenham utilizado o uretano na concentração de 20(mM), no ensaio com o cruzamento (HB), houve uma correlação entre ambos os trabalhos, devido ao fato dos valores alcançados no presente trabalho com o uretano (20mM) para o total de manchas, ser intermediário para os valores obtidos na concentração de 10 e 30(mM) pelos referidos autores.

Resultados contrários aos obtidos com *D. furfuracea*, foram encontrados por Frei and Würigler (1995), quando realizaram ensaios com *D. melanogaster* para a avaliação do potencial mutagênico da planta medicinal *Aristolochia clematitis* L. Os autores constataram que esta planta foi capaz de induzir mutações e recombinações mitóticas em células somáticas pelo teste SMART-asa.

A vitamina C (ácido ascórbico) encontrada em muitas frutas e vegetais (Ferguson, 1994) foi estudada por Triparthy et al. (1990), que utilizaram o teste SMART-asa, para a verificação do possível efeito mutagênico. Os resultados encontrados, demonstraram que o ácido ascórbico não induziu efeitos genotóxicos nas manchas das asas de *D. melanogaster*.

Sousa et al. (2003), estudando a possível presença da atividade genotóxica do fitoterápico *Stryphnodendron adstringens* (Mart), em células somáticas de *D. melanogaster*, pelo teste SMART-asa, verificaram que não houve um aumento estatisticamente significativo nos resultados obtidos. Portanto, o presente trabalho pode ser correlacionado com o destes autores, por apresentar características semelhantes. A planta *S. adstringens* apresentou no controle negativo dos cruzamentos; (ST) e (HB), uma frequência para o total de manchas de 0.41(23) e 0.37(20) respectivamente, enquanto que para *D. furfuracea* os valores para os cruzamentos (ST) e (HB) foram de 0.21(13) e 0.28(17) respectivamente. A dose de 100% de *S. adstringens*, (barbatimão) apresentou no cruzamento (ST) um valor de 0.18(11) de frequência de manchas induzidas, sendo que a planta *D. furfuracea* apresentou para as doses 0,085g/ml e 0,042g/ml o valor de 0.11(07). No cruzamento (HB), as doses 66%, 75% e 100% de *S. adstringens*, apresentaram para o total de manchas induzidas, os valores de 0.30(18); 0.42(25) e 0.42(25) respectivamente, enquanto *D. furfuracea* apresentou para as doses 0,085g/ml; 0,042g/ml e 0,014g/ml um valor de 0.13(08) para o referido cruzamento. Dessa maneira, ficou evidenciado a ausência da atividade genotóxica em ambas as plantas estudadas.

Toledo et al. (2006), estudaram os possíveis efeitos abortivos e tóxicos do extrato aquoso de *D. furfuracea* em ratas grávidas (*Rattus norvegicus*). Foi observado com as doses (20g/100ml H₂O) de 5% e 10% a presença de cistos nos úteros das ratas tratadas, o que comprova a implantação do blastocisto sem desenvolvimento fetal. O número total de corpo lúteo nos animais tratados apresentaram uma redução significativa em comparação com o grupo controle, demonstrando portanto, a embriotoxicidade de *D. furfuracea*. No entanto, na presente pesquisa, detectamos falta de atividade mutagênica de infusão de folhas *D. furfuracea* utilizando o teste SMART.

Resultados semelhantes ao estudo com *D. furfuracea* foram encontrados por Rezende et al. (2013), em seus estudos com o teste de mutação e recombinação somática (SMART), com *Drosophila melanogaster* quando avaliaram o potencial de genotoxicidade de (*Saccharomyces cerevisiae* M.) comparado com a ação mutagênica induzida pela doxorubicina. Os resultados evidenciaram a ausência de

atividade genotóxica em todas as doses testadas (10,0%, 20,0% ou 40,0%p / p) nos cruzamentos (ST) e (HB).

Dogan & Yesilada (2015), avaliaram o efeito mutagênico do composto fenólico Resveratrol pelo teste SMART-asa (ST). As doses (0.1; 0.2; 0.5; 0.75; 1mM) apresentaram respectivamente os seguintes resultados: (ST): 0.11 (8); 0.15 (11); 0.16 (12); 0.21 (14); 0.25 (10). Estes resultados podem ser comparados com os obtidos neste trabalho com *D. furfuracea* com o cruzamento ST (0.10 (06); 0.11 (07); 0.11 (07). Dessa maneira, foi possível constatar que os resultados obtidos com *D. furfuracea* e Resveratrol não apresentaram efeitos mutagênicos, clastogênicos e/ou recombinogênicos em células somáticas de *D. melanogaster*.

Resultados semelhantes a este, foram obtidos por Cardoso et al. (2015), quando realizaram a avaliação mutagênica do extrato aquoso de própolis vermelha pelo teste SMART-asa. As doses 0,125; 0,25; 0,5 mg/mL apresentam os seguintes resultados: (ST): 0,45(09); 0,60(12); 0,50(10); (HB): 0,75(15); 0,75(15) respectivamente. Portanto, os resultados obtidos não apresentaram efeitos mutagênicos, clastogênicos e/ou recombinogênicos, com ou sem ativação metabólica por enzimas do sistema citocromo P450, em células somáticas de *D. melanogaster*.

Diante dos resultados obtidos, pode-se inferir que *D.furfuracea* não apresentou efeitos genotóxicos em células somáticas de *D. melanogaster*.

4.3.2 Verificação do efeito protetor de *D. furfuracea* em células somáticas de *D. melanogaster*

Para a verificação da possível atividade antigenotóxica de *D. furfuracea* em células de *D. melanogaster* utilizou-se o co-tratamento (Figura 2B), que foi realizado com larvas do terceiro estágio (72±4 horas de idade), provenientes do cruzamento (ST) e (HB), nas diferentes doses (0.085g/ml; 0.042g/ml e 0.014g/ml), associadas ao uretano (20mM).

Pelos resultados encontrados (Tabela 2B) no experimento I (ST), com a dose de 0,085g/ml de *D. furfuracea* + uretano(20mM), pode-se observar um aumento estasticamente significativo ($P>0.05$) nas manchas grandes simples e gêmeas quando comparadas com o controle positivo, entretanto, houve uma

diminuição estatisticamente significativa ($P < 0.05$) nas manchas pequenas simples e no total de manchas quando comparadas ao controle positivo. A dose 0,042g/ml+uretano(20mM) mostrou que houve um aumento estatisticamente significativo ($P > 0.05$) nas manchas grandes simples e gêmeas em relação ao controle positivo, entretanto, houve uma diminuição estatisticamente significativa ($P < 0.05$) nas manchas pequenas simples e no total de manchas quando comparadas ao controle positivo. A dose 0,014g/ml+uretano(20mM) também apresentou um aumento estatisticamente significativo ($P > 0.05$) nas manchas grandes simples e gêmeas quando comparadas com o controle positivo, entretanto, houve uma diminuição estatisticamente significativa ($P < 0.05$) nas manchas pequenas simples e no total de manchas quando comparadas ao controle positivo (Figura 2E).

Ainda em relação à tabela 2B, pôde-se observar os resultados obtidos no experimento II (ST), com a dose de 0,085g/ml de *D.furfuracea* associada ao uretano(20mM), que apresentou uma redução estatisticamente significativa ($P < 0.05$) nas manchas pequenas simples, gêmeas e no total de manchas, quando comparadas com o controle positivo. As manchas grandes simples apresentaram uma diferença não significativa. A dose 0,042g/ml+uretano(20mM) mostrou que houve uma redução estatisticamente significativa ($P < 0.05$) nas manchas pequenas simples, grandes simples, gêmeas e total de manchas quando comparadas com o controle positivo. A dose 0,014g/ml+uretano(20mM) demonstrou que houve uma redução estatisticamente significativa ($P < 0.05$) nas manchas pequenas simples, gêmeas e total de manchas quando comparadas com o controle positivo, sendo que houve uma diferença estatisticamente não significativa nas manchas grandes simples quando comparadas ao controle positivo (Figura 2E). Essas manchas grandes simples ou gêmeas originam-se por alterações no material genético em um momento da embriologia (Frei e Würigler, 1988); e a sua ausência indica um efeito tardio do uretano devido a sua associação com a planta medicinal *D. furfuracea*.

Os resultados obtidos no experimento III (Tabela 2B), do cruzamento (ST), demonstraram que houve um aumento estatístico ($P > 0.05$) para as doses; 0,085g/ml; 0,042g/ml e 0,014g/ml de *D. furfuracea* associadas ao uretano(20mM), para as manchas pequenas simples, grandes simples, gêmeas e total de manchas quando comparados ao controle positivo.

O efeito protetor obtido pelo co-tratamento de *D. furfuracea* associado ao uretano no cruzamento padrão (ST), apresentou no experimento I um índice de proteção para o total de manchas de 11% para a dose 0,085g/ml; 88% (0,042g/ml); e 93% (0,014g/ml). Para o experimento II, 95% para a dose 0,085g/ml; 65% (0,042g/ml); e 89% (0,014g/ml). Para o experimento III, 96% para a dose 0,085g/ml; 98% (0,042g/ml); e 93% (0,014g/ml).

Pelos resultados encontrados na verificação dos possíveis efeitos antigenotóxicos (Tabela 2B) no experimento I (HB), com a dose de 0,085g/ml de *D. furfuracea* + uretano(20mM), pôde-se observar que houve reduções estatisticamente significativas ($P<0.05$) nas manchas pequenas simples, gêmeas e no total de manchas quando comparadas ao controle positivo. As manchas grandes simples apresentaram uma diferença não significativa. A dose 0.042g/ml + uretano(20mM), apresentou reduções estatisticamente significativas ($P<0.05$) nas manchas pequenas simples, gêmeas e no total de manchas quando comparadas com o controle positivo. As manchas grandes simples apresentaram uma diferença não significativa. A frequência das manchas observadas na dose 0.014g/ml + uretano(20mM), mostra que houve uma redução estatisticamente significativa ($P<0.05$) nas manchas pequenas simples, grandes simples, gêmeas e para o total de manchas quando comparadas ao controle positivo (Figura 2F).

Os resultados obtidos (Tabela 2B) no experimento II (HB), demonstraram que houve reduções estatisticamente significativas ($P<0.05$) na associação da dose de 0.085g/ml de *D. furfuracea* + uretano(20Mm), nas manchas pequenas simples, grandes simples e para o total de manchas quando comparados com o controle positivo. Entretanto houve aumento estaticamente significativo nas manchas gêmeas. Os resultados obtidos com a dose 0.042g/ml + uretano(20mM), mostraram que houve reduções estatisticamente significativas ($P<0.05$) nas manchas pequenas simples, grandes simples e no total de manchas, quando comparadas com o controle positivo. Entretanto houve aumento estaticamente significativo nas manchas gêmeas. Os resultados alcançados com a dose 0.014g/ml + uretano(20mM), mostraram que houve uma redução estatisticamente significativa ($P<0.05$) nas manchas pequenas simples, grandes simples, gêmeas e para o total de manchas quando comparados com o controle positivo (Figura 2F).

Pela tabela 2B, pode-se observar que as freqüências de manchas obtidas no experimento III (HB), pela associação da dose de 0.085g/ml de *D. furfuracea* + uretano(20Mm), apresentaram reduções estatisticamente significativas ($P < 0.05$) nas manchas pequenas simples, e para o total de manchas, quando comparadas com o controle positivo. Entretanto houve aumento estaticamente significativo nas manchas grandes simples e gêmeas. A dose 0.042g/ml + uretano(20mM), apresentou reduções estatisticamente significativas ($P < 0.05$) nas manchas pequenas simples, no total de manchas quando comparadas com o controle positivo. Entretanto houve aumento estaticamente significativo nas manchas grandes simples e gêmeas. A freqüência das manchas observadas na dose 0.014g/ml + uretano(20mM), mostra que houve uma redução estatisticamente significativa ($P < 0.05$) nas manchas pequenas simples, quando comparados com o controle positivo. As manchas grandes simples e gêmeas apresentaram um aumento estatisticamente significativo, enquanto o total de manchas mostrou uma diferença não significativa (Figura 2F).

O uretano utilizado no controle positivo, demonstrou em ambos os cruzamentos sua ação eficaz, induzindo significativamente as freqüências de manchas apresentadas, demonstrando assim uma correlação com dados da literatura. As freqüências de manchas espontâneas, obtidas no controle negativo, observadas nos descendentes do cruzamento ST e HB, estão compatíveis com a literatura (Graf e Van Schaik, 1992).

Pela tabela 2B, pode-se observar que os resultados encontrados na freqüência total de manchas mutantes induzidas pelo co-tratamento com o cruzamento padrão (ST), apresentaram um efeito de proteção da planta *D. furfuracea* sobre o agente mutagênico uretano, quando administrado nas doses; 0,085g/ml; 0,042g/ml e 0,014g/ml para as manchas pequenas simples nos experimentos I e II, para manchas gêmeas nos experimentos I e II, para o total de manchas dos experimentos I e II, assim como para as manchas grandes simples na dose 0,042g/ml do experimento II (Figura 2E).

Os dados obtidos (Tabela 2B) a partir do co-tratamento dos descendentes do cruzamento de alta bioativação (HB), permitem deduzir pela análise da freqüência total de manchas induzidas, que a planta *D. furfuracea* foi capaz de atenuar os efeitos lesivos do agente mutagênico uretano, nas séries tratadas com as doses;

0,085g/ml; 0,042g/ml e 0,014g/ml para as manchas pequenas simples nas repetições I, II e III; para as manchas grandes simples na repetição III; para as manchas gêmeas nas repetições I e II (0,085g/ml e 0,042g/ml); para o total de manchas nas repetições I e II. É interessante ressaltar que na repetição III, houve também uma ação de proteção para o total de manchas nas doses 0,085g/ml e 0,042g/ml. Ainda com relação à repetição I, verificou-se uma redução de manchas grandes simples, na dose 0,014g/ml, evidenciando assim um efeito protetor de *D. furfuracea* contra o uretano (Figura 2F).

O efeito protetor obtido pelo co-tratamento de *D. furfuracea* associado ao uretano no cruzamento de alta bioativação (HB), apresentou no experimento I um índice de proteção para o total de manchas de 90% para a dose 0,085g/ml; 93% (0,042g/ml); e 93% (0,014g/ml). Para o experimento II, 90% para a dose 0,085g/ml; 93% (0,042g/ml); e 93 % (0,014g/ml). Para o experimento III, 84% para a dose 0,085g/ml; 84% (0,042g/ml); e 69% (0,014g/ml).

Pelos resultados obtidos, pode-se observar que *D. furfuracea* via co-tratamento, apresentou um efeito protetor contra a ação genotóxica do uretano em células somáticas de *D. melanogaster*, tanto no cruzamento padrão (ST) como no cruzamento com alta bioativação (HB). Esses dados indicam que mesmo em alta concentração de enzimas de desintoxicação (complexo citocromo p-450) a planta mantém o seu limiar de proteção ativo.

Nepomuceno (1997), verificou um efeito de proteção da planta medicinal *Moringa oleifera* contra a ação do uretano. No cruzamento (ST), a associação da *M. oleifera* (extrato 1:1) com o uretano (10mM), apresentou uma frequência total de manchas de 0.60(18); enquanto que a associação de *D. furfuracea* (0,042g/ml) com o uretano (20mM), apresentou para o total de manchas um valor de 0.45(27). No cruzamento (HB), a associação da *M. oleifera* (extrato 1:2) com o uretano, apresentou uma frequência total de manchas de 0.70(14), sendo que *D. furfuracea* apresentou nas doses: 0.085g/ml e 0.014g/ml; associadas ao uretano, um valor para o total de manchas de 0.58(35) e 0.71(43) respectivamente. A comparação entre ambos os trabalhos, demonstra uma semelhança nos resultados obtidos. Portanto, pode-se inferir que, tanto a *M. oleifera* quanto a *D. furfuracea* foram capazes de atenuar os efeitos genotóxicos do uretano. Dessa maneira, pode-se sugerir, que

tenha ocorrido uma interação direta entre os constituintes da *M. oleifera* e da *D. furfuracea* com o uretano ou seus metabólitos.

Ramirez-Victória et al. (2001), utilizaram o teste SMART-asa, para a verificação dos possíveis efeitos antigenotóxicos do *Capsicum spp.* No cruzamento padrão (ST), a associação do *Capsicum spp.* (12.5%) com methyl urea (20mM), apresentou uma freqüência total de manchas de 0.38(46); enquanto que a associação da *D. furfuracea* (0,085g/ml) com o uretano (20mM), apresentou para o total de manchas um valor de 0.36(22). A associação do *Capsicum spp.* (25%) com o methyl urea, apresentou uma freqüência total de manchas de 0.40(48); enquanto que a associação da *D. furfuracea* (0,042g/ml) com o uretano, foi de 0.45(27). Os descendentes do cruzamento com alta bioativação (HB), apresentaram na associação methyl urea (20mM) com *Capsicum spp.* (50%), uma freqüência total de manchas de 0.47(57); enquanto que um valor semelhante foi obtido com associação de *D. furfuracea* (0,085g/ml) + uretano (20mM), perfazendo uma freqüência total de manchas de 0.46(28). A semelhança entre os resultados obtidos da associação do methyl urea com *Capsicum spp.*, e da *D. furfuracea* com o uretano, demonstram que houve uma diminuição da freqüência total de manchas obtidas tanto no cruzamento ST como no HB, comprovando o efeito modulador de ambas as plantas estudadas.

Dogan & Yesilada (2015), avaliaram o efeito antimutagenico de Resveratrol (0.2, 0.5, 1 mM: composto polifenólico) com ciclofosfamida (CP 0.5, 1, 2 mM); mitomicina C (MMC 0.05 mM) e N-metil-N-nitrosourea (MNU 1 mM), pelo teste SMART-asa (ST) com *D. melanogaster*. Os resultados evidenciaram uma significativa redução da dose resposta nas frequencias total de manchas de 39.60% para o cotratamento com CP; de 48.86% para cotratamento com MMC y 55.25% para MNU.

Franchi et al. (2013), avaliaram o efeito antimutagênico de noni (TNJ) (*Morinda citrifolia* L.), contra as lesões induzidas por doxorubicina (DXR) e mitomicina C (MMC), pelo teste SMART-asa com *D. melanogaster*. Os resultados evidenciaram uma significativa redução da dose-resposta nas frequências de manchas de ambos os co-tratamentos. A inibição observada foi de 63, 71 e 97% para o co-tratamento com MMC; e de 83, 92 e 96% para co-tratamento com DXR, para as concentrações de 25, 50e 75% de TNJ, respectivamente. Os autores

correlacionaram esse resultado com micronutrientes antioxidantes tais como compostos fenólicos, alcalóides e flavanóides presentes nessa planta.

Rezende et al. (2013), verificaram o efeito antimutagênico de (-) cubebin (*Piper cubeba* Linn.) pelo teste SMART-asa com *D. melanogaster*. Os resultados obtidos demonstraram que (-) cubebin inibiu significativamente os efeitos genotóxicos de Uretano. A inibição observada foi de 48.89% (ST) y 67.53% (HB) para o co-tratamento com Uretano. Este estudo pode ser correlacionado com o trabalho com *D.furfuracea* por atuar como um possível desmutagênico.

De um modo geral, observou-se que, tanto para os ensaios sobre a verificação da possível atividade mutagênica, quanto para o possível efeito protetor de *D. furfuracea*, ocorreram todos os tipos de manchas, independente dos resultados das mesmas. A presença dessas manchas mutantes, que ocorreram espontaneamente ou pelo tratamento com *D. furfuracea*, ou com o agente indutor de mutagenicidade, indicam a eficácia do teste utilizado na detecção de mutações gênicas, cromossômicas e/ou recombinações no organismo da *D. melanogaster*. Assim, as células-alvo dos discos imaginais de larvas do terceiro estágio (marcadores trans-heterozigotos) foram expostas a diferentes tratamentos, para que, ao sofrerem divisões contínuas originassem as células das asas dos imagos, com seus pêlos ou tricomas, que foram analisados segundo Frei e Würigler (1988).

Através da análise dos tricomas presentes nas asas dos imagos trans-heterozigotos foram detectadas manchas simples e/ou gêmeas (Figuras 2G,b e 2H,b) que expressaram os fenótipos pêlos múltiplos e/ou pêlos com a base alargada. Portanto, as manchas pequenas que ocorreram nas repetições I, II e III, originaram-se a partir de eventos genéticos em larvas trans-heterozigotas, correspondem a clones pequenos; enquanto que as manchas grandes correspondem a clones maiores, ou seja, são provenientes de lesões que ocorreram mais precocemente no cromossomo 3 (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

Pelos resultados encontrados na verificação dos possíveis efeitos genotóxicos e antigenotóxicos (Tabelas 2A e 2B), nas repetições I, II e III, com os cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB), com as doses; 0,085g/ml; 0.042g/ml e 0.014g/ml de *D. furfuracea*, pode-se observar que as manchas (mwh) (Figuras 2Ha e 2J,b), que surgiram nos ensaios, podem ter sido originadas a partir

da recombinação mitótica simples entre os marcadores *mwh* e *flr³* que originaram clones simples, que expressaram o fenótipo pêlos múltiplos (*mwh*). Entretanto, verificou-se ainda, que as manchas com o fenótipo *flr³* (Figuras 2G, b e 2J, a), surgiram devido à recombinação entre *flr³* e o centrômero, seguida de uma segunda recombinação entre *mwh* e *flr³*, ocorrendo em uma mesma célula, resultando em clones simples *flr³*. Portanto, essas manchas com os fenótipos *mwh* e *flr³*, originaram-se de mutações que ocorreram no conteúdo informacional de um dos locus dos genes marcadores, como mutações pontuais, não-disjunção ou grandes deleções, contendo um dos dois alelos selvagens *mwh/+* ou *flr/+*, originando clones simples *mwh* ou *flr³*. Já os clones de manchas gêmeas (Figuras 2H, b e 2J, a), fazem parte de um evento exclusivo, que pode ter ocorrido devido à recombinação entre *flr³* e o centrômero, com a segregação de um cromossomo tipo parental e um recombinante (células homozigotas do tipo *mwh/+* e *flr³/+*) (Guzmán-Rincón e Graf, 1995; Ribeiro et al. 2003).

5. EXPERIMENTO III

5.1 Teste de Ames

O teste de Ames, que tem como princípio medir a mutagenicidade bacteriana pelo número de células revertentes para a prototrofia de histidina, utiliza diferentes linhagens de *S. typhimurium* auxotróficas em relação à histidina, que são expostas à amostra ou ao produto químico em teste e plaqueadas em um meio mínimo. Essas linhagens utilizadas nos testes de mutagenicidade, contém mutações que podem ser do tipo *rfa* que aumenta a permeabilidade da membrana, ou *uvrB* que possui um sistema deficiente de reparo por excisão e também contém os plasmídeos (pKM101) que conferem maior sensibilidade na detecção de agentes genotóxicos (Maron e Ames, 1983). Com a introdução de mutações adicionais nas cepas originais, o teste tem-se tornado mais sensível permitindo a detecção de vários produtos mutagênicos ou cancerígenos, compostos oxidantes, aldeídos, peróxido de hidrogênio, glioxal e formaldeído dentre outros (Rabello-Gay et al. 1991).

O presente trabalho teve o objetivo de determinar a possível presença de mutagenicidade e antimutagenicidade da planta *D. furfuracea* pelo teste de Ames.

5.2. Material e método

5.2.1 Linhagens de *S. typhimurium*

As cepas de *S. typhimurium* utilizadas no presente trabalho foram TA97a, TA98, TA100 e TA102 (Tabela 3A).

5.2.2 Controles

- N-óxido 4-nitroquinolina (4NQO) - para as cepas TA97a e TA98
- Azida sódica - para a cepa TA100
- Mitomicina C - para a cepa TA102

O controle negativo foi realizado com água destilada esterilizada ou diluente dimetilsulfóxido (DMSO).

5.2.3 Meio de cultura

Os meios de cultura utilizados foram os seguintes; o meio nutriente para a incubação das cepas *S. typhimurium*, o ágar mínimo glicosado (ágar glicose e o meio MEVB “E”, Vogel e Bonner, (1956), para a confecção de placas, a solução mista histidina/biotina 0,5mM que foi acrescentada no meio ágar mínimo glicosado, o top ágar contendo traços de histidina/biotina 0,5mM para a formação do “background” e o meio para a confecção de placas master contendo os antibióticos específicos (ampicilina para as cepas TA98, TA100 e TA97a, e ampicilina e tetraciclina para a cepa TA102), (Maron e Ames, 1983). Esses componentes encontram-se especificados nos quadros 3A a 3G.

5.2.4. Verificação das características genéticas e conservação das cepas bacterianas

Para a conservação das cepas de *S. typhimurium* foram realizados testes para verificação dos caracteres genéticos de acordo com Maron e Ames, (1983).

A dependência das cepas à histidina foi confirmada pela demonstração da necessidade de histidina para crescimento das cepas bacterianas em placas de agar mínimo glicosado seletivo. As culturas em caldo nutrientes foram plaqueadas em agar mínimo glicosado com biotina (controle) e placas com agar mínimo glicosado com histidina/biotina incubadas a 37°C (pernoite). Após este procedimento foi verificado se as cepas do grupo controle não apresentaram crescimento e se as cepas do grupo histidina/biotina apresentaram crescimento.

A presença de mutação *rfa* das cepas foi confirmada através da sensibilidade ao cristal violeta: uma alíquota de 100µl das linhagens, em agar de superfície (45°C), foi distribuído em placas de agar nutriente. Sobre um pequeno disco de papel filtro estéril (5 milímetros de diâmetro), colocado no centro da placa, foi adicionado 10µl de solução cristal violeta. Após 12 horas de incubação a 37°C, observou-se a zona de inibição do crescimento (cerca de 14 mm) ao redor do disco.

A presença de deleção *uvrB* foi confirmada pela sensibilidade à radiação ultravioleta (UV germicida). Estrias de culturas com e sem mutação *uvrB* foram semeadas em placas contendo agar nutriente. Metade da placa foi coberta, sendo a outra metade irradiada com luz UV (15W-germicida) a uma distância de 33cm. As cepas contendo fator de resistência (TA97a, TA98, TA100 e TA102) foram expostas por 8 segundos. Essas cepas foram incubadas por 24 horas. Após esse período, foi

observado se as cepas com deleção *uvrB* cresceram somente na metade da placa não irradiada e a cepa TA102 (que não apresenta esta deleção) cresceu por toda a placa.

Presença do plasmídio pKM101: Linhagens portadoras do plasmídio são resistentes a ampicilina. Culturas resistentes e sensíveis foram estriadas em placas agar nutriente, acrescidas de ampicilina. Após incubação a 37°C, observou-se o crescimento das linhagens portadoras do plasmídio de resistência.

Presença do plasmídio pAQ1: A linhagem portadora deste plasmídio, TA102, foi testada para resistência a ampicilina e tetraciclina. Em procedimento semelhante ao anterior, as placas foram acrescidas de tetraciclina (60µg/placa).

A taxa de reversão espontânea das cepas teste para independência à histidina foi medida pelas colônias revertentes, prototróficas em relação à histidina, que foram visualizadas em placas contendo agar mínimo com traços de histidina e biotina. Nas colônias auxotróficas, foi observado a presença de uma fina camada de crescimento bacteriano (background).

Após estes procedimentos, as cepas foram preservadas em frascos contendo 1,0 ml de caldo nutritivo, acrescido de 0,09ml de dimetil sulfoxido (DMSO) como agente crioprotetor, em seguida, as cepas foram submetidas a um congelamento fracionado para diminuir o impacto de temperatura onde as cepas homogeneizadas foram acondicionadas inicialmente em freezer a -20°C por 24 horas. Decorrido este período, as cepas foram transferidas ao freezer a -70°C. Para evitar possíveis contaminações durante o uso rotineiro, as cepas foram estriadas em placas contendo ágar mínimo glicosado com histidina/biotina e os antibióticos ampicilina e tetraciclina (placa master), vedados com “parafilm” e conservadas sob refrigeração a 4°C. Foram confeccionadas placas “master” das cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102 para a realização dos experimentos de avaliação da atividade de genotoxicidade e antigenotoxicidade (Maron e Ames, 1983).

5.2.5 Procedimento experimental

O procedimento experimental para a avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica foi realizado da seguinte maneira: no teste de mutagenicidade, alíquotas (0,1ml) de cultura “pernoite” das cepas *S. typhimurium* TA97a, TA98,

TA100 e TA102, em fase estacionária de crescimento, foram incubadas por 25 minutos em diferentes doses do chá de *D. furfuracea* por infusão (0,0mg, 0,05mg, 0,1mg, 0,5mg, 1mg, 2mg, 4mg). Para o teste de antimutagenicidade foram utilizadas as seguintes dosagens: (0,0mg, 0,05mg, 0,1mg, 0,5mg, 1mg, 2mg, 4mg, e 8mg) acrescidas de 0,5µg de 4NQO para as cepas TA97a e TA98, 1,5µg de azida sódica para TA100 e 0,5µg de mitomicina C para TA102. Para ambos os ensaios, as culturas foram incubadas durante 25 minutos com agitação (120 rpm) e aeração a 37°C. Decorrido este período foi acrescentado 2ml de top ágar glicosado liqüefeito contendo solução de histidina/biotina (0,5mM). O conteúdo foi vertido em placas de petri em duplicata contendo meio mínimo glicosado e em seguida as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após este período realizou-se a contagem do número de colônias revertentes. Para cada cepa foram realizados três experimentos com duas repetições. Utilizou-se como controle positivo 0,5µg de 4NQO para as cepas TA97a e TA98, 1,5µg de azida sódica para a cepa TA100 e 0,5µg de mitomocina C para a cepa TA102. Para os controles negativos utilizaram-se H₂O (destilada e esterilizada) e o solvente (DMSO). Os resultados foram obtidos da média aritmética dos três experimentos realizados (Maron e Ames, 1983; Rabello-Gay et al. 1991).

5.2.6. Expressão e análise dos resultados

Com o título de facilitar a visualização e uma melhor comparação dos resultados obtidos, os mesmos foram expressos pela razão da mutagenicidade em função da dose da planta. A razão de mutagenicidade (RM) pode ser expressa pela relação do número de colônias revertentes na placa teste (E) e do número de colônias revertentes na placa do controle negativo (Cn), onde $RM = E/Cn$. Um resultado pode ser considerado como positivo quando o número de colônias revertentes induzidas for igual ou superior ao dobro do número de colônias do controle negativo e além disso, deve existir uma relação dose-resposta em pelo menos três das doses testadas. Resultados negativos indicam que, a substância testada não apresenta as condições citadas anteriormente. (Maron e Ames, 1983; Rabello-Gay et al. 1991).

5.3. Resultados e discussão

5.3.1 Avaliação da atividade mutagênica de *D. furfuracea* em cepas de *S. typhimurium*

O presente trabalho avaliou a possível atividade mutagênica e antimutagênica do chá das folhas de *D. furfuracea* por infusão pelo teste de Ames, utilizando-se as cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102.

Os resultados obtidos do presente trabalho foram apresentados nas figuras 3A a 3D.

Pela figura 3A pôde-se observar, que a cepa TA97a tratada com *D. furfuracea*, apresentou uma razão de mutagenicidade máxima (1.17) obtida nas doses 0,05mg e 0,5mg. Esses resultados mostraram um pequeno acréscimo da razão de mutagenicidade, entretanto, um resultado só é considerado positivo quando a razão de mutagenicidade (RM) for igual ou superior a dois (2) e além disso, apresentar uma relação de dose resposta em pelo menos três (3) das doses testadas. Neste caso, não foram verificadas as condições acima descritas, e dessa maneira, não foi possível detectar a presença da atividade mutagênica da planta *D. furfuracea*.

Pela figura 3B, pôde-se observar que não houve indução do número de células revertentes em função da dose. O tratamento da planta não provocou um aumento da RM. Para todas as dosagens utilizadas a RM obtida foi inferior a um (1). Assim, não foi possível detectar a presença da atividade mutagênica de *D. furfuracea* na cepa TA98.

Pelos resultados obtidos da cepa TA100 (Figura 3C), pôde-se observar que a planta não causou um aumento do número de células revertentes em função da dose. Para as doses utilizadas apresentou-se uma RM menor que um (1). Portanto, não foi possível identificar a presença da atividade mutagênica da planta na cepa TA100.

Pelos resultados obtidos da cepa TA102 (Figura 3D), observou-se que a *D. furfuracea* não provocou um aumento de células revertentes. Para todas as doses utilizadas, não foi observado um aumento da RM. Dessa maneira, não foi possível detectar a presença da atividade mutagênica da planta na cepa TA102.

Pelos resultados obtidos das cepas TA97a TA98, TA100 e TA102, pôde-se observar que a planta *D. furfuracea* não provocou um aumento significativo do número de colônias revertentes em função da dose, sendo que o número de colônias revertentes de cada amostra, foi inferior ao dobro do número de colônias revertentes do controle negativo. Desta maneira, pôde-se concluir que esta planta não apresentou atividade mutagênica nas cepas de *S. typhimurium* analisadas.

Resultados contrários, aos obtidos com *D. furfuracea* no presente trabalho, foram encontrados por Varanda e Villegas (1994), quando realizaram ensaios com *S. typhimurium* para a avaliação do potencial mutagênico da planta medicinal *Paepalanthus velloioides*. Os autores constataram que esta planta foi capaz de induzir mutações nas cepas TA100 e TA98. Os ensaios demonstraram atividade mutagênica em ambas as linhagens, indicando uma atuação a nível de substituição de bases, bem como no deslocamento do referencial de leitura.

Tyrsina et al. (1994) realizaram o teste de Ames com *S. typhimurium* (TA100) e verificaram que, o ácido ascórbico e seus derivados tem propriedades pró-oxidantes.

Moreno et al. (1991), estudando os possíveis efeitos mutagênicos do alcalóide aporfinico boldina, presente na planta medicinal *Pneumus boldus* constataram pelo teste de Ames, que o mesmo não foi capaz de induzir mutações nas cepas de *S. typhimurium* TA98, TA100, TA102.

Resultados semelhantes aos obtidos com *D. furfuracea* no presente trabalho, com a cepa TA100, foram apresentados por Oliveira et al. (1994), quando realizaram o teste de Ames com a planta *Bixa orellana* e verificaram que os resultados obtidos da cepa, TA100, não apresentaram atividade mutagênica.

Heo et al. (2001) avaliaram pelo teste de Ames, o potencial mutagênico do Galangin, que é um flavanóide presente em alta concentração na planta medicinal *Alpinia officinarum*. Os resultados obtidos da cepa TA98, demonstraram que o Galangin, induziu atividade mutagênica nos ensaios com ativação metabólica. Entretanto, o Galangin, não apresentou atividade mutagênica quando testado na cepa TA100, com e sem atividade metabólica.

Fonseca et al. (1994) realizaram o teste de Ames com o extrato aquoso liofilizado de *Paullinia cupana* e verificaram que houve indução de frameshift na linhagem TA97a. Entretanto, os resultados obtidos das cepas TA98, TA100 e TA102, indicaram que o extrato desta planta não apresentou atividade mutagênica.

Zhang et al. (2004), realizaram um estudo para avaliar o extrato aquoso de aparas de bambu, aplicando o teste de Ames com as linhagens TA98, TA97, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*, na ausência e presença de ativação metabólica (S9). A ausência de indução do aumento do número de colônias com mutação reversa nas quatro cepas teste em todas as doses testadas demonstrou que o extrato de bambu não apresentou atividade mutagênica.

Resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo foram relatados por Vieira et al. (2013), quando avaliaram o possível efeito mutagênico da curcumina pura, pelo teste de Ames nas doses de 0,002, 0,005, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 e 0,5 mg/placa, administrados com as linhagens TA97a, TA98, TA 100 e TA102. Curcumina não mostrou um aumento estatisticamente significativo no número de colônias revertentes em comparação com o controle negativo em todas as concentrações testadas.

Resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho com *D.furfuracea* foram relatados por Yoshida et al. (2015), quando avaliaram a possível atividade mutagênica dos compostos fenólicos de baru (*Dipteryx alata* Vogel) com o teste de Ames utilizando cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA97, TA100 e TA102). Os resultados dos mostram que nenhum dos compostos fenólicos induziu aumento no número de colônias revertentes em comparação com o grupo do controle negativo, indicando a ausência de atividade mutagênica.

5.3.2 Avaliação da atividade antimutagênica de *D. furfuracea* em cepas de *S. typhimurium*

A avaliação da atividade antimutagênica de *D. furfuracea* foi realizada pelo co-tratamento da planta com os agentes sabidamente mutagênicos. O co-tratamento foi a metodologia escolhida por possibilitar investigar reações que ocorrem preferencialmente a nível extracelular, entre o modulador e o mutagênico (Kada et al. 1982; De Flora, 1998).

De acordo com Rabello-Gay, et al. (1991), a magnitude da indução no teste de Ames pode ser indicada por meio da razão de mutagenicidade (RM). A razão de mutagenicidade, foi expressa pela relação do número de colônias revertentes na placa teste do co-tratamento (E), e o número de colônias revertentes na placa do controle positivo (C_p), onde $RA=E/C_p$. Considerou-se um resultado como positivo quando o número de colônias revertentes induzidas foi inferior a 70% do número de colônias do controle positivo ou seja, uma proteção de pelo menos 30%. Além disso, apresentar uma relação inversa da dose-resposta. Pelas curvas dose-resposta construídas para os controles positivos utilizados no ensaio, foram selecionadas as doses que apresentaram um maior número de revertentes para serem associadas com a planta em teste, determinando assim o co-tratamento.

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antimutagênica de *D. furfuracea* em quatro cepas de *S. typhimurium* foram apresentadas nas figuras 3E a 3H.

Pela figura 3E, pôde-se observar que *D. furfuracea* provocou uma diminuição considerável do número de células revertentes na cepa TA97a. Observou-se que para todas as doses utilizadas apresentou-se uma proteção significativa da ação mutagênica do 4NQO. A proteção máxima foi obtida na dose de 4000 μ g com uma proteção de 81%. Dessa maneira, pôde-se concluir que a planta *D. furfuracea* exerceu ação moduladora do agente mutagênico 4NQO.

Pelos resultados obtidos da cepa TA98 (Figura 3F), observou-se que *D. furfuracea* causou um decréscimo do número de células revertentes. Para todas as doses usadas mostrou-se uma proteção da atividade mutagênica do 4NQO. A proteção máxima alcançada ocorreu na dose 4000 μ g com uma proteção de 67%. Assim sendo, pôde-se constatar que *D. furfuracea* promoveu uma ação moduladora do agente mutagênico 4NQO.

Pela figura 3G, pôde-se observar que *D. furfuracea* promoveu uma diminuição do número de células revertentes na cepa TA100. Observou-se que para todas as doses utilizadas apresentou-se uma proteção da ação mutagênica da azida sódica. A proteção máxima foi obtida na dose de 4000 μ g com uma proteção de 52%. Assim, foi verificado que *D. furfuracea* exerceu um efeito de modulação da mutagenicidade da azida sódica.

Pelos resultados obtidos da cepa TA102 (Figura 3H), observou-se que *D. furfuracea* causou uma diminuição do número de células revertentes. Para todas as doses utilizadas apresentou-se uma proteção da atividade mutagênica da mitomicina C. A proteção máxima obtida ocorreu na dose de 2000µg com uma proteção de 53%. Dessa maneira, pôde-se constatar o efeito protetor de *D. furfuracea* contra a ação mutagênica da mitomicina C.

Pelos resultados obtidos das quatro linhagens de *S. typhimurium* verificou-se, que o chá por infusão de *D. furfuracea* mostrou uma proteção contra as ações lesivas dos agentes mutagênicos utilizados no co-tratamento. A proteção máxima obtida das quatro cepas (TA97a, TA98 TA100 e TA102) foram de 81%, 67%, 52% e 53% respectivamente, obtendo dessa maneira, uma média de proteção de 63%. Assim pôde-se concluir que a planta exerceu uma forte ação de atenuação na mutagênese.

Sarkar et al. (1996), relataram que os mecanismos pelos quais os extratos de plantas modulam os efeitos genotóxicos indicam que certos compostos específicos, tais como o ácido ascórbico e fibras vegetais, podem atuar agindo como agente redox, ou seqüestrando radicais livres ou mesmo ligando-se aos princípios tóxicos do mutágeno.

Aruna et al. (1991) demonstraram efeitos antimutagênicos das folhas de *Moringa oleifera* em *Salmonella typhimurium* (linhagem TA1537).

Shiraki et al. (1994) verificaram que os resultados obtidos do teste de Ames (*S. typhimurium* TA104) com o chá preto, apresentou efeito antimutagênico e antioxidativo, contra a ação mutagênica do peróxido de hidrogênio.

Marnewick et al. (2004) utilizaram o teste de Ames (com metabolização (S9) para a verificação dos possíveis efeitos antigenotóxicos de extratos aquosos das plantas *Aspalathus linearis*, *Cyclopia intermedia* e *Camellia sinensis* em cepas de *S. typhimurium*. Os resultados obtidos da cepa TA98 demonstraram que estas plantas exerceram uma ação de atenuação da mutagenicidade do 2-acetylaminofluorene. Os resultados obtidos da cepa TA100 apresentaram um efeito modulador das referidas plantas contra a atividade mutagênica da aflotoxina.

Negi et al. (2003) detectaram a atividade antimutagênica do extrato da planta medicinal (*Punica granatum*) em *S. typhimurium* (TA100), contra a atividade mutagênica da azida sódica, demonstrando um efeito protetor de 40%. Portanto, o resultado acima citado, pode ser comparado com o resultado alcançado no presente trabalho com *D. furfuracea* que promoveu uma proteção de 52% na cepa TA100, contra as atividades mutagênicas da azida sódica.

Zahin et al. (2014), encontraram resultados similares ao presente estudo com os extratos secos de *P. granatum* em *S. typhimurium*. A maior concentração testada (500 µM) mostrou um significativo efeito modulador de *P. granatum* contra a mutagenicidade induzida pela azida de sódica e MMS. O índice de proteção foi de 74,4% em TA97 seguido por TA100 (74,3%), TA98 (65,3%), e TA102 (59,8%) nas linhagens analisadas.

Devi et al. (2015), em seus estudos com o teste de Ames para verificar a antimutagenicidade do extrato etanólico de *Curcuma caesia*. Constararam a redução de lesões induzidas pela ação indireta da ciclofosfamida por 97,21% e 90,30% respectivamente para as cepas TA98 e TA100 (na presença de S9). A forte atividade antimutagênica foi demonstrada pela alta dose (5000 µg/placa).

A atividade antimutagênica do ácido gálico foi verificada usando o ensaio de Ames, Kaur et al. (2015). Os resultados obtidos com as cepas TA98 de *S. typhimurium* mostraram que a dose de 2.500 mg / 0,1 ml /placa, promoveu um efeito modulador de 74,56% e 76,45% contra a ação mutagênica do 4-nitro-o-phenylene diamine (NPD) e 95,27% e 95,81% contra as lesões de 2-aminofluorene (2-AF). A linhagem TA100 apresentou uma ação protetora de 95,89% e 96,22% de inibição contra a azida sódica e um índice de 99,76% e 99,56% de inibição contra-2 AF. Estes resultados podem ser comparados com os obtidos no presente trabalho com *D. furfuracea* contra a ação mutagênica do 4NQO, onde a cepa TA98 atingiu a proteção máxima de 67% com a dose 4000µg e com a cepa TA100 contra a ação lesiva da azida sódica, onde proteção máxima foi obtida na dose de 4000µg com uma proteção de 52%.

Lima et al. (2014), avaliaram o efeito citoprotetor do extrato etanólico e frações de *D. furfuracea* frente ao metal pesado cloreto de mercúrio (HgCl₂). Os dados obtidos indicaram que esta planta exerceu uma ação citoprotetora à *E. coli* contra a toxicidade do Mercúrio (HgCl₂). De acordo com os autores, esse efeito

protetor pode ser atribuído às propriedades quelantes dos flavonoides presentes em *D. furfuracea*.

Mejía et al. (1998) realizaram o teste de Ames com a linhagem YG1024 (derivada da linhagem TA98) de *S. typhimurium* para a verificação da possível atividade antimutagênica de peppers (*Capsicum spp.*) Os resultados obtidos apresentaram uma de proteção de 72% da planta contra a ação mutagênica do 1.8-dinitropyrene. Este resultado pode ser comparado com o valor de proteção alcançado com a cepa TA98 na associação de *D. furfuracea* com o 4NQO, que apresentou uma proteção de 67%.

Edenharder e Grünhage, (2003) investigaram a antimutagenicidade de flavanóides sobre a ação mutagênica do tert-buty1 hidroperóxido e cumene hidroperóxido em *S. typhimurium* (TA102). Os resultados obtidos indicaram que o flavanóide exerceu uma inibição de 50% sobre os efeitos mutagênicos destes compostos. Este resultado pode ser comparado com o presente trabalho com *D. furfuracea* que apresentou uma proteção de 53% na cepa TA102, contra a ação lesiva da mitomicina C.

Rauscher et al. (1998) realizaram estudo com *S. typhimurium* sobre o efeito antimutagênico de extratos de frutas e vegetais ricos em carotenóides. Os resultados alcançados com a cepa TA98, demonstraram que o efeito protetor do damasco foi de 51% contra a atividade mutagênica do 2-amino-3-methylimidazo [4,5-*f*] quinoline. Na linhagem TA100, o efeito protetor do damasco foi de 42% contra os efeitos mutagênicos da aflotoxina. Portanto houve uma semelhança entre os resultados obtidos nos testes de antimutagenicidade com *D. furfuracea* que apresentou nas linhagens TA98 e TA100 uma proteção de 67% e 52% respectivamente contra a ação do 4NQO. Estes autores, apresentaram os resultados obtidos da cepa TA100, onde a laranja demonstrou um efeito de proteção contra a mutagenicidade do benzo[a]pyrene (BaP) de 67%, ou seja, este mesmo valor foi encontrado no presente trabalho com a cepa TA98 que apresentou a proteção de 67% de *D. furfuracea* contra a ação do 4NQO e também da cepa TA102, que mostrou a proteção máxima de 53% contra a ação lesiva da mitomicina C. A linhagem TA97a apresentou um efeito protetor de 72% da laranja contra a ação mutagênica da aflotoxina. Este valor pode ser comparado com o presente trabalho,

onde a cepa TA97a, apresentou uma significativa proteção de 81% de *D. furfuracea* contra a ação mutagênica do 4NQO.

6. DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar as possíveis atividades mutagênicas e/ou antimutagênicas de *D. furfuracea* através de três ensaios genéticos. O primeiro ensaio empregado foi o Ring-x-loss, que permite a detecção do efeito clastogênico em células germinais de *D. melanogaster*. O segundo ensaio foi o (SMART-asa), que possibilita a detecção de mutação ou recombinação em células somáticas de *D. melanogaster*. O terceiro ensaio utilizado foi o teste de Ames, que permite a detecção de mutações induzidas por diferentes substâncias ou agentes químicos, no genoma de linhagens de *S. typhimurium* através da reversão do fenótipo histidina negativo.

6.1 Avaliação sobre a possível atividade genotóxica de *D. furfuracea* em células germinais de *D. melanogaster*

O uso da *D. melanogaster* na genética toxicológica tem se baseado, principalmente, na resposta de células germinais – obtidas através do teste para detecção de letal recessivo ligado ao sexo (SLRL) e do teste para perda de cromossomo X em anel (RXL). Ambos fornecem resultados importantes no que se refere aos riscos genéticos das mutações para as gerações futuras (Zijlstra & Vogel, 1988).

Os eventos genéticos encontrados em *Drosophila* podem ser detectados em (i) tecidos gonadais – originando mutações que são transmitidas para as progênes, ou (ii) em células somáticas – permitindo o prognóstico da formação de clones de células mutantes que se expressam como mosaicos nos indivíduos expostos a agentes mutagênicos (Zijlstra et al. 1979).

Adicionalmente, a *D. melanogaster* tem se mostrado suscetível para a identificação de mutagênicos que requerem ativação metabólica. Estudos obtidos a partir de homogeneizados de *D. melanogaster* revelaram a presença da atividade de citocromo P-450, em larvas e adultos. Por outro lado, o fato de que células germinais masculinas apresentam diferentes níveis de enzimas de metabolização facilita a caracterização de uma determinada substância mutagênica como sendo de ação direta ou indireta. Os espermatozoides são células metabolicamente inativas,

enquanto que as espermatídes e os espermatócitos apresentam os maiores níveis de atividades de metabolização (Zijlstra and Vogel, 1988).

Em *Drosophila*, há diferenças no reparo do DNA nos machos e nas fêmeas. Nos machos tratados, o reparo das lesões pré-mutagênicas ocorre nas células germinativas jovens (pré-maturas), mas não nos espermatozóides maduros porque estes não possuem sistemas enzimáticos proficientes para o reparo. É o chamado reparo paterno (Vogel e Natarajan 1995). Smith et al. (1983), comparando a mutabilidade induzida pelo EMS (etilmetanosulfonato) e MMS (metilmetanosulfonato) de vários estágios de células germinativas da espermatogênese do mutante “mei-9^{AT1}”, reparo deficiente do DNA, e de uma linhagem controle reparo-proficiente, verificaram que os dados obtidos, proporcionaram evidência direta para a hipótese de que os processos de reparo do DNA funcionam até o começo da meiose e são inativos nas células pós-meióticas. Por conseguinte, as células pré-meióticas (gônias), devido apresentarem sistemas de reparo por excisão efetivos até o começo da meiose, apresentam maior capacidade de reparo e, em consequência, baixa mutabilidade. Em geral, é observado um padrão de alta mutabilidade nas células pós-meióticas, seguindo de baixa fertilidade associada aos estágios meióticos; e baixa mutabilidade nas células espermatogônicas pré-meióticas. Portanto, o reparo paterno é menos eficiente, pois só age nas células jovens. O reparo do DNA pode ocorrer também no oócito, após a fertilização. É o chamado sistema de reparo materno (Vogel, 1989). Os oócitos com o reparo materno por excisão defectivo podem mostrar, na presença de certos mutagênicos, um aumento de mutações, constituindo o efeito conhecido como hipermutabilidade (Vogel e Natarajan 1995).

Graf e Würigler (1982), relataram que as lesões induzidas que ocorrem nos espermatozóides de *D. melanogaster* podem levar a mutações. As freqüências de perda do cromossomo sexual nos espermatozóides recuperados, dependem do tipo de fêmeas usadas nos cruzamentos, as fêmeas mostram efeitos maternos. Os espermatozóides mutagenizados por agentes alquilantes monofuncionais, aumentam a freqüência de perda do cromossomo sexual quando ocorre um reparo por excisão deficiente (mei9^a) dos oócitos. Vogel e Natarajan (1995), observaram que o funcionamento eficaz do sistema de reparo materno após a fertilização, é importante para a remoção de defeitos contidos no DNA das células germinativas

paternais. Quando uma substância mutagênica apresenta efeitos que incluem quebras cromossômicas e/ou não-disjunção, esta expõe o indivíduo ao risco de afetar suas células somáticas e provavelmente, seus descendentes, via células gaméticas (Valencia et al. 1984).

A avaliação do possível efeito genotóxico de *D. furfuracea* em células germinativas de *D. melanogaster* foi realizada com três experimentos independentes onde machos da linhagem ring-x (RX: C1 (2) yB/ y+ YB^S), foram tratados com diferentes doses da planta via ingestão e posteriormente cruzados com fêmeas virgens ywsn³ não tratadas, visando a obtenção de resultados sobre a resposta dos três tipos de células da espermatogênese, que ao se expressarem na geração F1, permitem diagnosticar o efeito de acordo com os critérios qualitativos de avaliação (Zijlstra & Vogel, 1988).

No teste ring-x-loss, o controle positivo utilizado foi o uretano na concentração de 20mM, uma vez que, testes de perda cromossômica e translocações recíprocas demonstraram que a indução de quebras requer consideravelmente altas concentrações de certos compostos (Zimmering, 1983).

O uretano é um carcinógeno animal muito estudado nos últimos 40 anos. Estudos demonstraram que este composto geralmente não apresenta-se como mutagênico em *Neurospora*, por outro lado apresenta-se como mutagênico em *Saccharomyces*. A *Drosophila* parece ser o organismo que melhor responde, em termos de resultados positivos de mutagenicidade, ao uretano (Sotomayor, 1990). Esse mesmo autor afirma que o uretano é clastogênico em células somáticas de mamíferos *in vivo*, mas mostra uma maior variabilidade de resultados com células tratadas *in vitro*.

O estudo da genotoxicidade do uretano em *S. typhimurium*, em *Saccharomyces cerevisiae* e em células TK6 humanas (linfoblastos) mostrou que, na ausência de enzimas citocromo P450, não foi observada genotoxicidade em nenhum dos três sistemas. Na presença de um sistema ativador (citocromo P450), o uretano induziu mutagenicidade em *S. typhimurium* na linhagem TA100, mas não induziu nas linhagens TA98 e TA102 (Hübner et al. 1997).

Freese (1965) estudando os efeitos do hidroxietano, derivado do uretano obtido pela metabolização, verificou que o mesmo apresenta uma grande

afinidade pelo DNA. De acordo com o autor, o mecanismo de ação do hidroxiuretano no DNA está diretamente relacionado ao fato de o composto (hidroxiuretano) apresentar um radical livre –NHOH que rapidamente interage com o DNA. Ele acredita que muitas mutações induzidas pelo hidroxiuretano são causadas pela mudança de um único par GC por um AT. O hidroxiuretano e seus derivados, sob condições fisiológicas, reage com os ácidos nucléicos ou seus constituintes básicos ou com proteínas, acetilando especificamente o grupo amino primário de citosina (IARC, 1974).

Epoxivinil carbamato (VCO), um outro metabólito do uretano, possui uma forte atividade eletrofílica, com capacidade de interagir com DNA, formando aductos com as purinas (adenina e guanina) de *S. typhimurium* (Park et al. 1993).

Abraham et al. (1998), verificaram por meio do teste de micronúcleos em camundongos, que extratos vegetais (cenoura, espinafre e repolho), café e chá (Chá preto indiano), apresentaram uma atenuação dos efeitos mutagênicos, quando co-administrados com uretano.

Flückiger-Isler et al. (2004), verificaram pelo teste de Ames (sem ativação metabólica) que o uretano apresentou atividade mutagênica na cepa TA98 de *S. typhimurium*.

Os resultados obtidos demonstraram que, de acordo com a literatura, os controles positivos e negativos apresentaram eficácia em relação à dose-resposta, e o índice de perda do cromossomo X em anel, das diferentes doses da planta apresentaram uma co-relação com o controle negativo, onde a porcentagem obtida em ambos os tratamentos encontram-se próximo de 2%, que é o índice aproximado de mutações espontâneas esperadas para o teste aplicado.

Resultados contrários aos obtidos no presente trabalho com *D. furfuracea*, foram demonstrados por Frei et al. (1985) quando realizaram ensaios com *D. melanogaster* para a verificação do potencial mutagênico da planta medicinal (*Aristolochia clematidis*). Os resultados obtidos, revelaram *A. clematidis* foi capaz de induzir mutações em células germinativas pelo teste Ring-X-loss, bem como recombinações mitóticas em células somáticas pelo teste SMART-asa.

Os resultados obtidos no presente trabalho com *D. furfuracea*, demonstraram uma semelhança com o trabalho desenvolvido por Pereira (1999), na verificação do possível efeito genotóxico da planta medicinal (*Hiptidendron canun*). Pelo teste Ring-x-loss, observou-se que *H. canun* não exerceu atividade clastogênica no que se refere à perda total do cromossomo X em anel, mosaicismos, perda parcial do cromossomo Y e não-disjunção em células germinais de *D. melanogaster*.

Pelos resultados obtidos com as diferentes doses do chá por infusão de *D. furfuracea* verificou-se que a planta não induziu perda de cromossomo X em anel, perda parcial de cromossomo Y, mosaicismos e não-disjunção, portanto não houve uma diferença estatística significativa em relação ao controle negativo, nas ninhadas 1, 2 e 3. Dessa maneira, pôde-se inferir que *D. furfuracea* não induziu lesões que levam aos efeitos clastogênicos avaliados pelos quatro critérios utilizados no teste ring x-loss.

6.2 Avaliação sobre a possível atividade genotóxica e antigenotóxica de *D. furfuracea* em células somáticas de *D. melanogaster*

O teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *D. melanogaster* desponta como um sistema importante para o prognóstico de agentes mutagênicos e recombinogênicos, atuando sobre células somáticas. O teste SMART mais comumente empregado, baseia-se na detecção de manchas de pêlos mutantes presentes nas asas dos adultos. O número de manchas obtidos fornece resultados sobre a ocorrência de eventos genéticos enquanto que o tamanho destas manchas é informativo do tempo de atuação do mutagênico ao longo da embriogênese. Por outro lado, a presença de dois genes marcadores específicos localizados no cromossomo 3 permite a distinção entre eventos mutacionais – predominantemente do tipo mutação pontual – e recombinação mitótica entre regiões de hetero ou eucromatina (Graf et al. 1984). A recombinação genética é um fenômeno de importância universal para todos os sistemas, desde os vírus até os eucariotos superiores. Na mosca das frutas (*D. melanogaster*), a recombinação genética ocorre não somente nas células meióticas, como também, nas células somáticas durante a divisão celular mitótica (Stern, 1986).

Graf (1994), demonstrou por procedimentos experimentais com *D.melanogaster* que a idade ideal para o tratamento das das larvas é de 72 horas, considerando que existe uma clara relação entre o tempo de indução e freqüência, bem como, o tamanho de manchas simples: em larvas jovens são produzidas manchas grandes e em número pequenos e, em larvas mais velhas, as manchas são em grande número e pequenas; manchas gêmeas não são encontradas em larvas muito velhas ou muito jovens.

A classificação das manchas (“spots”) em classes conforme o tamanho permite estimar o momento (em que estágio larval) o evento mutacional foi induzido. Clones induzidos no início do desenvolvimento larval serão de tamanho grande: enquanto que os produzidos no 2º e 3º instar serão sucessivamente menores (Vogel, 1989).

A classificação dos clones *mwh*, refere-se aos casos em que uma ou mais células contiverem pêlos expressando o fenótipo *mwh*, isto é 3 ou mais pêlos em cada célula. Grupos de células que apresentarem 2 pêlos cada uma, não devem ser considerados. No caso de uma célula, contendo 3 pêlos mutantes, estar adjacente a uma ou mais células com 2 pêlos mutantes – as células com 2 pêlos são consideradas como *mwh* e incluídas na contagem do número de células mutantes que formam o clone (Guzmán-Rincón e Graf, 1995; Ribeiro et al. 2003).

Os clones simples *flr*³ são poucos freqüentes, já que se originaram por eventos raros, como mutações no locus *flr*, pequenas deleções intersticiais ou recombinação dupla. O gene *flr*³ tem uma expressividade bastante variável, manifestando-se como um ponto, um pêlo curto e alargado, ou até, como pêlos amórficos, chegando ao extremo de se manifestar como a forma de um balão, devido à extrusão do material melanótico quitinizado (Graf et al. 1984; Ribeiro et al. 2003).

Os clones gêmeos, manifestam o fenótipo *flr*³ e *mwh* no mesmo clone. São considerados clones gêmeos: (i) uma ou mais células *mwh* adjacentes a uma ou mais células *flr*³, desde que separadas por não mais do que duas células com o fenótipo selvagem; (ii) clones formados por células *flr*³ e células contendo pêlos duplos – desde que as células contendo dois pêlos estejam claramente expressando o fenótipo *mwh* (Guzmán-Rincón e Graf, 1995; Graf et al. 1989; Ribeiro et al. 2003).

Clones simples expressando o fenótipo *mwh* são mais freqüentemente observados nos experimentos. Clones gêmeos, com ambos sub-clones *mwh* e *flr3*, são menos freqüentes, sendo os clones simples *flr3* os que apresentam a menor incidência (Graf et al. 1984; Ribeiro et al. 2003).

No procedimento experimental do presente trabalho, todas as condições acima citadas foram verificadas (Figs. 2G; a, b / 2H; a,b).

A avaliação do possível efeito genotóxico e/ou antigenotóxico de *D. furfuracea* em células somáticas de *D. melanogaster* foi realizada com três experimentos independentes. Utilizou-se no teste SMART-asa, as larvas de terceiro estágio, provenientes do cruzamento padrão (ST) e de alta bioativação (HB), que foram expostas a tratamento crônico com diferentes concentrações do chá por infusão de *D. furfuracea* para a verificação da possível atividade genotóxica.

A tabela 2A apresenta pelo teste de genotoxicidade, as freqüências de manchas observadas nos adultos emergentes: ST e HB. No controle positivo do cruzamento (HB) as freqüências de manchas pequenas simples e total de manchas são maiores que as do controle positivo do cruzamento (ST), indicando que estão de acordo com as observações de Frölich e Würgler (1990), que verificaram que o uretano é um pró-mutagêno que necessita de ativação metabólica pelas enzimas do citocromo P450.

Pelos resultados alcançados nos testes de genotoxicidade (Tabela 2A), verificou-se na análise dos descendentes MH do cruzamento padrão (ST) e do cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB), que nas condições experimentais empregadas, o chá por infusão de *D. furfuracea* não induziu um aumento estatisticamente significativo (Frei e Würgler,1988), para nenhum dos tipos de manchas consideradas. (Figuras 2E e 2F). Tais resultados permitem deduzir que há ausência de componentes capazes de interagir com o DNA e causar danos de modo significativo. Se algum dano ocorreu no DNA o sistema de reparo conseguiu com eficiência, sua reconstituição antes que o mesmo se expressasse no indivíduo adulto.

Resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho com *D. furfuracea* foram encontrados por Silva, (2002), na avaliação da atividade mutagênica da planta medicinal *Guazuma ulmifolia* Lamb. Os resultados

demonstraram que o extrato de *Guazuma ulmifolia* não exerceu atividade do tipo mutação de ponto, deleção, não-disjunção ou recombinação mitótica em células somáticas de larvas de terceiro estágio, no cruzamento padrão (ST), sugerindo que o fitoterápico não é um agente genotóxico de ação direta (um mutágeno), assim como no cruzamento com alta atividade metabólica (HB), sugerindo que o fitoterápico não é um agente de ação indireta (um pró-mutágeno).

Pelos resultados obtidos nos testes de antigenotoxicidade, pôde-se observar na análise dos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, que nas condições experimentais realizadas, o chá por infusão, de *D. furfuracea* apresentou um efeito de proteção contra as mutações e recombinações somáticas induzidas pelo uretano, nos descendentes do cruzamento padrão, principalmente em relação à dose de 0,042g/ml, que apresentou uma redução em todos os tipos de manchas analisadas, e a dose 0,014g/ml, administrada nos descendentes do cruzamento de alta bioativação, que apresentou um eficiente efeito de proteção para todos os tipos de manchas analisadas (Tabela 2B).

Kong et al. (1995), relataram que a concentração dos extratos vegetais é importante na obtenção de efeitos antigenotóxicos mais eficientes. Assim, pode-se sugerir que as doses 0,042g/ml e 0,014g/ml de *D. furfuracea* são as mais indicadas no sentido de conferir uma maior proteção contra a ação de agentes genotóxicos.

Os resultados obtidos com *D. furfuracea* no teste SMART-asa para a avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica, apresentaram uma semelhança com os resultados obtidos por Triparthy et al. (1990), quando realizaram a avaliação do possível efeito mutagênico do ácido ascórbico, e o mesmo demonstrou a ausência de efeitos genotóxicos, e foi capaz de proteger contra produtos de nitrosação do metil uréia em combinação com nitrito de sódio, *in vivo*.

Algumas pesquisas com *G. ulmifolia*, evidenciaram efeito antioxidante da casca e folha devido à presença de proantociandina, sinalizando para a possibilidade de seu uso na profilaxia de danos ao material genético, haja visto, que agente oxidantes como o cromato de potássio é altamente genotóxico tanto em cruzamento padrão (ST) quanto em cruzamento com alta bioativação (HB) (Spanó et al. 2001).

Dentre os princípios químicos encontrados em *G. ulmifolia* o β -sisterola, a cafeína a mucilagem e o tanino possuem atividade preventiva ao câncer. Como tais substâncias atuam na prevenção do câncer, pode-se inferir que auxiliam no mecanismo de reparo ou impedem alterações genéticas nas células somáticas (Silva, 2002).

Por meio de SMART, em *D. melanogaster*, foi demonstrado que o café, quando co-administrado com o uretano, exibe um mecanismo inibitório, capaz de impedir a ação genotóxica do uretano (Abraham e Graf, 1996).

Carlson, (1994), relatou que o uretano, como pró-mutágeno, necessita de ativação metabólica para que possa atuar induzindo uma atividade genotóxica. Dessa maneira, pode-se sugerir que *D. furfuracea* tenha sido capaz de reagir metabolicamente, inibindo a atividade das enzimas do citocromo P450.

Bu-Abbas et al. (1994) e Chen e Yen (1997), consideraram dois mecanismos capazes de atuar no processo da antimutagenicidade de extratos aquosos de plantas: 1) interação direta entre o promutágeno e os componentes nucleofílicos presentes nos extratos; 2) inibição de promutágenos dependentes de bioativação por citocromo P450. Portanto, pode-se considerar que o chá por infusão de *D. furfuracea* tenha atuado como um desmutagênico. Isto porque seus constituintes apresentaram efeitos antígenotóxicos pela inativação dos mutágenos ou seus precursores, inibindo a atividade de enzimas, ou impedindo a interação do mutágeno com o DNA (Kada et al. 1982).

6.3 Avaliação sobre a possível atividade mutagênica e antimutagênica de *D. furfuracea* em cepas *S. typhimurium* pelo teste de Ames

No teste de Ames, resultados positivos indicam que o produto químico, ou amostra em teste, induz mutações de ponto por substituição de bases ou do tipo “frameshift” no genoma desse microorganismo.

Maron e Ames (1983), verificaram que de maneira geral os resultados positivos de compostos estudados, apresentam um perfil comum, onde inicialmente o número de centros infecciosos permanecem nos níveis da indução espontânea, cujo início define a dose mínima indutora, em seguida, uma fase apresentando um elevado percentual de células induzidas, e uma outra parte descendente que

corresponde à faixa de concentrações tóxicas. Os resultados alcançados neste trabalho com os controles positivos indicaram que o maior número de colônias revertentes obtidas com os agentes indutores, foram de 0,5µg 4-nitroquinolina (4NQO) para as cepas TA97a e TA98, de 1,5µg de azida sódica para a cepa TA100 e de 0,5µg de mitomicina C para a cepa TA102. Dessa maneira, os resultados obtidos com os controles positivos foram de acordo com os padrões já estabelecidos (Maron e Ames, 1983; Ribeiro et al. 2003) e apresentaram uma co-relação com o perfil acima descrito.

Flückiger-Isler et al. (2004), realizaram o teste de Ames com TA98 e TAMIX e constataram que o controle positivo 4NQO apresentou alto índice de mutagenicidade.

Beudot et al. (1998), avaliaram a mutagenicidade e antimutagenicidade de flavanóides pelo teste de Ames. O controle positivo 4-NQO, induziu atividade mutagênica na cepa TA100. Entretanto os resultados obtidos do teste de antimutagenicidade, revelaram que o flavanoide foi capaz de inibir a mutagenicidade do 4-NQO na cepa TA100. Estes resultados, apresentam uma semelhança em relação aos resultados obtidos no presente trabalho com o controle positivo 4-NQO, onde foi possível detectar pelas cepas TA97a e TA98 de *S. typhimurium* atividade mutagênica deste controle positivo, entretanto, no teste de antimutagenicidade, os resultados obtidos das cepas TA97a e TA98, apresentaram um efeito de proteção da *D. furfuracea* contra a ação mutagênica do 4-NQO.

A azida sódica é freqüentemente usada em laboratório químico e extensamente utilizada na indústria, agricultura e medicina. O potencial mutagênico da azida sódica tem sido demonstrado por vários testes de mutagenicidade e alguns resultados obtidos com o teste de Ames, indicaram que esta, induziu mutação por substituição de bases na linhagem TA1530 de *S. typhimurium* entretanto, não foi detectado a indução de mutagenicidade nas linhagens TA1531, Ta1532 e TA1534 (Nilan et al. 1973).

Jones et al. (1980), realizaram teste de mutagenicidade com células de roedores (linhagens V79 e V7979 de Hamster Chinês) e constataram pelos resultados obtidos, que a azida sódica atuou induzindo atividade mutagênica nas linhagens testadas.

González-César e Ramos-Morales (1997), utilizaram o teste SMART-asa para a verificação da atividade mutagênica da azida sódica e concluíram que a mesma, foi capaz de induzir recombinação mitótica em larvas de *Drosophila melanogaster*.

Mitomicina-C (MMC – CAS N^o. 50-07-7) é um antibiótico, cujo mecanismo de ação é o de se unir covalentemente com as macromoléculas do DNA, funcionando como um agente alquilante bifuncional, formando “cross-linkings” com o DNA (Rodríguez-Arnaiz, et al. 1996). Esta ligação ao DNA produz monoadições (adducts) de DNA, e biadições (cross-linkings) de DNA-proteína, induzindo alterações cromossômicas e levando a uma redução na taxa de proliferação celular (Giri e Chatterjee, 1998).

No teste SMART-asa, a formação de manchas grandes na presença de mitomicina C, indica a ação deste composto durante o início das divisões das células que compõem a asa da mosca, o que contraria a idéia de que a mitomicina C é responsável por uma redução na taxa de proliferação celular (Giri e Chatterjee, 1998).

No teste de micronúcleos em linfócitos humanos ficou demonstrado, que a mitomicina C induz atividade clastogênica (Surrallés et al. 1995).

Cunha et al. (1992), avaliaram o possível potencial supressor do ácido tânico sobre as lesões induzidas pelo agente alquilante bifuncional, mitomicina C. Os resultados obtidos, demonstraram um aumento significativo nas frequências de perda de cromossomo X em anel.

Andrade et al. (1992), trabalhando com a vanilina, demonstraram que flavanóides encontrados nesta planta, exerceram um efeito anticlastogênico sobre a perda do cromossomo X em anel induzida pela mitomicina C.

A mitomicina C é uma droga bem estabelecida como agente anti-tumoral. Atualmente, tem sido utilizada na quimioterapia contra uma variedade de neoplasias (mama, próstata, coloretal, gástrico e pulmão) (Rossi et al. 1997). Entretanto, seus efeitos mutagênicos tem sido detectados em vários tipos de testes. Estudos relacionados com a perda do cromossomo X em anel, em *D. melanogaster*, demonstraram que a mitomicina C induz biadições no DNA – convertidas em

quebras de cadeia dupla (DSBs, Double Strand Breaks) por enzimas envolvidas no reparo por excisão (Leigh, 1976; Vogel e Natarajan, 1979; Zijlstra e Vogel, 1988).

Ueda e Komano, (1984), relataram que a mitomicina C induz alterações no DNA, preferencialmente na seqüência de dinucleotídeos G-T.

De acordo com Rodrigues-Arnaiz, et al. 1996 e Rossi, et al. (1997), a atividade mutagênica da mitomicina-C pode ser inibida por compostos que têm a capacidade de seqüestrar radicais livres. Compostos estes, que podem ser encontrados nas folhas de vegetais (vitaminas A, C e clorofilina). Dessa maneira, no presente trabalho, pode-se sugerir que o efeito inibidor da atividade mutagênica da mitomicina C, possa ter ocorrido, devido à possível presença de componentes nas folhas de *D. furfuracea* que tem a capacidade de sequestrar radicais livres.

Resultados negativos indicam que a substância em teste, não induz mutações de ponto por substituição de bases ou do tipo "frameshift" no genoma de *S. typhimurium*. Os controles negativos incluídos no teste de Ames foram de acordo com o solvente utilizado. Para as cepas TA97a e TA98 usou-se o dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada para as cepas TA100 e TA102. Os resultados obtidos pela reversão espontânea indicaram que as condições experimentais estavam de acordo com o padrão estabelecido (Ames, 1983).

Um agente é considerado antimutagênico quando ocorre uma atenuação dos efeitos da substância mutagênica, incubada juntamente com a substância testada. Quanto menor a razão de antimutagenicidade, maior é o efeito protetor da substância em teste (Rabello-Gay et al. 1991).

Ramel et al. (1986), propuseram a classificação dos agentes antimutagênicos quanto ao seu modo de ação, da seguinte maneira: (i) estágio 1- compreendendo substâncias de ação extracelular que podem ser; a) substâncias inibidoras da formação ou captação dos mutagênicos; b) substâncias inativadoras de mutagênicos ou prómutagênicos; (ii) estágio 2- incluindo compostos de ação intracelular que podem ser; a) agentes bloqueadores, que previnem a mutação por competirem com sítios alvos, ou que inibem a conversão no carcinógeno final, ou que aumentam a atividade das enzimas desintoxicantes e também por reagirem diretamente com os grupos eletrofílicos; b) Agentes captadores de radicais livres; c)

agentes supressores- que previnem a expressão neoplásica de células iniciadoras;
d) agentes que afetam os mecanismos de reparação do DNA.

De acordo com Wattenberg (1983), os inibidores da carcinogênese podem ser divididos em três categorias: a) compostos que previnem a formação de metabólitos mutagênicos e/ou carcinogênicos, a partir de precursores químicos; b) agentes bloqueadores que previnem a carcinogênese por reagirem com sítios celulares críticos; c) agentes supressores, capazes de suprimir a expressão de neoplasias em células previamente expostas.

De Flora e Ramel (1988), propuseram os mecanismos de inibição da mutagênese ou carcinogênese, pelos seguintes aspectos: a) Inibidores da mutagênese com atuação extracelular – onde os inibidores da captação dos mutagênicos ou seus precursores, impedem a sua penetração dentro do organismo, ou dentro da célula, ou mesmo favorecem a sua remoção; b) Inibidores da formação endógena do mutagênico - onde ocorre a inibição da reação de nitrosação e a modificação da flora bacteriana intestinal; c) desativação do mutagênico, que pode ocorrer por reação física, química ou enzimática; d) Inibidores da mutagênese com atuação intracelular – neste caso os moduladores do metabolismo podem atuar inibindo a duplicação celular, favorecendo a captação do mutagênico por células não-alvo, inibindo a ativação de prómutagênicos ou induzindo os mecanismos de desintoxicação; e) Bloqueadores de moléculas reativas - que podem reagir com sítios eletrofílicos por reação química, enzimática, captando espécies ativas de oxigênio ou protegendo sítios nucleofílicos do DNA; f) Moduladores da duplicação e reparação do DNA – promovendo maior fidelidade na duplicação do DNA, favorecendo a reparação das lesões do DNA e inibindo a reparação indutora de erros; g) Inibidores atuando na iniciação ou em células neoplásicas – onde os moduladores da promoção tumoral, podem agir inibindo os efeitos genotóxicos, captando radicais livres, inibindo a proliferação celular, induzindo a diferenciação celular e modulando o sinal de tradução; h) Moduladores da progressão tumoral- estes atuam inibindo os efeitos genotóxicos, agindo nos hormônios ou nos fatores de crescimento, no sistema imune, nos agentes anti-neoplásicos físicos, químicos ou biológicos e também agem modulando o sinal de tradução.

De Flora e Ramel (1988), relataram que vários fatores, governados por forças balanceadoras opostas podem, adicionalmente, interferir sobre o processo mutacional. Neste contexto, destacam-se: (i) os sistemas de ativação e desintoxicação metabólica, (ii) a formação de espécies ativas de oxigênio ou de derivados nucleofílicos e sua captação por bloqueadores de moléculas reativas, e (iii) as lesões pré-mutacionais presentes no DNA e a possibilidade de sua reparação por múltiplos sistemas de correção inerentes às células.

De Flora e Ramel (1988), observaram que alguns inibidores da mutagênese e/ou carcinogênese, exercem seus efeitos por interferir em apenas uma das diferentes etapas de atuação dos mecanismos de inibição da mutagênese ou carcinogênese. Entretanto, estes autores verificaram que alguns compostos podem atuar através de mecanismos múltiplos e dependendo da etapa em que eles interferem, os resultados podem ser contraditórios. Assim, um agente que exerça efeitos protetores em determinadas condições experimentais pode ser inefetivo ou nocivo (tóxico, mutagênico e/ou carcinogênico) dependendo: (i) da metodologia utilizada – dose, rota e sequência de administração do modulador; (ii) do organismo-teste empregado; e (iii) do tipo de lesão que está sendo analisada.

De acordo com De Flora e Ramel (1988), uma substância identificada como mutagênica, refere-se a uma intrincada cadeia de eventos envolvendo a via de entrada e a quantidade do composto que é absorvida; a sua captação pelo sistema metabólico – no caso de pró-mutagênicos – ou pelas células alvo, quando nos referimos aos mutagênicos de ação direta; o seu acesso ao núcleo e a sua interação com o DNA; e finalmente, a fixação das lesões genéticas.

Pelos resultados obtidos no teste de Ames para a verificação do efeito mutagênico de *D. furfuracea* foi possível observar, que não houve um aumento significativo de revertentes nas linhagens testadas. Dessa maneira, de acordo com Ramel et al. (1988), pode-se sugerir, a ausência de mutagenicidade nas cepas de *S. typhimurium*.

Os resultados obtidos das cepas TA97a e TA98, demonstraram o efeito de proteção de *D. furfuracea* contra o deslocamento do quadro de leitura causado pelo 4NQO, e contra a substituição de pares de bases induzidas pela azida sódica e mitomicina C, nas cepas TA100 e TA102 respectivamente. (Maron e Ames, 1983).

Por outro lado, torna-se difícil e por vezes incerta a identificação dos mecanismos envolvidos nos processos de inibição da mutagenicidade, principalmente pela ocorrência de vários fenómenos resultantes de diferentes fatores que interagem simultaneamente na cascata de eventos envolvidos em tal processo (De Flora e Ramel (1988); Ramel et al. (1986).

Pelos resultados obtidos no teste de antimutagenicidade, com as quatro cepas *S. typhimurium* tratadas com diferentes doses, do chá por infusão de *D. furfuracea* constatou-se, que houve um decréscimo do número de revertentes em relação ao controle positivo para cada amostra testada. Portanto, pôde-se sugerir que esta planta, desempenhou de maneira significativa, um efeito modulador na atenuação da mutagênese, agindo como um desmutagênico Kada et al. (1982), exercendo a sua atividade protetora, inativando as substâncias mutagênicas, impedindo-as de atuarem sobre o DNA, ou mesmo interferindo na interação do mutágeno com o DNA.

7. CONCLUSIONES

La evaluación de la posible actividad mutagénica y/o antimutagénica, de la infusión de *D. furfuracea* en el presente trabajo, de acuerdo con los objetivos preestablecidos para el conjunto de los tests aplicados y en las condiciones de los ensayos realizados, evidenció que:

1- De acuerdo com los resultados obtenidos por el test Ring-x-loss, demostraron que *D. furfuracea* no ejerció actividad genotóxica en células germinales de *D. melanogaster* presentando así, en las tres nidadas, la ausencia de pérdida total del cromosoma X en anillo, mosaicismo, pérdida parcial del cromosoma Y, o no disyunción.

2- El análisis de la actividad genotóxica en células somáticas de *D. melanogaster* a través del test de mutación y recombinación somática, demostró que *D. furfuracea* no indujo ningún efecto del tipo mutación puntual, delección, no-disyunción o recombinación mitótica, en células de los linajes portadores de baja actividad de metabolización (ST), así como en células de linajes portadores de alta metabolización (HB).

3- El análisis de la actividad antigenotóxica en células somáticas de *D. melanogaster* a través del test de mutación y recombinación somática, demostró por el co-tratamiento, que *D. furfuracea* presentó un efecto de protección contra las mutaciones y recombinaciones somáticas inducidas por el uretano, en los descendientes del cruce patrón (ST), principalmente en relación a la dosis 0,042g/ml, donde hubo reducción en todos los tipos de manchas analizadas, así como la dosis 0,014g/ml, administrada en los descendientes del cruce de alta bioactivación (HB), que presentó un eficiente efecto de protección para todos los tipos de manchas analizadas. Por tanto, la eficiencia de *D. furfuracea*, en la protección contra las mutaciones y recombinaciones somáticas inducidas por el uretano, es dependiente de la dosis utilizada.

4- Los resultados obtenidos en la evaluación de la posible actividad mutagénica de la infusión de *D. furfuracea* por el test de Ames demostraron que la planta no indujo mutaciones de punto por sustitución de bases o por desplazamiento del cuadro de lectura en cepas *S. typhimurium*.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la posible actividad antimutagénica de la infusión de *D. furfuracea* por el test de Ames demostraron por el co-tratamiento que la planta presentó un efecto de protección contra lesiones inducidas por los agentes mutagénicos observándose una disminución del número de colonias revertientes. Por tanto, se puede sugerir, que la planta actuó promoviendo un efecto modulador en la disminución de la acción mutagénica, actuando, como un posible desmutagénico.

8. RESUMEN

El empleo de plantas medicinales en la recuperación de la salud ha evolucionado a lo largo del tiempo, desde las formas más sencillas de tratamiento local utilizadas por el hombre de las cavernas, hasta las formas tecnológicamente sofisticadas de fabricación industrial empleadas por el hombre moderno. Pero a pesar de haber una gran diferencia entre las dos formas de su uso hay un hecho común entre ellas: y es que el hombre percibió que existe algún factor en las plantas que cuando es administrado, sea en forma de mezcla compleja como infusiones, tinturas, polvos, etc. o como sustancia aislada pura transformada en pastillas, gotas, pomadas o capsulas, tiene la propiedad de reaccionar beneficiosamente en los organismos y resulta en el restablecimiento de la salud. Este factor es lo que se llama de principio activo, ya esté constituido por una única sustancia existente en la planta o por un conjunto de sustancias que actúan sinérgicamente, y que reciben el nombre de complejo fitoterápico. Esas sustancias pueden ser empleadas dentro de la propia planta en la forma de preparados caseros, como infusiones, tinturas y polvos, o en la forma de compuesto puro, retirado de la planta y transformado por la industria farmacéutica en capsulas, pastillas y pomadas. Por eso, la planta medicinal, cuando está bien escogida y es usada correctamente, solamente difiere del medicamento industrial hecho con la sustancia aislada, en el embalaje y las sustancias colorantes, aromatizantes, flavorizantes, y conservantes que acompañan el principio activo en ese tipo de medicamento. Basándose en este concepto, la Organización Mundial de Salud (OMS), en el ánimo de reducir el número de excluidos de los sistemas gubernamentales de salud, recomienda a los órganos responsables de la salud pública de cada país, que: a) realicen inventarios regionales de las plantas tradicionalmente usadas en la medicina popular y que las identifiquen botánicamente. b) estimulen y recomienden el uso de aquellas que tengan comprobada su eficacia y seguridad terapéuticas; c) desaconsejan el empleo de prácticas de la medicina consideradas inútiles o perjudiciales; d) desarrollen programas que permitan cultivar y utilizar las plantas seleccionadas en forma de preparaciones dotadas de eficacia, seguridad y calidad (Lorenzi, H. e Matos, F. J. A., 2002).

Actualmente, más del 25% de los medicamentos en uso son derivados naturales o productos semisintéticos de origen natural. En los países en desarrollo de América Latina (OPAS/OMS, 1996), el porcentaje de utilización de productos naturales viene aumentando considerablemente, revelando la importancia del conocimiento de la composición química, de la acción farmacológica y de los posibles efectos colaterales de esas plantas principalmente porque varias especies presentan efectos potencialmente tóxicos, mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos (Eren et al. 2015). Por otro lado, gran parte de las plantas brasileñas presentan alguna propiedad terapéutica útil a la población. Pero, a pesar de ello, hay registros que comprueban que el porcentaje de especies estudiadas desde el punto de vista fitoquímico o farmacológico no llega al 1% (Martins et al. 1995).

Los organismos vivos, en su proceso evolutivo vienen sufriendo interacciones con el ambiente, lo que ha ocasionado cambios estructurales específicos, favoreciendo la adaptación de las especies a las exigencias del medio en que viven. Por esa razón muchas plantas desarrollaron sustancias tóxicas como defensa contra depredadores, bacterias, hongos y virus (Ribeiro et al. 2003) que podrían ser potencialmente peligrosas para el ser humano.

La utilización de plantas desconocidas desde el punto de vista toxicológico, puede causar eventos mutacionales somáticos o germinativos, desencadenando enfermedades o desordenes hereditarios múltiples en los seres humanos (Corrêa et al. 1999). En contraste, algunas plantas contienen sustancias inhibitoras que interfieren en diferentes etapas de los eventos mutagénicos, presentando efectos moduladores de la mutagénesis (Waters et al. 1990).

Aunque las evidencias directas sobre el origen mutacional de las enfermedades somáticas humanas sean limitadas, inferencias obtenidas a partir de resultados experimentales en varios organismos dan apoyo consistente a la hipótesis de que muchas enfermedades tienen sus raíces en las mutaciones. Esto es particularmente claro para la relación entre mutación somática y el cáncer. La gran mayoría de los carcinógenos inician su actividad tumoral a través de interacciones específicas con el DNA de las células, provocando enfermedades genéticas permanentes, que generalmente, se expresan como mutaciones genéticas y/o alteraciones cromosómicas. Por otro lado, la identificación de los genes específicos

implicados en la inducción del cancer – los protooncogenes – y su activación por alteraciones del DNA han reforzado la idea de asociación entre la mutagenesis y la carcinogenesis (Ziljlstra and Vogel1988).

Las investigaciones en el campo de la mutagénesis, no solamente sirven como un medio de acceso para determinar el riesgo genético para las progenies, sino también, como una herramienta para evaluar los riesgos potenciales del desarrollo de tumores malignos en los individuos o poblaciones expuestas a los agentes genotóxicos químicos o físicos (Würgler et al. 1984).

La incidencia de enfermedades genéticas pueden ser reducida por la disminución en los índices de mutación. Una de las estrategias para la protección de las poblaciones humanas sería, por tanto, la identificación de los agentes mutagénicos, seguida por la implementación de medidas del control de riesgo genético, a través de la disminución de la exposición humana a estos agentes (De Flora, 1998). Así surge una nueva posibilidad para la protección de la salud humana, y es la identificación y caracterización de sustancias naturales o sintéticas que sean capaces de modular los efectos de la mutagenesis y que son llamadas de antimutagénicas (Waters et al. 1990; Hartman & Shankel, 1990). Estudios relatan que sustancias extraídas de frutas, vegetales y plantas contienen compuestos como los polifenoles, entre otros, que presentan un efecto protector del organismo contra enfermedades (Kaur et al, 2015).

Se han desarrollado pruebas para la confirmación de la mutagenecidad de los agentes físicos y químicos en *Drosophila melanogaster* capaces de medir un amplio aspecto de los daños genéticos inducidos en las células germinativas y somáticas (Graf & Singer, 1992).

D. Melanogaster ofrece ventajas y posibilidades especiales, ya que posee una variedad de marcadores genéticos que permiten la creación de varios sistemas de pruebas, capaces de detectar diferentes tipos de eventos mutacionales como: mutaciones génicas de efectos deletérios; pequeños daños que seran efectivamente transmitidos; pequeñas duplicaciones que probablemente aparecen por la inestabilidad en la replicacion del DNA; redistribución de los cromosomas estructurales como: inversiones y translocaciones; no disyunción, conduciendo a las aberraciones cromosómicas numericas y a la recombinación genética. Estos efectos

pueden ser detectados en (i) tejidos gonadales – conduciendo a las mutaciones que son transmitidas a la progenie, o (ii) en células somáticas – permitiendo el pronóstico de la formación de clones de células mutantes que se expresan como mosaicos en los individuos expuestos a los agentes mutagénicos. Los resultados que han sido logrados en las células somáticas pueden mostrar evidencias indirectas en cuanto al potencial carcinogénico de la sustancia analizada (Zijlstra et al. 1979).

La prueba ring-x-loss, realizada con *D. melanogaster* es de protocolo sencillo, y permite la detección de los efectos clastogénicos en las células germinativas pos-meióticas de machos ring-x-trados en tan solo una generación. Así, esa prueba suministra resultados de roturas cromosómicas que conducen a efectos del tipo de la pérdida del cromosoma X en anillo, pérdida parcial del cromosoma Y, mosaicismo y no disyunción. Los machos ring-x se caracterizan por poseer un cromosoma X en anillo, con marcadores para las mutaciones *y* (yellow – cuerpo de coloración amarilla) y *B* (bar-ojos reducidos en forma de barra) y un cromosoma Y con marcadores *y+* (cuerpo de coloración gris selvaje), localizado en el brazo corto y *B^s* (bar stone – ojos muy reducidos en forma de barra), localizado en el brazo largo (posibilita la detección de pérdidas parciales del cromosoma Y). Las hembras (*ywsn³*) se caracterizan por presentar en sus cromosomas X marcadores para las mutaciones *y* (yellow – cuerpo de coloración amarilla), *w* (white – ojos redondos y de coloración blanca, y *sn³* (singed – cerdas retorcidas) (Valencia et al. 1984; Zijlstra & Vogel, 1988). Las constituciones genotípicas de los linajes marcadores ring-x y hembras vírgenes *ywsn³*, son respectivamente, C1 (2) *yB/y+YB^s ywsn³/ywsn³* (Lindsley & Zimm, 1992). Para discriminar la sensibilidad de las distintas células posmeióticas de los machos ring-x, se utiliza el método de nidas cruzando los machos tratados con hembras vírgenes *ywsn³* en intervalos de 3 a 2 días tras el tratamiento del macho. Cada nidal corresponde a larvas obtenidas por fecundación con espermatozoides que fueron tratados con el agente en estudio en una fase distinta la espermatogénesis: nidal 1: espermatozoide nidal 2: espermátides adultas; nidal 3: espermátides jóvenes. Los resultados se evalúan agrupando la progenie en 11 clases fenotípicas (Zijlstra & Vogel, 1988). La prueba Ring-x-loss, permite la detección en una única generación, de eventos clastogénicos del tipo pérdida del cromosoma X en anillo, pérdida parcial del cromosoma Y, mosaicismo, y no disyunción (Cunha et al. 1992).

La prueba SMART, utiliza como marcador fenotípico la presencia de manchas en las alas y permite medir un espectro de agentes genotóxicos que inducen a mutaciones en las células somáticas de *D. melanogaster* (Würgler *et al.*, 1984). Esta prueba es sensible a una variedad de agentes mutagénicos con acción directa o que requiere bioactivación (Graf, 1995). La inducción para la pérdida de la heterozigosis de los marcadores en las células de los discos imaginales de las larvas tratadas con compuestos genotóxicos, conducen a la formación de células mutantes que después del proceso de la metamorfosis se expresan como manchas en las alas de la mosca adulta (Spanó & Graf, 1998). Para la realización de la prueba SMART-ala se utilizan linajes de *D. melanogaster* que permiten la detección de mutaciones y recombinaciones somáticas en las células de las alas, de acuerdo con el método desarrollado por Graf *et al.* (1984). Las tres linajes mutantes usados son: 1- multiple wing hairs (mwh), que posee un gen mutante (mwh) en el cromosoma nº 3 (3-0,3) en condición homocigótica y corresponde a un mutante recesivo que determina que las células de las alas presenten tres o más pelos, en lugar de uno, su constitución cromosómica es y; mwh jv (Graf *et al.* 1984, Graf *et al.* 1989); 2- flare-3 (*flr*³), que posee un gen marcador recesivo en hemizigosis (*flr*³) en el cromosoma nº 3 (3-38,8), que afecta a los pelos de las alas, cambiándolos y dándoles una apariencia de llama (Guzmán-Rincón *et al.* 1994) su constitución genética *flr*³ *In(3Lr)TM3, ri p^p sep I(3)89Aabx^{34e} e Bd^s* (Graf *et al.* 1989). 3- Linaje ORR; flare – (ORR; *flr*³) que posee un gen marcador recesivo en hemizigosis (*flr*³) en el cromosoma nº 3 (3-38,8), que afecta los pelos de las alas, dándoles aspecto de llama, y un cromosoma 2, transferido del linaje selvaje Oregon R (ORR), resistente al DDT (Dapkus e Merrel, 1977), Este último linaje se caracteriza por un aumento en la actividad de las enzimas del complejo citocromo P450 (Hällström, 1985; Guzmán-Rincón e Graf, 1995); y tiene una constitución genética ORR; *flr*³ *In(3Lr)TM3, ri p^p sep I(3)89Aabx^{34e} e Bd^s* (Graf *et al.* 1989). Frölich e Würgler (1989), pretendiendo desarrollar un linaje de moscas capaz de activar promutágenos, de una forma más eficaz, desarrollaron un nuevo linaje que lleva los cromosomas 1 y 2 del Oregon R (ORR) resistente al DDT (Dapkus e Merrel, 1977) debido a la producción de altos niveles de citocromo P-450. La característica de este linaje es, por tanto, su gran capacidad de Bioactivación (“High Bioactivacion-HB”).

Desde 1975, han sido propuestas muchas pruebas bacterianas. El desarrollo de estas pruebas se debe principalmente al avance en los conocimientos adquiridos sobre las respuestas bacterianas a los agentes químicos y físicos que causan daños en el DNA, sobre la naturaleza de esos cambios y sus procesos de reparación, así como sobre los mecanismos de mutagénesis y de su regulación enzimática. Paralelamente se ha desarrollado toda una serie de cepas bacterianas que permiten la detección de diferentes tipos de daños producidos por agentes mutagénicos (Vennit et al. 1986).

La prueba de Ames fue desarrollada por Bruce Ames y colaboradores en la década del 70, en la Universidad de Berkeley, California (Ames *et al.*, 1975) y fue perfeccionada en 1983 por Maron y Ames. Este ensayo tiene como objetivo evaluar la capacidad de determinados compuestos químicos o mezclas complejas de inducir mutaciones en el genoma de *S. typhimurium* a través de la reversión del fenotipo histidina negativo (Maron y Ames, 1983).

En esta prueba fueron utilizados los linajes de *S. typhimurium* desarrollados específicamente para detectar mutágenos que provocan un desplazamiento en el marco de lectura (frameshift) o sustitución de pares de bases del DNA. Además de las mutaciones que afectan al operon de la histidina, pueden ocurrir otras del tipo *rfa*, *uvrB* y plasmídeos *pkM101*, que otorgan mayor sensibilidad en la detección de agentes genotóxicos (Maron y Ames, 1983).

El método se basa en el empleo de linajes de *S. typhimurium* dependientes de histidina que presentan la mutación reversa cuando están en contacto con agentes mutagénicos (Ames et al. 1975; Maron e Ames, 1983; Cariello e Piegorsch, 1996). Después de un determinado periodo de incubación (48 horas a 37°C), las colonias revertientes de las placas test son contadas y comparadas con el número de las revertientes de las placas control. Dada la composición del medio de cultivo, solamente formarán colonias las células prototróficas en relación a la histidina, provenientes de mutaciones espontáneas u originadas por mutaciones provocadas por la sustancia química o por la muestra en el test. En el presente trabajo, se utilizó la prueba de Ames (sin metabolización enzimática) con las cepas TA97a TA98 TA100 y TA102 de *S. typhimurium* (Maron e Ames, 1983).

La prueba de Ames también permite realizar la identificación de contaminantes ambientales, monitorizar poblaciones humanas expuestas a productos con riesgos químicos, o confirmar la posible mutagenicidad de las plantas medicinales y los productos empleados en la quimioterapia (Rabelo-Gay et al. 1991).

La planta *Duguetia furfuracea* (St. Hil.) Benth & Hook. f. (*Annonaceae*), se localiza en la región del “Cerrado” brasileño principalmente en el Brasil Central, y presenta poblaciones con varios individuos (Silva, 1998). La infusión de su raíz ha sido empleado como calmante y antirreumático, en el tratamiento de dolores de riñones y lumbagos. La infusión de la hoja ha sido empleada en el tratamiento de enfermedades renales (Figura 1A).

La familia *Annonaceae* pertenece a la clase *Magnoliopsida*, sub-clase *Magnoliidae* y orden *Magnoliales*. Comprende cerca de 120 géneros y más de 2000 especies. Las plantas de esa familia forman árboles y arbustos tropicales y subtropicales y son conocidos porque producen diversos derivados alcaloídicos isoquinolínicos. En muchas de las especies vegetales de esa familia han sido identificadas sustancias con diferentes actividades biológicas, citotóxica, antiplasmódica, antiprotozoaria, antiparasitaria, pesticida, antimicrobiana, antifúngica, antimalárica, inmunosupresora, antioxidante y antitumoral (Sousa et al. 2000; Fehine et al. 2000; Frana et al. 2000; Garcia et al. 2000).

Silva et al. (2000), evaluaron la actividad analgésica y antiinflamatoria de la *Annona glabra* (*Annonaceae*) en ratón. Los resultados mostraron que los extractos estudiados poseen actividad antinociceptiva de modulación periférica sin que presenten actividad antiinflamatoria.

Frana et al. (2000), estudiando la familia *Annonaceae* observaron que el extracto de cáscaras de *Duguetia* sp tiene actividad citotóxica en *Artemia salina*.

Siqueira et al. (1998) realizaron estudios bioquímicos de la corteza del tallo de *Duguetia glabriuscula* (*Annonaceae*), e hicieron estudios de su toxicidad en *Artemia salina*. Así, se confirmó que la toxicidad de sus alcaloides sobre ese organismo marino correlaciona positivamente con su actividad antitumoral.

Silva et al. (1998), analizaron el efecto de los extractos de *Annona crassiflora* y *Hyptis ovalifolia* sobre *Cryptococcus neoformans* un hongo que causa la

micosis sistémica denominada criptococosis que afecta principalmente los individuos inmunocomprometidos (SIDA). Los tratamientos que se emplean actualmente para combatir la criptococosis presentan ciertos problemas debido a sus efectos secundarios. Los ensayos efectuados con el extracto bruto etanólico de las hojas de *A. crassiflora* y *H. ovaliflora* han demostrado que la mezcla de los extractos de las referidas plantas (sobretudo la fracción acuosa) poseen efectivo poder inhibitorio sobre la proliferación de *C. neoformans*.

Garcia et al. (2000), realizaron la actividad de extractos vegetales de las familias *Combretaceae*, *Apocynaceae*, *Annonaceae* sobre *Artemia salina*. Los resultados obtenidos demostraron que los extratos de *Annona coriacea* presentaron la mayor toxicidade en *A. salina*. La substancia acetogenina tetra-hidrofuránica, posiblemente la (+)-gigantecina, fue aislada de las hojas de la *A. coriacea* y se mostró activa en las células del carcinoma mamario humano.

Otros estudios realizados con la familia *Annonaceae*, han indicado la presencia de otros constituyentes con comprobada actividad biológica, como el cálcio, fosforo, hierro, carotenoides, vitamina B1, B2 y la vitamina C (Agostini et al. 1996; Almeida et al. 1987), además la clase de las acetogeninas, que presentan gran interés, particularmente las del género *Annona* (Santos et al. 1994).

Jolad et al. (1982), sometieron a prueba el extracto etanólico de las raíces de *Uvania accuminata* y de él aislaron la primera acetogenina de *Annonaceae*, una substancia que presentó actividad citotóxica, antiparasitaria y antitumoral en el sistema PS (leucemia linfocítica en los ratones) *in vivo*.

Actualmente hay un gran interés en identificar nuevos compuestos que posean propiedades farmacológicas, que no sean genotóxicos y que presenten actividades antimutagénica (Kasuba et al. 1999).

OBJETIVO

El empleo indiscriminado de plantas medicinales brasileñas por la población ha puesto en alerta sobre la necesidad de desarrollar experimentos que confirmen los posibles efectos mutagénicos y/o antimutagénicos de las mismas (Chen-Chen e Sena, 2002). El presente trabajo tiene como propósito investigar estos posibles efectos en la planta medicinal *D. furfuracea* mediante la prueba ring-x-loss,

que permite la detección de la posible actividad genotóxica en *D. melanogaster*, informando de la respuesta de las células germinativas a los mutágenos, a través de la detección de la pérdida del cromosoma X en anillo (Cunha et al. 1992), mediante la prueba de mutación y recombinación somática (SMART-ala), Graf et al. (1984), que pone de manifiesto la actuación de los mutágenos sobre células somáticas, y mediante la prueba de Ames, que permite medir la mutagenicidad en la bacteria *S. typhimurium* a través del análisis de las células revertientes para la prototrofia de histidina (Maron e Ames, 1983).

EXPERIMENTO I

En el experimento I consistió en el desarrollo de la prueba para la detección de la pérdida del cromosoma X en anillo. El empleo de ensayos como el RXL en una única etapa de la espermatogénesis puede llevar a resultados falso negativos. Sin embargo, cuando se realiza este ensayo empleando la metodología de nidales, que consiste en el cruzamiento sucesivo de los machos tratados con nuevas hembras vírgenes en intervalos de 3, 2 o 1 día respectivamente, se analizan células tratadas en diferentes etapas de la espermatogénesis, asegurando así la eficacia de los resultados obtenidos (Zijlstra e Vogel, 1988).

En nuestro estudio se emplearon machos del linaje marcador ring-x y hembras vírgenes *ywsn*³, cuyos rasgos genotípicos son respectivamente, C1 (2) *yB/y+YB^s ywsn³/ywsn³* (Lindsley e Grell, 1968; Lindsley e Zimm, 1992).

El compuesto uretano (etil carbamato; etil uretano; ácido ester carbámico), $C_3H_7NO_2$ fue empleado para el control positivo por presentar alta toxicidad y acción carcinogénica (Choy et al. 1996). Para el control negativo se empleó agua destilada esterilizada.

Para el mantenimiento de *D. melanogaster* se emplearon frascos de 250ml que contenían medio de cultura específico (820 ml de agua, 25g de levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*), 11g de agar, 156g de plátano, 1g de nipagin (Graf et al. 1984).

Con el objetivo de definir las dosis de *D. furfuracea* que permitan la supervivencia en el medio de cultivo, empleamos la metodología presentada por Lewis y Bacher (1968), con modificaciones.

Machos del linaje marcador ring-x, con 2-3 días de edad, fueron sometidos a un ayuno de 4 horas. Enseguida fueron tratados durante 24 horas, por ingestión de 3 diferentes dosis de infusión de la planta *D. furfuracea* (0,085g/ml; 0,042g/ml; 0,014g/ml). Para el control positivo se empleó, uretano en una concentración de 20mM y para el control negativo agua destilada esterilizada. Fueron distribuidos 2 ml de cada solución por cada tubo de fondo plano con una lámina de algodón de 1.0 cm, cubierta con papel filtro, para evitar la adherencia de las moscas. Fueron colocados 10 machos por tubo, totalizando 20 repeticiones por tratamiento. Trascorrido el periodo de tratamiento los machos fueron transferidos a tubos de ensayo que contenían medio de plátano-agar para proceder de los cruzamientos con hembras vírgenes no tratadas del linaje marcador ywsn³. Las hembras, con 2-3 días de edad, se colocaron en la proporción de 1:1 por tubo, durante tres días, para la obtención de la primera nidada. Luego, las hembras fueron retiradas y los machos transferidos a nuevos tubos y sometidos a otro cruzamiento con nuevas hembras vírgenes ywsn³ durante dos días. De esta forma se obtuvo la segunda nidada. Nuevamente las hembras fueron rechazadas y los machos transferidos y sometidos al tercera cruzamiento por otros dos días para la obtención de la tercera nidada. De esta forma se obtuvieron 3 nidadas que representan muestras homogéneas de células germinativas tratadas en diferentes estadios de la espermatogénesis. Los ensayos fueron realizados a una temperatura de aproximadamente 25° + 1°C y una humedad relativa de aproximadamente el 60% (Lewis e Bacher, 1968). El experimento fue realizado por triplicado.

Después de diez días del cruzamiento se produjo la emergencia de la generación F1 de *D. melanogaster* que fue analizada, mediante la observación de los fenotipos. Los individuos de esta progenie fueron agrupados en 11 clases fenotípicas, siendo que las clases 1 y 2 las que corresponden a los descendientes normalmente esperados (no-mutantes); y las clases 3 a 11 las mutantes. (Valencia et al. 1984; Zijlstra e Vogel, 1988).

Los datos que se obtuvieron fueron comparados utilizando el test de χ^2 . La frecuencia de la pérdida completa del cromosoma X en anillo fue calculada mediante la suma de los individuos pertenecientes a la clase 3 ($X_m/0$) y los individuos de la clase 4 – mosaico – ($X_m/0-X_m/X_p$) dividida por la suma de los individuos pertenecientes a las clases: 1(X_p/X_m); 3 ($X_m/0$); 4 ($X_m/0-X_m/X_p$); 5

($X_m/X_p/y+YB^s$) y 11 (X_p/o) de cada experimento. Se utilizó como resultado la media de las tres réplicas (Frei & Würigler, 1988).

El análisis estadístico para del experimento ring-x-loss fue realizado considerándose dos hipótesis simultáneamente: H_0 : hipótesis nula y H_a : hipótesis alternativa que permite clasificar los resultados como: positivo, negativo, débil-positivo o inconclusivo. (Quadro 1A). Se compararon los valores encontrados de X^2 con el X^2 unilateral = 2.706 y con $P < 0,05$ (1GL), pudiéndose aceptar o no H_0 , dependiendo del resultado (Frei & Würigler, 1988).

En las las repeticiones I, II y III (tabla 1A) se puede observar que los descendientes de *D. melanogaster* provenientes de los machos del linaje marcador ring-X tratados con *D. furfuracea* en las dosis 0,085g/ml, 0,042g/ml y 0,014g/ml, y cruzados con hembras vírgenes $ywsn^3$, no presentaron aumento en la pérdida completa del cromosoma X en anillo, pérdida parcial del cromosoma Y, mosaicismo y no disyunción, estadísticamente significativos ($P > 0,05$) para los nidales 1, 2 y 3 respecto del control negativo.

En la tabla 1A, se puede observar que los nidales 1, 2 y 3 tratados con uretano (20mm), presentan resultados positivos ($P > 0,05$) para las clases 1 (X_p/X_m) hembras regulares; clase 2 ($X_m/y+YB^s$) machos regulares; clase 3 ($X_m/0$) pérdida completa del cromosoma X en anillo; clase 4 ($X_m/0-X_m/X_p$) mosaico; clases 6, 7 y 8 ($X_m/y+Y$; X_m/YB^s ; $X_m/y+YB^s-X_m/YB^s$) pérdida parcial del cromosoma Y. En base a los resultados obtenidos en las clases 5, 9, 10 y 11 ($X_m/X_p/y+YB^s$; $X_m/X_{my}+YB^s$; X_m/X_m y X_p/o) se comprobó que el porcentaje de pérdida del cromosoma X en anillo para el nidal 1 fue del 6.42% (± 0.79); para el nidal 2 del 7.40% (± 1.10); para el nidal 3 del 6.43% (± 0.50). Por tanto, y de acuerdo con la literatura se comprobó que la actuación del uretano presentó una acción genotóxica en las células germinativas de todos los nidales analizados (Foureman et al. 1994).

Al analizar los datos obtenidos de los nidales 1, 2 y 3, y tratados con agua destilada esterilizada (control negativo), se observó que para la clase 1 (X_p/X_m), 2 ($X_m/y+YB^s$), 3 ($X_m/0$), 4 ($X_m/0-X_m/X_p$), 6, 7 y 8 ($X_m/y+Y$; X_m/YB^s ; $X_m/y+YB^s - X_m/YB^s$), 5, 9, 10 y 11 ($X_m/X_p/y+YB^s$; $X_m/X_{my}+YB^s$; X_m/X_m y X_p/o), el resultado fue negativo. El porcentaje de pérdida del cromosoma X en anillo para el nidal 1 fue de

del 1.12% (± 0.14); para el nidal 2, 1.33% (± 0.39); y para el nidal 3 del 1.21% (± 0.11). Estos resultados están de acuerdo con la literatura (Wijen et al. 2001).

Los resultados obtenidos en los nidales 1, 2 y 3 y tratados con la dosis-1 (0.085g/ml), fueron negativos para las clases 1 (X_p/X_m); clase 2 ($X_m/y+YB^s$); clase 3 ($X_m/0$); clase 4 ($X_m/0-X_m/X_p$); clases 6, 7 y 8 ($X_m/y+Y$; X_m/YB^s ; $X_m/y+YB^s-X_m/YB^s$); clases 5, 9, 10 y 11 ($X_m/X_p/y+YB^s$; $X_m/X_{my}+YB^s$; X_m/X_m y X_p/o). Los resultados que se obtuvieron con la dosis 0.085g/ml en el nidal 1, presentaron una media de la pérdida completa del cromosoma X en anillo del 1,38% (± 0.06). Por tanto se observó que en esta dosis no hubo un aumento estadístico significativo en relación al control negativo 1.12% (de pérdida completa en el mismo nidal). Para el nidal 2 la media fue del 1.15% (± 0.03), este valor se asemeja al valor del control negativo del nidal 1, que presento una media del 1.12% (± 0.14). Para el nidal 3, la media del 1.18% (± 0.11), un valor proximo del control negativo y que en este nidal fue del 1.21% (± 0.11).

Por los resultados obtenidos de los nidales 1, 2 y 3 tratados con la dosis 0.042g/ml, podemos observar que para las classes analizadas, los resultados también fueron negativos, presentando el nidal 1, una media de pérdida del cromosoma X en anillo del 1.17% (± 0.11) (1.12% en el control negativo). El tratamiento con esta misma dosis, presento en el nidal 2 una media del 1.22% (± 0.12), y en el nidal 3 una media del 1.18% (± 0.11), valores ambos semejante a los de sus respectivos controles negativos.

El tratamiento con la dosis-3 (0.014g/ml), también proporcionó resultados negativos para las clases analizadas. El nidal 1 presento una media del 1.17% (± 0.15). y en el nidal 2 esta dosis presentó una media del 1.14% (± 0.16). El nidal 3 presentó una media del 1.21% (± 0.11).

Nunes y Carvalho, (2003) relataron que la pérdida completa del cromosoma X en anillo (clase 3) puede estar relacionada con eventos del tipo de rupturas cromosómicas (Leigh, 1976; Vogel y Natarajan, 1979). Sin embargo, algunas evidencias experimentales indican que la ocurrencia de permutación entre las cromatidas hermanas puede ser un mecanismo alternativo que también conduce a la pérdida completa del cromosoma X en anillo (Würgler e Graf, 1980). Consecuentemente la pérdida completa del cromosoma X en anillo puede reflejar

dos tipos de fenómenos que están relacionados tanto con roturas cromosómicas simples o dobles, como, con permutaciones de las cromátidas hermanas (Valencia *et al.*, 1984). El mosaicismo confirmado en las clases 4 y 8 puede ser ocasionado por la pérdida del cromosoma X durante la división (Leigh, 1976), pero puede ser también ocasionado por el *crossing-over* (Leigh, 1976; Zilstra e Vogel, 1988) La pérdida parcial del cromosoma Y (clases 6 y 7) tal vez se debe a la pérdida de los marcadores para los brazos cortos y largos de este cromosoma. En este caso la mayoría de las pérdidas parciales de los cromosomas ocurrieron debido a las roturas cromosómicas. Tales eventos son relativamente raros en los cromosomas Y en comparación con el cromosoma X en anillo. La pérdida de los B marcadores situados en la parte larga del cromosoma Y está relacionada con el resultado de la quiebra del cromosoma, mientras que la pérdida de la parte corta y+ del marcador puede deberse a deleciones o mutaciones de punto. Valencia *et al.*, (1984), analizando la prueba ring-x-loss, propusieron que los resultados de la no disyunción comprobada en las clases 5, 9, 10 y 11, ocurrieron, debido a la pérdida o ganancia de cromosomas enteros. El presente estudio, mostró una correlación con la literatura arriba citada, en lo que se refiere a la ocurrencia de mutaciones espontáneas en el control negativo, así como a las mutaciones inducidas por *D. furfuracea* (valor próximo al de mutaciones espontáneas), y en el control positivo que claramente mostraba inducción de la actividad mutagénica en las clases en estudio.

En *Drosophila*, hay diferencias en la reparación del DNA en los machos y en las hembras. En los machos tratados, la reparación de los daños premutagénicos ocurre en las células germinativas jóvenes (premaduras), pero no en los espermatozoides maduros porque estos no poseen sistemas enzimáticos eficientes. Es la llamada reparación paterna (Vogel y Natarajan, 1995). Smith *et al.* (1993), comparando la mutabilidad inducida por el EMS (etilmetanosulfonato) y MMS (metilmetanosulfonato) en varios estadios de células germinativas de la espermatogénesis del mutante "mei-9AT1", que presenta una reparación del DNA, deficiente, y de un linaje control reparación-eficiente, comprobaron que los procesos de reparación del DNA funcionan hasta el inicio de la meiosis y son inactivos en las células posmeióticas. Por consiguiente, las células premeióticas (gonias), presentan mayor capacidad de reparación y, en consecuencia, baja mutabilidad. Estos estadios se asocian con bajas fertilidades, mientras que en general, se observa un

patrón de alta mutabilidad en las células pos meioticas, que son las más fértiles. Por ello, la reparación paraterna es menos eficiente, porque solamente actúa en las células jóvenes. La reparación puede ocurrir también en el ovocito, después de la fertilización. Es el llamado sistema de reparación materno (Vogel, 1989). El empleo para estos tests de ovocitos que presentan alteraciones en los mecanismos de reparación puede proporcionar, en presencia de ciertos mutagénicos, un aumento de las mutaciones, constituyendo el efecto conocido como hipermutabilidad (Vogel e Natarajan, 1995).

Graf y Wügler (1982), relataron, que los daños inducidos en los espermatozoides de *D. melanogaster* pueden conducir a las mutaciones, pero las frecuencias de la pérdida del cromosoma sexual en los espermatozoides recuperados, dependen también del tipo de hembras empleadas en los cruzamientos, habiendo por tanto un efecto materno. Los espermatozoides mutagenizados aumentan la frecuencia de pérdida del cromosoma sexual cuando ocurre una deficiente reparación por excisión ($mei9^a$) en los ovocitos. Vogel y Narajan (1995), observaron que el funcionamiento eficaz del sistema de reparación materno tras la fertilización, es importante para la remoción de los defectos en el DNA de las células germinativas paternas. Cuando una sustancia mutagénica presenta efectos que incluyen roturas cromosómicas y/o no disyunción, esta expone al individuo al riesgo de afectar sus células somáticas y probablemente, sus descendientes, vía células gaméticas (Valência et al. 1984).

En la prueba ring-x-loss, el control positivo utilizado fue el uretano a una concentración de 20mM. Freese (1965) estudiando los efectos del hidroxietano que se producen por la metabolización del uretano, comprobó que éste presenta gran afinidad por el DNA. De acuerdo con el autor, el mecanismo de acción del hidroxietano en el DNA está directamente relacionado con el hecho de que el compuesto (hidroxietano) presenta un radical libre $-NHOH$ que rápidamente interacciona con el DNA. Según éste autor muchas mutaciones inducidas por el hidroxietano son motivadas por el cambio de un único par GC por un AT. El hidroxietano y sus derivados, bajo condiciones fisiológicas, reacciona con los ácidos nucleicos o sus constituyentes básicos o con proteínas, acetilando específicamente el grupo amino primario de citosina (IARC, 1974).

El epoxivinil carbonato (VCO), otro metabolito del uretano, posee fuerte actividad electrofílica con capacidad de interacción con el DNA formando aductos con las purinas (adenina y guanina) de *S. typhimurium* (Park et al. 1993).

Abraham et al. (1998), comprobaron por medio de la prueba de micronucleos en ratones, que extractos vegetales (zanahoria, espinaca y repollo café y té), presentan una atenuación de los efectos mutagénicos, cuando coadministrados con el uretano.

Guerra (1994), con la prueba ring-x-loss, analizó la posible acción genotóxica de la planta medicinal boldo (*Vermonia condensata*), deduciendo que las pérdidas totales o parciales y la no disyunción en células posmeioticas de *D. melanogaster*, no fueron significativas.

Pereira (1999), utilizando la prueba ring-x-loss para confirmar el posible efecto genotóxico de la planta medicinal *Hiptidendron canun*, observó que la misma, no ejerció actividad clastogénica en lo que se refiere a la pérdida total del cromosoma X en anillo, mosaicismo, pérdida parcial del cromosoma Y y no disyunción en las células germinales de *D. melanogaster*.

Nunes e Carvalho (2003), evaluaron el potencial mutagénico de la planta medicinal “algodãozinho-do-campo” (*Cochlospermum regium*) en células germinales de *D. melanogaster*, por medio de la prueba ring-x-loss, obteniendo con la dosis 0,013g/ml en el nidial 3, un valor de pérdida del cromosoma X en anillo del 1,13%. Este valor está próximo al valor encontrado con *D. furfuracea* en la dosis 0,085g/ml, en el nidial 2, mostró una pérdida del cromosoma X en anillo del 1,15% ($\pm 0,03$).

Los resultados obtenidos con *D. furfuracea* por la prueba ring-x-loss, pueden ser correlacionados con el trabajo de Souza et al. (2003), sobre el efecto de *Stryphnodendron adstringens* en células germinativas de *D. melanogaster*. Estos autores encontraron un 1,37% de pérdida completa del cromosoma X en anillo para el nidial 3, con la dosis de 66% del extracto de esa planta, un valor próximo al que fue encontrado con *D. furfuracea* en la dosis 0,085g/ml, que en el nidial 1 fue del 1,38% ($\pm 0,06$). Fue comprobada una semejanza en relación al control negativo, que para *S. adstringens* fue del 1,82% para el nidial 2 y para *D. furfuracea* en el nidial 3, este valor fue del 1,21% ($\pm 0,11$). El control positivo empleado en ambos trabajos fue el uretano (20mM) y para la prueba con *S. adstringens* la pérdida completa del

cromosoma X en anillo para el nidial 1, fue del 4,58%; para el nidial 2 del 7,71%; y para el nidial 3 del 7,52%. En el presente trabajo, el control positivo presentó un resultado semejante, siendo el 6,42% ($\pm 0,79\%$) en el nidial 1; el 7,4% ($\pm 1,10$) en el nidial 2 y el 6,43% ($\pm 0,50$) en el nidial 3. De esa manera, fue posible constatar que los resultados obtenidos con *D. furfuracea* están de acuerdo con los referidos por la literatura para otras plantas medicinales.

Resultados contrarios al presente trabajo fueron encontrados por Pinho et al. (2014), en la evaluación del potencial de toxicidad hidroalcohólica en extractos de hojas de *D. furfuracea* (HEDF) en un modelo de *Drosophila melanogaster*. La toxicidad fue evaluada como variación de desempeño locomotor, actividades mitocondrial, estrés oxidativo, MAPKs fosforilación e inducción de apoptosis tras exposición a concentrados HEDF (1-50 mg / mL) durante 7 días. Los resultados obtenidos sugieren el estrés oxidativo como un importante mecanismo subyacente a su toxicidad.

Silva et al. (2012), evaluaron la genotoxicidad y citotoxicidad del extracto liofilizado de hojas de *Duguetia furfuracea* utilizando los testes de inducción profago λ (SOS-Induteste) y de micronúcleo en la medula ósea de ratas. Los resultados mostraron que *D. furfuracea* no presentó aumento en la inducción del profago λ ($P > 0,05$) en el Induteste-SOS tampoco fue observado aumento del número de eritrocitos policromáticos micronucleados ($P > 0,05$), en el Test del Micronúcleo, sugiriendo ausencia de genotoxicidad en ambas pruebas. Por otro lado, fue observada una reducción significativa en el número de bacterias, ($P < 0,05$), y una reducción significativa en la relación entre eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocromáticos, ($P < 0,05$), indicando acción citotóxica del extracto liofilizado de hojas de *Duguetia furfuracea*. Así, *D. furfuracea* no presentó acción genotóxica, pero mostró un efecto citotóxico en ambas pruebas utilizadas en este trabajo.

Ante los resultados presentados, fue posible confirmar que *D. furfuracea* no indujo un aumento significativo de las frecuencias de las aberraciones cromosómicas, no disyunción o mosaicismo en las células germinales de *D. melanogaster* que sean detectables mediante la prueba de ring-x-loss.

EXPERIMENTO II

En el experimento II, fue realizada la prueba para la detección de mutaciones y recombinaciones somáticas (SMART). La realización de ese ensayo, tuvo por finalidad, comprobar la posible presencia de actividad genotóxica y/o antigenotóxica de *D. furfuracea* en las células somáticas de *D. melanogaster*. Para este ensayo se utilizaron linajes de *D. melanogaster* portadoras de marcadores específicos, localizados en el cromosoma 3.

Para la realización del cruzamiento patrón (ST – “Standard Cross”), se utilizaron hembras vírgenes *flr3 /In (3LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx34e e Bd^s* que fueron cruzadas con machos *mwh/mwh* (Graf et al. 1989). Para la realización del cruzamiento de alta capacidad de bioactivación (HB – “High Bioactivation Cross”), fueron utilizadas hembras vírgenes *ORR; flr3/In(3LR)TM3, ri pp sep I(3)89Aa bx34e e Bd^s* que fueron cruzadas con machos *mwh/mwh* (Graf e Van Schaick, 1992).

Los controles empleados en este experimento, así como el medio de cultivo y las dosis de *D. furfuracea* fueron los mismos descritos en el experimento I.

El procedimiento experimental fue realizado para los dos tipos de cruzamientos (ST y HB) con machos del linaje marcador *mwh*, con 2-3 días de vida, que fueron cruzados con hembras vírgenes *flr3* o *ORR, flr3*, con 1-2 días de vida, en medio de cultivo patrón durante 8 horas, en la proporción de un macho para dos hembras. Transcurrido el periodo del cruzamiento las parejas fueron transferidas a frascos (250ml) que contenían medio de ovoposición, donde permanecieron durante 8 horas. Después de este intervalo los adultos fueron desechados. Aproximadamente 72±4h después del inicio de la ovoposición, fueron colectadas larvas del tercer estadio, por flotación en agua destilada. Para la prueba de mutagenicidad fueron distribuidas cerca de 50 larvas en cada tubo de fondo plano que contenía 1,5g de medio sintético y adicionados 5 ml de las diferentes dosis de la infusión de *D. furfuracea* (0,085g/ml; 0,042g/ml; y 0,014g/ml). Para el cotratamiento (Figura 2B), se utilizaron las mismas dosis, siendo añadido uretano a 20mM. Para el control negativo, se empleó agua destilada y para el control positivo uretano 20mM. Las larvas sometidas al tratamiento crónico, via cotratamiento, permanecieron por un periodo de aproximadamente 48 horas, hasta que alcanzaron el estadio de pupa (ninfa). Los adultos fueron almacenados en etanol al 70%. Los experimentos fueron realizados a una temperatura de aproximadamente 25%±⁰C y una humedad relativa

del 60%. Los experimentos se realizaron por triplicado (Graf et al. 1984; Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

Las alas de los imagos fueron retiradas del cuerpo, embebidas en solución de Faure (30g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 1,5g de hidrato de cloral, y 50 ml de agua destilada) y dispuestas sobre un porta seco, mantenido en estufa a 40°C, durante 24 horas. Después del montaje de la lámina, la misma permaneció por más 24 horas en la estufa a 40°C. Las alas fueron analizadas en microscopio óptico de luz (objetivo 40X) analizando sus superficies dorsal y ventral. Para la detección de manchas, fueron considerados los tricomas presentes en las alas, donde cada uno representa una célula. Las manchas fueron clasificadas de acuerdo con el tamaño, la posición en que fueron detectadas y los tipos: sencillas o gemelas (Graf et al. 1984).

Para la evaluación de los posibles efectos mutagénicos de *D. furfuracea* fue realizado un análisis estadístico con un procedimiento de decisión múltiple (Cuadro 1A), que permite distinguir entre cuatro resultados diferentes: positivo, débil positivo, negativo e inconclusivo (Frei y Würgler, 1988). Para la evaluación de los experimentos de la antimutagenicidad, se utilizó la prueba estadística para un nivel de significación del 5%, desarrollado por Frei y Wügler (1995).

En la comprobación de la posible actividad mutagénica, los descendientes MH (marcadores heterocigotos) de *D. melanogaster* del cruzamiento padrón (ST), tratados con *D. furfuracea* en las dosis 0,085g/ml; 0,042g/ml y 0,0014g/ml, no presentaron aumento estadísticamente significativo, ($P>0,05$) para las frecuencias de manchas pequeñas simples, grandes simples, gemelas ni para el total de las manchas, respecto del control negativo (Figura 2C).

Las frecuencias de manchas pequeñas simples, grandes simples, gemelas y el total de manchas que se obtuvieron entre los descendientes MH del cruzamiento HB (Tabla 2A), en las dosis 0,085g/ml; 0,042g/ml de *D. furfuracea*, no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$) respecto de las observadas en el control negativo (Figura 2D).

Tampoco las frecuencias de manchas que se obtuvieron en los descendientes del cruzamiento HB con *D. furfuracea* (0,014g/ml) presentaron aumento estadísticamente significativo ($P>0,05$) para las manchas pequeñas

simples, gemelas y para el número total de manchas, cuando fueron comparadas con el control negativo (Figura 2D).

El control positivo presentó un aumento estadísticamente significativo en las frecuencias de manchas pequeñas simples (Figura 2G,a), grandes simples (Figura 2H,a), gemelas (Figura 2H,b) y en el total de manchas respecto del control negativo. Las frecuencias de manchas espontáneas (Figura 2G,a) obtenidas en el control negativo y observadas en los descendientes del cruzamiento ST y HB, son compatibles con la literatura (Graf e Van Shaik, 1992).

Este test se ha utilizado para la evaluación de diferentes sustancias proporcionando información sobre su potencial mutagénico.

Resultados contrarios a los que se obtuvieron con *D. furfuracea*, fueron encontrados por Frei et al. (1995), cuando realizaban ensayos con *D. melanogaster* para la evaluación del potencial mutagénico de la planta medicinal *Aristolochia clematidis*. Los autores constataron mediante la prueba SMART-ala, que esta planta fue capaz de inducir mutaciones y recombinaciones mitóticas en células somáticas.

La vitamina C (ácido ascórbico) encontrada en muchas frutas y vegetales (Ferguson, 1994) fue estudiada por Triparthy et al. (1990), que utilizaron la prueba de SMART-ala, para la comprobación de su posible efecto mutagénico. Los resultados encontrados, demuestran que el ácido ascórbico no indujo efectos genotóxicos que afecten a las manchas de las alas de *D. melanogaster*.

Sousa et al. (2003), estudiando la posible presencia de la actividad genotóxica del fitoterápico *Stryphnodendron adstringens* en las células somáticas de *D. melanogaster*, mediante la prueba SMART-ala, confirmaron que no hubo aumento estadísticamente significativo en los resultados obtenidos. Por lo tanto, el presente trabajo puede ser correlacionado con el de estos autores, por presentar características semejantes. La planta *S. adstringens* presentó, en los cruzamientos (ST) y (HB) del control negativo una frecuencia para el total de manchas de 0,41(23) y 0,37(20) respectivamente, mientras que para *D. furfuracea* los valores para los cruzamientos (ST) y (HB) fueron de 0,21(13) y 0,28(17) respectivamente. La dosis de 100% de *S. adstringens* presentaron en el cruzamiento (ST) un valor de frecuencia de manchas inducidas, 0,18 (11) mientras que con la planta *D. furfuracea* se obtuvieron para las dosis 0,085g/ml y 0,042g/ml valores de 0,11(07). En el

cruzamiento (HB), las dosis de 66%, 75% y 100% de *S. adstringens*, presentaron para el total de manchas inducidas, los valores de 0,30(18); 0,42(25) y 0,42(25) respectivamente, mientras que *D. furfuracea* presentó para las dosis 0,085g/ml; 0,042g/ml y 0,014g/ml un valor de 0,13(08) para el referido cruzamiento. De esa forma quedó evidenciada la ausencia de actividad genotóxica en las dos plantas estudiadas.

Dogan & Yesilada (2015), evaluaron el efecto mutagénico de Resveratrol (compuesto polifenólico) por el test SMART-ala (ST). Las dosis (0.1; 0.2; 0.5; 0.75; 1mM) presentaron respectivamente los siguientes resultados: (ST): 0.11 (8); 0.15 (11); 0.16 (12); 0.21 (14); 0.25 (10). Estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos en este trabajo con *D. furfuracea* con el cruzamiento ST (0.10 (06); 0.11 (07); 0.11 (07). De esa manera, fue posible constatar que los resultados obtenidos con *D. furfuracea* y Resveratrol no presentaron efectos mutagénicos, clastogénicos y/o recombinogénicos en células somáticas de *D. melanogaster*.

Resultados semejantes a este, fueron obtenidos por Cardoso et al, (2015), cuando realizaron la evaluación mutagénica del extracto acuoso de propolis roja por el test SMART-asa. Las dosis 0,125; 0,25; 0,5 mg/mL presentan los siguientes resultados: (ST): 0,45(09); 0,60(12); 0,50(10); (HB): 0,75(15); 0,75(15) respectivamente. Los cruzamientos (ST) y (HB) no presentaron efectos mutagénicos, clastogénicos y/o recombinogénicos, con o sin activación metabólica por enzimas del sistema citocromo P450, en células somáticas de *D. melanogaster*.

Para la confirmación de la posible actividad antigenotóxica de *D. furfuracea* en las células de *D. melanogaster* se utilizó el cotratamiento (Figura 2B), que fue realizado con larvas del tercer estadio (72 ± 4 horas de edad), provenientes del cruzamiento (ST) y (HB), y con las diferentes dosis de infusión (0,085g/ml; 0,042g/ml y 0,014g/ml), asociadas al uretano (20mM).

Por los resultados encontrados (Tabla 2B) en la repetición I (ST), con la dosis de 0,085g/ml de *D. furfuracea* + uretano (20mM), se puede observar un aumento estadísticamente significativo ($P > 0,05$) en las manchas grandes simples y gemelas, respecto del control positivo. Sin embargo, hubo una disminución estadísticamente significativa ($P < 0,05$) de las manchas pequeñas simples y del total de manchas, respecto del mismo. La dosis 0,042g/ml + uretano (20mM) también

mostró un aumento estadísticamente significativo ($P > 0,05$) de las manchas grandes simples y gemelas en relación al control positivo, así como una disminución estadísticamente significativa ($P < 0,05$) de las manchas pequeñas simples y del total de manchas respecto del control positivo (figura 2E).

También en relación a la tabla 2B, se pueden observar los resultados obtenidos en la repetición II (ST), con la dosis de 0,085g/ml de *D. furfuracea*, asociada al uretano (20mM), que presentó una reducción estadísticamente significativa ($P < 0,05$) de las manchas pequeñas simples, gemelas y del total de manchas, respecto del control positivo. Las manchas grandes simples presentaron una diferencia significativa. La dosis 0,042g/ml + uretano (20mM) mostró que hubo una reducción estadísticamente significativa ($P < 0,05$) de las manchas pequeñas simples, grandes simples, gemelas y total de manchas. La dosis inferior 0,014g/ml + uretano (20 mM) también provocó una reducción estadísticamente significativa ($P < 0,05$) de las manchas pequeñas simples, gemelas y del total de manchas, respecto del control positivo, no observándose ninguna diferencia en cuanto a las manchas grandes simples (Figura 2E). Las manchas grandes simples o gemelas se originan por alteraciones en el material genético en un momento del desarrollo embrionario (Frei e Würigler, 1988); y su ausencia indica un efecto tardío del uretano debido a su asociación con la planta medicinal *D. furfuracea*.

Los resultados obtenidos en la repetición III (Tabla 2B), del cruzamiento (ST), demuestran que hubo un aumento estadístico ($P > 0,05$) respecto del control, de manchas pequeñas simples, grandes simples, gemelas y del total de manchas con las dosis; 0,085g/ml; 0,042g/ml y 0,014g/ml de *D. furfuracea* asociadas al uretano 20mM.

El efecto protector obtenido por el cotratamiento de *D. furfuracea* asociado con uretano en el cruzamiento padron (ST), presentó en la repetición I un índice de protección para el total de manchas de 11% para la dosis (0,085 g / ml); 88% para la dosis (0,042g / ml); y 93% para la dosis (0,014g / ml). En la repetición II presentó 95% para la dosis (0,085 g / ml); 65% para la dosis (0,042g / ml); y 89% para la dosis (0,014g / ml). En la repetición III presentó 96% para la dosis (0,085 g / ml); 98% para la dosis (0,042g / ml); y 93% para la dosis (0,014g / ml).

Por lo que respecta a los cruces (HB) los resultados encontrados en la repetición I (Tabla 2B) con la dosis de 0,085g/ml de *D. furfuracea* + uretano (20mM), muestran que hubo reducciones estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en las manchas pequeñas simples, gemelas y en el total de manchas respecto del control positivo. Las manchas grandes simples presentaron una diferencia no significativa. La dosis 0,042g/ml + uretano (20mM), provocó reducciones estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en las manchas pequeñas simples, gemelas y en el total de manchas, no observándose diferencias en cuanto a las manchas grandes simples. . La frecuencia de las manchas observadas en la dosis 0,014g/ml + uretano (20mM), muestra que también con esta dosis hubo una reducción estadísticamente significativa ($P < 0,05$) en las manchas pequeñas simples, grandes simples, gemelas y para el total de manchas, respecto del control positivo (Figura 2F).

Los resultados que se obtuvieron (Tabla 2B) en la repetición II (HB), demostraron que con la dosis mas elevada (0,085g/ml) de *D. furfuracea* + uretano 20mM), así como la intermedia (0,042g/ml + uretano 20mM) hubo una reducción estadísticamente significativa ($P < 0,05$) de las manchas pequeñas simples, grandes simples y del total de manchas y un aumento significativo de las manchas gemelas. Los resultados obtenidos con la dosis 0,014g/ml + uretano (20mM), solo muestran una reducción significativa ($P > 0,05$) de las manchas pequeñas simples, grandes simples, gemelas y del total de manchas. (Figura 2F).

En la Tabla 2B se puede observar que las frecuencias de manchas que se obtuvieron en la repetición III (HB), por la asociación de la dosis de 0,085g/ml de *D. furfuracea* + uretano (20mM), presentaron reducciones estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en las manchas pequeñas simples, y para el total de manchas, respecto del control positivo. Sin embargo hubo un aumento significativo en las manchas grandes simples y gemelas. La dosis 0,042g/ml + uretano (20mM), provocó reducciones significativas ($P < 0,05$) en las manchas pequeñas simples y en el total de manchas, así como un aumento significativo en las manchas grandes simples y gemelas. La frecuencia de las manchas observadas con la dosis 0,014g/ml + uretano (20mM), muestra una reducción significativa ($P < 0,05$) en las manchas pequeñas simples. Las manchas grandes simples y gemelas presentaron un aumento estadísticamente significativo, mientras que el total de manchas mostró una diferencia no significativa (Figura 2F).

El efecto protector obtenido por el cotratamiento de *D. furfuracea* asociado con uretano en el cruzamiento de alta bioactivación (HB), presentó en la repetición I un índice de protección para el total de manchas de 90% para la dosis (0,085 g / ml); 93% para la dosis (0,042g / ml); y 93% para la dosis (0,014g / ml). En la repetición II presentó 90% para la dosis (0,085 g / ml); 93% para la dosis (0,042g / ml); y 93% para dosis (0,014g / ml). En la repetición III presentó 84% para la dosis (0,085 g / ml); 84% para la dosis (0,042g / ml); y 69% para la dosis (0,014g / ml).

El uretano utilizado en el control positivo, demostró en los dos cruzamientos su acción eficaz, induciendo significativamente un aumento en las frecuencias de las manchas presentadas, y mostrando así, una correlación con los datos de la literatura. Las frecuencias de manchas espontáneas obtenidas en el control negativo, y observadas en los descendientes del cruzamiento ST y HB, son compatibles con la literatura (Graf e Van Schaik, 1992).

Por los resultados obtenidos, se puede observar que *D. furfuracea*, por vía cotratamiento, presentó efecto protector contra la acción genotóxica del uretano en las células somáticas de *D. melanogaster*, tanto en el cruzamiento patrón (ST) como en el cruzamiento con alta bioactivación (HB). Esos datos indican que incluso con una alta concentración de enzimas de desintoxicación (complejo citocromo p-450) la planta mantiene su nivel de protección activo.

Esta técnica se ha utilizado para el análisis de otras plantas medicinales, así Nepumuceno et al 1997) comprobó que la planta medicinal *Moringa oleifera* presenta un efecto de protección contra la acción del uretano. En el cruzamiento (ST), la asociación de *M. Oleifera* (extracto 1:1) con el uretano (10mM), proporcionó una frecuencia total de manchas de 0,60 (18); mientras que la asociación de *D. furfuracea* (0,042g/ml) con el uretano (20mM), presentó para el total de manchas un valor de 0,45 (27). En el cruzamiento (HB), la asociación de *M. oleifera* (extracto 1:2) con el uretano, presentó una frecuencia total de manchas de 0,70 (14), mientras que *D. furfuracea* presentó en las dosis: 0,085g/ml y 0,014g/ml asociadas al uretano, un valor para el total de las manchas de 0,58 (35) y 0,71 (43) respectivamente. La comparación entre ambos trabajos, demuestra la semejanza en los resultados obtenidos. Por consiguiente, se puede inferir que, tanto *M. oleifera* como *D. furfuracea* fueron capaces de atenuar los efectos genotóxicos del uretano.

Ramirez-Victória et al (2001), utilizaron la prueba de SMART-ala, para la comprobación de posibles efectos antígenotóxicos del *Capsicum spp.* En el cruzamiento modelo (ST), la asociación del *Capsicum spp.* (12,5%) con methyl urea (20mM), presentó una frecuencia total de manchas de 0,38 (46); mientras que la asociación de la *D. furfuracea* (0,085g/ml) con el uretano (20mM), proporcionó un valor de 0,36 (22) para el total de manchas. La asociación de *Capsicum spp.* (25%) con el methyl urea, presentó una frecuencia total de manchas de 0,40 (48); mientras que la asociación de la *D. furfuracea* (0,042g/ml) con el uretano, fue de 0,45 (27). Los descendientes del cruzamiento con alta bioactivación (HB), presentaron en la asociación methyl urea (20mM) con *Capsicum spp.* (50%), una frecuencia total de manchas de 0,47 (57); mientras que se obtuvo un valor semejante con la asociación de la *D. furfuracea* (0,085g/ml) + uretano (20mM), completando una frecuencia total de manchas de 0,46 (28). La semejanza entre los resultados que se obtuvieron por la asociación del methyl urea con *Capsicum spp.*, y de la *D. furfuracea* con el uretano, demuestran que las plantas estudiadas ejercen un efecto modulador de la actividad genotóxica.

Franchi et al. (2013), evaluaron el efecto antimutagénico de noni (TNJ) (*Morinda citrifolia* L.), contra las lesiones inducidas por doxorubicina (DXR) y mitomicina C (MMC), por el test SMART-asa con *D. melanogaster*. Los resultados evidenciaron una significativa reducción de la dosis-respuesta en las frecuencias de manchas de ambos cotratamientos. La inhibición observada fue de 63, 71 y 97% para el cotratamiento con MMC; y de 83, 92 y 96% para cotratamiento con DXR, para las concentraciones de 25, 50 y 75% de TNJ, respectivamente. Los autores vincularon ese resultado con micronutrientes antioxidantes, tales como compuestos fenólicos, alcalóides y flavanóides presentes en esa planta.

Dogan & Yesilada (2015), evaluaron el efecto antimutagénico de Resveratrol (0.2, 0.5, 1 mM: compuesto polifenólico) con ciclofosfamida (CP 0.5, 1, 2 mM); mitomicina C (MMC 0.05 mM) y N-metil-N-nitrosourea (MNU 1 mM), por el test SMART-ala (ST) con *D. melanogaster*. Los resultados evidenciaron una significativa reducción de la dosis-respuesta en las frecuencias total de manchas de 39.60% para el cotratamiento con CP; de 48.86% para cotratamiento con MMC y 55.25% para MNU.

Rezende et al. (2013), verificaron el efecto antimutagénico de (-) cubebin (*Piper cubeba* Linn.) por el test SMART-asa con *D. melanogaster*. Los resultados obtenidos demostraron que el (-) cubebin inhibió significativamente los efectos genotóxicos de Uretano. La inhibición observada fue de 48.89% (ST) y 67.53% (HB) para el cotratamiento con Uretano. Ese estudio puede ser correlacionado con el trabajo con *D.furfuracea* por actuar como un posible desmutagénico.

A partir de los resultados encontrados (Tablas 2A y 2B) en las tres réplicas, con los cruzamientos (ST) y (HB) y con las tres de dosis *D. furfuracea*; utilizadas, se puede deducir que las manchas (mwh) (Figuras 2Ha y 2Jb) que surgieron en los ensayos, pueden haber sido originadas a partir de la recombinación mitótica simples entre los marcadores mwh y flr3, que originaron clones simples, que expresaron el fenotipo pelos multiples (mwh). Se comprobó también que las manchas con el fenotipo flr3 (Figuras 2Gb y 2Ja), surgieron debido a la recombinación entre flr3 y el centrómero, seguida de una segunda recombinación entre mwh y flr3 en una misma célula, y resultando en clones simples flr3. Por consiguiente, esas manchas con los fenotipos mwh y flr3, se originaron a partir de mutaciones que ocurrieron en el contenido informacional de uno de los locus de los genes marcadores, como mutaciones puntuales, no disyunción o grandes deleciones, conteniendo uno de los dos alelos salvajes mwh/+ o flr/+ y originando clones simples mwh o flr3. Los clones de manchas gemelas (Figuras 2Hb y 2J,a), forman parte de un evento exclusivo, que tal vez ocurrió por la recombinación entre flr3 y el centromero, con la segregación de un cromosoma del tipo parental y uno recombinante (células homocigotas del tipo mwh/+ y flr3/+) (Guzmán-Rincón e Graf, 1995; Ribeiro et al. 2003).

Analizando los resultados que se obtuvieron en los ensayos de antigenotoxicidad se observa que en las condiciones experimentales realizadas, la infusión, de *D. furfuracea* presentó efecto de protección contra las mutaciones y recombinaciones somáticas inducidas por el uretano, en los descendientes del cruzamiento modelo, y principalmente en relación a la dosis de 0,042g/ml, que presentó una reducción en todos los tipos de manchas analizadas y la dosis 0,014g/ml, administrada en los descendientes del cruzamiento de alta bioactivación, que presentó un eficiente efecto de protección para todos los tipos de manchas analizadas (Tabla 2B).

Kong et al. (1995), relataron que la concentración de los extractos vegetales es importante en la obtención de efectos antígenotóxicos más eficientes. Así, se puede sugerir que las dosis 0,042g/ml y 0,014 g/ml de *D. furfuracea* son las más indicadas en el sentido de conferir mayor protección contra la acción de agentes genotóxicos. Por lo tanto, se puede considerar que la infusión de *D. furfuracea* actúa como un desmutagénico ya sea porque sus constituyentes presentan efectos antígenotóxicos por la inactivación de los mutágenos o sus precursores, por inhibición de la actividad de las enzimas, o impidiendo la interacción del mutágeno con el DNA (Kada et al. 1985).

EXPERIMENTO III

El experimento III, tuvo por objetivo determinar la posible presencia de actividad mutagénica y antimutagénica de la infusión las hojas de *D. furfuracea* mediante la prueba de Ames. Para ello se utilizaron las cepas *S. typhimurium* TA97a, TA98, TA100 y TA102 (Tabla 3A).

El control negativo fue realizado con agua destilada o el diluyente dimetilsulfóxido (DMSO), y el control positivo fue específico para cada cepa (Maron e Ames, 1983). El N-óxido 4-nitroquinolina (4NQO) para las cepas TA97a y TA98, el ácido sódico para la cepa TA100, y la Mitomicina C para la cepa TA102.

Los medios de cultura utilizados fueron los siguientes: el medio nutriente para la encubación de las cepas *S. typhimurium* fue agar mínimo glucosado (agar glucose); el medio MEVB "E", (Vogel e Bonner 1956), para la confección de las placas, la solución mixta de histidina/biotina 0,5mM, que fue agregada al medio agar mínimo glucosado, o top agar conteniendo trazos de histidina/biotina 0,5mM para la formación del "background" y el medio para la confección de placas master, conteniendo los antibióticos específicos (ampicilina para las cepas TA98, TA100 y TA97a, y ampicilina y tetraciclina para la cepa TA102). Esos componentes están especificados en los cuadros 3A y 3G (Maron e Ames, 1983).

Para la conservación de las cepas de *S. typhimurium* fueron realizados ensayos de rutina para la comprobación de caracteres genéticos, tales como: la presencia de mutación *rfa* en la membrana, la presencia de delección *uvrB*, la dependencia de las cepas a la histidina, la presencia de plásmidos de resistencia (pKM101 y pAQ1) y la tasa de reversión espontánea (Maron e Ames, 1983).

El procedimiento experimental para la evaluación de la actividad mutagénica y antimutagénica fue realizado de la siguiente manera:

Para la prueba de mutagenicidad, alícuota (0,1ml) de cultivo “pernoche” de las cepas *S. typhimurium* TA97a, TA98, TA100 y TA102, en fase estacionaria de crecimiento, fueron encubadas por 25 minutos en diferentes dosis de la infusión de *D. furfuracea* por infusión (0,0mg, 0,05mg, 0,1mg, 0,5mg, 1mg, 2mg, 4mg).

Para la prueba de autimutagenicidad fueron utilizadas las siguientes dosis de infusión: 0,0mg, 0,05mg, 0,1mg, 0,5mg, 1mg, 2mg, 4 mg y 8 mg a las que se añadieron de 0,5µg de 4NQO para las cepas TA97a y TA98, 1,5µg de ácido sódico para TA100 y 0,5µg de mitomicina C para TA102.

Para ambos ensayos, los cultivos fueron encubados durante 25 minutos con agitación (120 rpm) y aireación a 37°C. Transcurrido este periodo fueron añadidos 2 ml del top agar glucosado licuado, conteniendo solución de histidina/biotina (0,5mM). El contenido fue vertido en placas de Petri por duplicado, conteniendo medio mínimo glucosado, y las placas fueron encubadas a 37°C durante 48 horas. Después de este periodo se realizó el recuento del número de colonias revertientes. Para cada cepa fueron realizados tres experimentos con dos repeticiones. Se utilizó como control positivo 0,5µg de 4NQO para las cepas TA97a y TA98, 1,5µg de ácido sódico para la cepa TA100 y 0,5µg de mitomocina C para la cepa TA102. Para los controles negativos se utilizaron H₂O (destilada y esterilizada) y el solvente (DMSO). Los resultados se obtuvieron de la media aritmética de los tres experimentos ejecutados (Maron e Ames, 1983; Rabello-Gay et al. 1991).

Con el fin de facilitar la visualización y la comparación de los resultados obtenidos, estos fueron expresados como la razón de la mutagenicidad en función de la dosis de la planta. La razón de la mutagenicidad (RM) es la relación del número de colonias revertientes en la placa ensayo (E) y el número de colonias revertientes en la placa del control negativo (Cn), donde $RM=E/Cn$. Un resultado puede ser considerado como positivo cuando el número de colonias revertientes inducidas sea igual o superior al doble del número de colonias del control negativo y, además, debe haber una relación de dosis/respuesta en al menos tres de la dosis ensayadas. Los resultados negativos indican que la sustancia ensayada no

presenta las condiciones citadas anteriormente (Maron e Ames, 1983; Rabello-Gay et al. 1991).

Los resultados que se obtuvieron fueron presentados en las figuras 3A e 3D.

En la figura 3A se puede observar, que la cepa TA97a tratada con *D. furfuracea*, presentó una razón de mutagenicidad máxima (1.17) en las dosis 0,05mg y 0,5 mg. Esos resultados mostraron un pequeño aumento de la razón de mutagenicidad. Sin embargo, un resultado es considerado positivo cuando la razón de mutagenicidad (RM) es igual o superior a dos 2. y presenta una relación de dosis respuesta en por lo menos tres de las dosis ensayadas. En este caso no se cumplieron estas condiciones por lo que no fue posible detectar la presencia de la actividad mutagénica de la planta *D. furfuracea* en las condiciones experimentales utilizadas.

En la figura 3B se puede observar que en la cepa TA98 no hubo alteración del número de células revertientes en función de la dosis. El tratamiento de la planta no provocó un aumento en la RM. Para todas las dosis utilizadas la RM que se obtuvo fue inferior a uno 1. Así, no fue posible detectar la presencia de la actividad mutagénica de *D. furfuracea* en la cepa TA98.

Por los resultados que se obtuvieron de la cepa TA100 (figura 3C), se puede observar que la planta no causó aumento del número de células revertientes en función de la dosis. Para las dosis utilizadas se presentó una RM menor que 1. Por consiguiente, no fue posible identificar la presencia de la actividad mutagénica de la planta en la cepa TA100.

Por los resultados obtenidos de la cepa TA102 (Figura 3D) se observó que la *D. furfuracea* no provocó aumento de células revertientes. En ninguna de las dosis utilizadas fue observado aumento de la RM. De esa manera, tampoco fue posible detectar la presencia de la actividad mutagénica de la planta en la cepa TA102.

Como hemos visto, en ninguna de las cepas utilizadas (TA97a, TA98, TA100 y TA102) se puede observar que la planta *D. furfuracea* provocara un aumento significativo del número de colonias revertientes en función de la dosis. De

esa manera, se puede concluir que esta planta no presentó actividad mutagénica en las condiciones experimentales empleadas.

Resultados contrarios a los que se obtuvieron con *D. furfuracea* en el presente trabajo, fueron encontrados por Varanda y Villegas (1994), cuando realizaron ensayos con *S. typhimurium* para la evaluación del potencial mutagénico de la planta medicinal *Paepalanthus velloioides*. Los autores constataron que esa planta fue capaz de inducir mutaciones en las cepas TA100 y TA 98. Los ensayos demostraron actividad mutagénica en los dos linajes, indicando una actuación al nivel de sustitución de bases, así como en el desplazamiento del marco de lectura.

Tyrsina et al. (1994), realizaron la prueba de Ames con *S. typhimurium* (TA100) y confirmaron que, el ácido ascórbico y sus derivados tienen propiedades prooxidantes.

Moreno et al. (1991), estudiando los posibles efectos mutagénicos del alcaloide aporfinico boldina, presente en la planta medicinal *Pneumus boldus* mediante la prueba de Ames, constataron que este agente no fue capaz de inducir mutaciones en las cepas de *S. typhimurium* TA98, TA100 y TA102.

Fonseca et al. (1994), realizaron la prueba de Ames con el extracto acuoso liofilizado de *Paullinia cupana* y confirmaron que hubo inducción de frameshift en el linaje TA97. Sin embargo, los resultados que se obtuvieron de las cepas TA98, TA100 y TA102, indicaron que el extracto de esta planta no presentó actividad mutagénica.

Heo et al. (2001), evaluaron por la prueba de Ames el potencial mutagénico del galangin, que es un flavanoide presente en grande concentración en la planta medicinal *Alpinia officinarum*. Los resultados obtenidos con la cepa TA98, demostraron que el Galangin indujo actividad mutagénica en los ensayos con activación metabólica. Sin embargo, el galangin, no presentó actividad mutagénica cuando fue sometido a prueba con la cepa TA100, con y sin actividad metabólica.

Resultados semejantes a los encontrados en este estudio fueron relatados por Vieira et al. (2013), cuando evaluaron el posible efecto mutagénico de la curcumina pura, por medio del test de Ames en las dosis de 0,002, 0,005, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 e 0,5 mg/placa, administrados con las linajes TA97a, TA98, TA 100 y

TA102. La curcumina no presentó un aumento estadísticamente significativo, en el número de colonias revertentes, en comparación con el control negativo en todas las concentraciones probadas.

Resultados semejantes a los encontrados en este trabajo con *D. furfuracea* fueron relatados por Yoshida et al. (2015) cuando evaluaron la posible actividad mutagénica de los compuestos fenólicos de barú (*Dipteryx alata* Vogel) en el test de Ames utilizando cepas de (*Salmonella typhimurium*) (TA98, TA97, TA100 e TA102). Los resultados muestran que ninguno de los compuestos fenólicos indujo el aumento en el número de colonias revertientes en comparación con el grupo de control negativo, indicando la ausencia de actividad mutagénica.

Los resultados aquí obtenidos en la evaluación de la actividad antimutagénica de *D. furfuracea* en cuatro cepas de *S. typhimurium*, fueron presentados en las figuras de 3E a 3H.

De acuerdo con Rabello-Gay et al. (1991) la magnitud de actividad antimutagénica en la prueba de Ames también puede ser indicada por medio de la razón de la mutagenicidad (RM) expresada como la relación entre el número de colonias revertientes en la placa test del tratamiento (E), y el número de colonias revertientes en la placa del control positivo (Cp), donde $RA=E/Cp$. Se considera como un resultado positivo, cuando el número de colonias revertientes inducidas sea inferior al 70% del número de colonias del control positivo (una protección de por lo menos el 30%) y además, se observe una relación inversa de la dosis-respuesta. Por las curvas dosis-respuesta elaboradas para los controles positivos utilizados en nuestro ensayo, fueron seleccionadas las dosis que presentaron un mayor número de revertientes, que serán asociadas a la planta en test, para realizar el cotratamiento.

En la figura 3E, se puede observar que *D. furfuracea* provocó una disminución considerable en el número de células revertientes en la cepa TA97A. También se observó que para todas las dosis empleadas se presentó una protección significativa de la acción mutagénica del 4NQO. La protección máxima que se obtuvo, fue en la dosis de 4000 μg con una protección del 81%. De esa forma, se puede concluir, que la planta *D. furfuracea* ejerció acción moduladora del agente mutagénico 4NQO.

En los resultados obtenidos de la cepa TA98 (Figura 3F), se observó que *D. furfuracea* causó una disminución del número de células revertientes. Y para todas las dosis empleadas se mostró una protección de la actividad mutagénica del 4NQO. La protección máxima alcanzada ocurrió en la dosis 4000µg con una protección del 67%. Así, se puede constatar que *D. furfuracea* promovió una acción moduladora del agente mutagénico 4NQO también en esta cepa.

En la figura 3G, se puede observar que *D. furfuracea* promovió una disminución del número de células revertientes en la cepa TA100. Se observó que para todas las dosis utilizadas se presentó una protección de la acción mutagénica del ácido sódico. La protección máxima se obtuvo en la dosis de 4000µg con una protección del 52% confirmando así que *D. furfuracea* ejerció un efecto de modulación de la mutagenicidad del ácido sódico.

En los resultados obtenidos de la cepa TA102 (Figura 3H), se observó que *D. furfuracea* causó una disminución del número de células revertientes. Para todas las dosis utilizadas se presentó una protección de la actividad mutagénica de la mitomicina C. La protección máxima que se obtuvo ocurrió en la dosis de 2000 µg, con una protección del 53%. Así, se puede constatar el efecto protector de la *D. furfuracea* contra la acción mutagénica de la mitomicina C.

Mediante el análisis de los resultados obtenidos con los cuatro linajes de *S. typhimurium* se comprobó que la infusión de *D. furfuracea* mostró una protección contra las acciones dañinas de los agentes mutagénicos utilizados en el cotratamiento. La protección máxima que se obtuvo en las cuatro cepas fue del 81%, 67%, 52% y del 53% respectivamente, obteniéndose de esa manera una media de protección del 63%. Así, se puede concluir que la planta ejerció una fuerte acción de atenuación en la mutagénesis.

Sarkar et al. (1996) relataron que los mecanismos por los cuales los extractos de las plantas modulan los efectos genotóxicos indican que ciertos compuestos específicos, tales como el ácido ascórbico y las fibras vegetales, pueden actuar como agentes redox, secuestrando radicales libres o uniéndose a los principios tóxicos del mutágeno.

Negi et al. (2003) detectaron la actividad antimutagénica del extracto de la planta medicinal (*Punica granatum*) en *S. typhimurium* (TA100) contra la actividad

mutagénica del ácido sódico, demostrando un efecto protector del 40%. Por tanto el resultado citado arriba, puede ser comparado con el resultado alcanzado en el presente trabajo con *D. furfuracea*, que promovió una protección del 52% en la cepa TA100 contra las actividades mutagénicas del ácido sódico.

Mejía et al. (1998) realizaron la prueba de Ames con el linaje YG1024 (derivado del linaje TA98) de *S. typhimurium* para la comprobación de posible actividad antimutagénica de *Capsicum spp.*. Los resultados que se obtuvieron presentaron una protección del 72% contra la acción mutagénica del 1.8-dinitropyrene. Este resultado puede ser comparado con el valor de protección alcanzados con la cepa TA98 en la asociación de *D. furfuracea* con el 4NQO, que presento una protección del 67%.

Edenharder e Grünhage (2003) investigaron la antimutagenicidad de flavanoides sobre la acción mutagénica del tert-buty1 hidroperóxido y cumene hydroperóxido en *S. typhimurium* TA102. Los resultados que se obtuvieron indicaron que el flavanoide ejerció una inhibición del 50% sobre los efectos mutagénicos de estos compuestos. Este resultado puede ser comparado con el de este trabajo en *D. furfuracea* que presentó una protección del 53% en la cepa TA102, contra la acción dañina de la mitomicina C.

Rauscher et al. (1998) realizaron estudios con *S. typhimurium* sobre el efecto antimutagénico de extractos de frutas y vegetales ricos en carotenoides y fue constatado en los linajes TA98 y TA100 el efecto protector del damasco del 51% y 42% respectivamente contra los efectos mutagénicos 2-amino-3-methylimidazo (4,5-f) quinoline y aflotoxina respectivamente. Por tanto hubo una semejanza entre los resultados que se obtuvieron en los ensayos de antimutagenicidad con *D. furfuracea*, que presentó en los linajes TA98 y TA100 una protección del 67% y 52% respectivamente contra la acción del 4NQO. Utilizando la cepa TA100, se ha comprobado un efecto protector de la naranja contra la mutagenicidad del benzo[a]pyrene (BaP) del 67%. Este mismo valor fue encontrado en el presente trabajo con la cepa TA98, que muestra una protección del 67% de *D. furfuracea* contra la acción del 4NQO y también con la cepa TA102, que mostró una protección máxima del 53% contra la acción dañina de la mitomicina C. El linaje TA97a mostró un efecto protector de la naranja del 72% frente a la acción mutagénica de la

aflotoxina. Este valor puede ser comparado con el presente trabajo, donde la cepa TA97a presentó una significativa protección del 81% de la *D. furfuracea* contra la acción mutagénica del 4NQO.

Zahin et al. (2014) encontraron resultados similares al de este estudio con los extractos secos de *P. granatum* en *S. typhimurium*. La gran concentración testada (500 µM) mostró un significativo efecto modulador de *P. granatum* contra la mutagenicidad inducida por la azida de sódica y MMS. El índice de protección fue de 74,4% en TA97 seguido por TA100 (74,3%), TA98 (65,3%), y TA102 (59,8%) en los linajes analizados.

Devi et al. (2015) en sus estudios con el test de Ames para verificar la antimutagenicidad del extracto etanólico de *Cúrcuma caesia* verificaron la reducción de lesiones inducidas por la acción indirecta de la ciclofosfamida por 97,21% y 90,30% respectivamente para las cepas TA98 y TA100 (en la presencia de S9). La fuerte actividad antimutagénica fue demostrada por la alta dosis (5000 µg/placa).

La actividad antimutagénica del ácido gálico fue verificada usando el ensayo de Ames, Kaur et al. (2015). Los resultados obtenidos con las cepas TA98 de *S. typhimurium* mostraron que la dosis de 2.500 mg / 0,1 ml /placa, promovió un efecto modulador de 74,56% y 76,45% en contra la acción mutagénica del 4-nitro-o-phenylene diamine (NPD) y 95,27% y 95,81% en contra las lesiones de 2-aminofluorene (2-AF). El linaje TA100 presentó una acción protectora de 95,89% e 96,22% de inhibición contra la azida sódica y un índice de 99,76% y 99,56% de inhibición contra-2 AF. Estos resultados pueden ser comparados con los obtenidos en este trabajo con *D. furfuracea* contra la acción mutagénica de 4NQO, donde la cepa TA98 atingió la protección máxima de 67% con la dosis 4000µg y con la cepa TA100 contra la acción lesiva de la azida sódica, donde la protección máxima fue obtenida en la dosis de 4000µg con una protección de 52%.

Un agente es considerado antimutagénico, cuando ocurre una atenuación de los efectos de la sustancia mutagénica, incubada conjuntamente con la sustancia que está sendo evaluada. Cuanto menor sea la razón de antimutagenicidad, mayor es el efecto protector de la sustancia en test. (Rabello-Gay et al. 1991).

De Flora y Ramel (1988) propusieron los siguientes mecanismos de inhibición de la mutagénesis: a) inhibidores de la mutagénesis con actuación extracelular donde los inhibidores de la captación de los mutagénicos o sus precursores, impiden su penetración dentro del organismo o dentro de la célula, o favorecen su eliminación; b) inhibidores de la formación endógena del mutágeno – donde ocurre la inhibición de la reacción de nitrosación y el cambio de la flora bacteriana intestinal; c) desactivación del mutagénico, que puede ocurrir por reacción física, química o enzimática; d) inhibidores de la mutagénesis con actuación intracelular. En este caso, los moduladores del metabolismo pueden actuar inhibiendo la duplicación celular. En este caso, los moduladores del metabolismo pueden actuar inhibiendo la duplicación celular, favoreciendo la captación del mutágeno por células no diana, inhibiendo la activación de promutagénicos o induciendo los mecanismos de desintoxicación; e) bloqueadores de moléculas reactivas, que pueden reaccionar con sitios electrofílicos por reacción química, enzimática, captando especies reactivas de oxígeno (ROS) o protegiendo sitios nucleófilos del DNA; f) moduladores de la duplicación y reparación del DNA, promoviendo mayor fidelidad en la duplicación del DNA, y favoreciendo la reparación de los daños en el DNA e inhibiendo la reparación inductora de los errores; g) inhibidores que actúan en la iniciación o en células neoplásicas, donde los moduladores del ascenso tumoral, pueden actuar inhibiendo los efectos genotóxicos, captando radicales libres, inhibiendo la proliferación celular, induciendo a la diferenciación celular y modulando el señal de traducción; h) moduladores de progresión tumoral, estos actúan inhibiendo los efectos genotóxicos, actuando en las hormonas o en los factores del crecimiento, en el sistema inmune, en los agentes antineoplásicos físicos, químicos o biológicos y también actúan modulando el señal de traducción.

De Flora y Ramel (1988), observaron que algunos inhibidores de la mutagénesis y/o carcinogénesis, ejercen sus efectos al interferir en tan sólo una de las diferentes etapas de la actuación de los mecanismos de inhibición de la mutagénesis o carcinogénesis. Sin embargo, estos autores comprobaron que algunos compuestos pueden actuar también a través de mecanismos múltiples y dependiendo de la etapa en que interfieren, los resultados pueden ser contradictorios. Así, un agente que ejerza efectos protectores en determinadas condiciones experimentales puede ser inefectivo o nocivo (tóxico, mutagénico y/o

carcinogénico) dependiendo: (i) de la metodología empleada-dosis, ruta y secuencia del administración del modulador; (ii) del organismo-test empleado; y (iii) del tipo de daño que esta siendo analizado.

La identificación de los mecanismos implicados en los procesos de inhibición de la mutagenicidad se vuelve difícil y a veces incierta, principalmente por la ocurrencia de varios fenómenos resultantes de diferentes factores y que interactúan simultáneamente en la cascada de eventos que constituye el proceso (De Flora e Ramel, 1988; Ramel et al. 1986).

Por los resultados que se obtuvieron en la prueba de antimutagenicidad, con las cuatro cepas de *S. typhimurium* y tratadas con diferentes dosis, de la infusión de *D. furfuracea*, se constató que hubo una disminución del número de revertientes en relación al control positivo para cada muestra en test. Por lo tanto se puede concluir que esta planta, desempeña de forma significativa, un efecto modulador en la atenuación de la mutagénesis, actuando como un desmutagénico y ejerciendo su actividad protectora, mediante inactivación de las sustancias mutagénicas, impidiéndolas actuar sobre el DNA, o interfiriendo en la interacción del mutágeno con el DNA.

9. BIBLIOGRAFIA

- ABRAHAM, S.K., GRAF, U., 1996. Protection by coffee against somatic genotoxicity in *Drosophila*: Role of bioactivation capacity. *Fd. Chem. Toxic.*, v.34, no.1, p.1-14.
- ABRAHAM, S.K., SINGH, S.P. KESAVAN, P.C., 1998. In vivo antigenotoxic effects of dietary agents and beverages co-administered with urethane: assesment of the role of glutathione S-transferase activity. *Mutation Research*, v.413, p.103-110.
- ADEODATO, S., OLIVEIRA, W., 1996. Uma farmácia no fundo do quintal. Ed., Globo Ciência, São Paulo, v.64, p.41-49.
- AGOSTINI, T. S, CECCHI, H.M, BARRERA-ARELLANO, D., 1995. Caracterização química da polpa e do óleo do marolo (*Annona coriaceae*) *Arch. Latinoam. Nutr*; 45(3): 237-41.
- AGOSTINI, T., CECCHI, H.M, GODOY, H.T, 1995. Composição de carotenóides no marolo *in natura* e em produtos de preparo caseiro. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 16(1): 67-71.
- ALMEIDA, E. R., 1993. Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. Ed., Hemus.São Paulo, p.11.
- ALMEIDA, S. P., SILVA, J.A., RIBEIRO, J.F., 1987. Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, barú, cagaita e jatobá. Planaltina, Brasília, EMBRAPA-CPAC, pp10-21.
- AMES, B.N., 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*, v.221, p.1256-1263.
- AMES, B.N., MCCANN, J., YAMASAKI, E., 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mut. Res.*, v. 31, p.347-364.
- ANDERSON, E. G., 1925. Crossing over in a case of attached X chromossomes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 10: 403-417.

- ANDRADE, H.H.R., SANTOS, J.H., GIMMLER-LUZ, M.C., CORREA, M.J.F., LEHMANN, M., REGULY, M.L., 1992. Suppressing effect of vanillin on chromosome aberrations that occur spontaneously or are induced by mitomycin C in the gem cell line of *Drosophila melanogaster*. Mutation Research, v.279, p.281-287.
- ARUNA, K., SIVARAMAKRISHNAN, V.M., SIVASWAMY, S.N., KRISHNAKUMAR, A., 1991. Inhibition of nitrosation reaction by some spices/leafy vegetables. Advances-in-Plant-Sciences, v.4, p.189-193.
- BANNASCH, P., GRIESEMER, R.A., ANDRES, F., BECKER, R., CABRAL, J.R., DELLAORTA, G., FERON, V.J., HENSCHLER, D., ITO, N., KROES, R., MAGEE, P.N., MCKNIGHT, B., MONTESANO, R., NAPALKOV, N.P., PEGG, A.E., RAO, G.N., TURUSOV, V.S., WAHRENDORF, J., WILBORN, J., 1986. Long-term and short program term assays for carcinogens: A critical appraisal. Oxford, Oxford University Press, UK, p.73.
- BAUER, H., 1939. Die Dosisabhängigkeit röntgeninduzierter Chromosomen-Mutationen in Ring-X-Chromosomen von *Drosophila melanogaster*. Naturwissenschaften, v. 27, p.821-822.
- BEUDOT; C., DE MÉO, M.P., DAUZONNE, D., ELIAS, R., LAGET, M., GUIRAUD, H., BALANSARD, G., DUMÉNIL, G., 1998. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of forty-two 3-substituted flavones in the Ames test. Mutation Research, v.417, p.141-153.
- BLACKBURN, G. M., GAIT, M. J., 1992. Nuclei acids in Chemistry and Biology. IRL PRESS at Oxford University Press, New York, p.446.
- BRIDGES, C. B., 1916. Non-disjunction as proof of the chromossome theory of heredity. Genetics 1: 1-52, 107-163.
- BU-ABBAS, A., CLIFFORD, M.N., WALKER, R., IOANNIDES, C., 1994. Marked antimutagenic potential of aqueous green tea extracts: Mechanism of action. Mutagenesis, v.9, p.325-331.
- CARDOSO M. N.; SANTOS A. L. P.; ALVES M. V.; VALADARES B. L. B. (2015). Avaliação de atividade mutagênica de amostras de própolis vermelha do Estado

- de Sergipe (Brasil) pelo Teste de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster*. Scientia Plena 11, 015201.
- CARIELLO, N. F.; PIEGORSCH, W.W., 1996. The Ames Test: The Two-fold Rule. Revisited. Mutat. Res. 369:23-31.
- CARLSON, G.P., 1994. The effect of inducers and inhibitors of urethane metabolism on its in vitro and in vivo metabolism in rats. Cancer Lett., v.87, p.145-150.
- CESAR, O., ARENS, K., 1969. Observações sobre o sistema radicular de *Duguetia Furfuracea*, Benth & Hook. XX Congresso Nacional de Botânica. Goiânia – GO. Anais. Universidade Federal de Goiás, p.175.
- CHEN, H.Y., YEN, G.C., 1997. Possible mechanisms of antimutagens by various teas as judged by their effects on mutagenesis by 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline and benzo[a]pyrene. Mut. Res., v.393, p.115-122.
- CHEN-CHEN, L., SENA, M. A., 2002. Atividade Tóxica e Mutagênica do óleo de Copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desfon). Ver. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.5, p.37-40.
- CHOY, W.N., MANDAKAS, G., PARADISIN, W., 1996. Co-administration of ethanol transiently inhibits urethane genotoxicity as detected by a kinetic study of micronuclei induction in mice. Mut. Res., v. 367, p. 237-244.
- COLAVITTI, F.; FRANCO, L.C.L., 2002. Poder verde: uma tradição milenar. Galileu, 129: 53-64.
- CONSUEGRA, S., FERREIRO, J.A., SIERRA, L.M., COMENDADOR, M.A., 1996. 'Non-genotoxic' carcinogens evaluated using the white-ivory assay of *Drosophila melanogaster*. Mutation Res., v. 359, p.95-102.
- CORRÊA, A.D., SIQUEIRA-BATISTA, R., QUINTAS, L.E.M., 1999. Plantas Medicinais: Do Cultivo à Terapêutica: Contém formulação e modo de prepare de cosméticos: 2ª Ed. Petrópolis, RJ: Editora Vozes Ltda, pp.18-20.
- CORTES, D., MYNT, S.H., DUPONT, B., DAVOUST, D., 1993. Bioactive acetogenins from seeds of *Annona cherimolia*. Phytochem. 32: 1475-1482.
- CRUZ, G. L., 1979. Dicionário das plantas úteis do Brasil. Ed., Civilização Brasileira S.A., pp. 63-67.

- CUNHA, K.S., SANTOS, J.H., CORREA, M.J.F., LEHMANN, M., REGULY, M.L. E ANDRADE, H.H.R., 1992. Avaliação do Potencial Mutagênico do Ácido Tânico em células Germinais de *Drosophila melanogaster*. Rev. Bras. de Genética – Abstracts – 15(1): p.69.
- DAPKUS, J., MERRELL, D.J., 1977. Chromosomal analysis of DDT resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. Genetics, 87:685-697.
- DE FLORA, S., 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mut. Res., v.402, p. 151-158.
- DE FLORA, S., C. Ramel, 1988. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Clasification and overview. Mut. Res., 202, p. 285-306.
- DEVI H. P., MAZUMDER P.B., DEVI L. P. (2015). Antioxidant and antimutagenic activity of *Curcuma caesia* Roxb. rhizome extracts. Toxicology Reports 2 423 – 428.
- DE SOUSA, N.C., DE CARVALHO, S., SPANÓ, M.A., GRAF, U., 2003. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. Environ Mol. Mutagen. 41(4):293-9.
- DOGAN E.E., YESILADA E. 2015. Evaluation of genotoxic and antigenotoxic activities of resveratrol in the wing spot test of *Drosophila*. International Journal of Biosciences. Vol. 7, No. 2, p. 86-95, 2015.
- EDENHARDER, R., GRÜNHAGE, D., 2003. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hidroperoxide or cumene hidroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. Mutation Research, v.540, p.1-18.
- EHLING, U.H., AVERBECK, P.A., CERUTTI, J., FRIEDMAN, H., GREIM, A.C., KOLBYE Jr., MENDELSON, M.L., 1983. Review of the evidence for the induction of genetic effects by genotoxic Chemicals. Mutation Research, v.123, p. 281-341.
- EREN Y, OZATA A, KONUK M, AKYIL D, LIMAN R. (2015). A mutagenicity and cytotoxicity study of limonium effusum aqueous extracts by Allium, Ames and MTT tests. Tsitol Genet. 49(2):56-65.

- FECHINE I.M., CUNHA, E.V.L., FILHO, J.M.B., SILVA, M.S., 2000. Acalóides Isolados de *Hornschuchia obliqua* (Annonaceae). XVI Simpósio de plantas medicinais do Brasil, Recife-PE. pp.138.
- FERGUSON, L.R., 1994. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mut. Res.*, 307(1): 395-410.
- FERREIRA C., TERRA, W.R., 1991. A digestão dos insetos. *Rev. Ciência Hoje*. v.12, no.70, p.28-38.
- FERREIRO, J.; SIERRA, L.; COMENDADOR, M.A.; 1995. Methodological aspects of the white-ivory assay of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, v.335, p. 151-161.
- FLÜCKIGER-ISLER, S., BAUMEISTER, M., BRAUN, K., GERVAIS, V., HASLER-NGUYEN, N., REIMANN, R., VAN GOMPEL, J., WUNDERLICH, H.G., ENGELHARDT, G., 2004. Assessment of the performance of the Ames II™ assay: a collaborative study with 19 coded compounds. *Mut. Res.*, v. 558, p. 181-197.
- FONSECA, C.A.S., LEAL, J., COSTA, S.S., LEITÃO, A.C., 1994. Genotoxic and mutagenic effects of guarana (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. *Mut. Res.*, v.321, p.165-173.
- FOUREMAN, P., MASON, J.M., VALENCIA, R., ZIMMERING, S., 1994. Chemical mutagenesis in *Drosophila*. IX. Results of 50 coded compounds tested for the National Toxicology Program. *Environ. Mol. Mutagen.*, v.23, p.51-63.
- FRANA, S.A, SUFFREDINI, I.B., 2000. Determinação da atividade citotóxica à Artêmia de extratos de annonaceae. XVI Simpósio de plantas medicinais do Brasil, Recife-PE. pp.175.
- FRANCHI L P., GUIMARÃES NILZA N., ANDRADE L R., ANDRADE HELOÍSA H.R., LEHMANN M., DIHL R. R., CUNHA K. S. (2013). Antimutagenic and antirecombinagenic activities of noni fruit juice in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *An Acad Bras Cienc* 85 (2):585-594.
- FREESE, E.B., 1965. The effects of urethane and hydroxyurethane on transforming DNA. *Genetics*, v.51, p.953-960.

- FREI, H., 1982. Genetic damage induced by X-rays or neutrons in spermatozoa of *Drosophila melanogaster*: differential processing in the oocytes of females carrying DNA-repair deficient mutants *mei-9a* and *mus-101D1*. Mut. Res., 94, p.63-78.
- FREI, H., WÜRGLER, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. Mut. Res., 203, p.297-308.
- FREI, H., WÜRGLER F.E., 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. Mut. Res. v. 334:247-258.
- FREI, H., WÜRGLER, F.E., JUON, H., HALL, C.B.; GRAF, U., 1985. Aristolochic acid is mutagenic and recombinogenic in *Drosophila* genotoxicity tests. Arch. toxicol, v.56, p.158-166.
- FRÖLICH, A., WÜRGLER, F.E., 1989. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. Mut. Res., v.216, p.99-104.
- FRÖLICH, A., WÜRGLER, F.E., 1990. Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. Mut. Res., v.244, p.201-208.
- GALLOWAY, S.M., AARDEMA, M.J., ISHIDATE, M. JR., IVETT, J.L., KIRKLAND, D.J., MORITA, T., MOSESSO, P., SOFUNI, T., 1994. Report from working group on in vitro tests for chromosomal aberrations. Mutation Research v.312 (3), p.241-261.
- GARCIA, E.F., OLIVEIRA, A.B., LOPEZ, M.T., BRAGA, F.C., LOMBARDI, J. A, MOTA, A.P. 2000. Triagem de extratos vegetais para atividade antitumoral e isolamento biomonitorado de substâncias ativas de *Annona coracea* (Annonaceae). XVI Simpósio de plantas medicinais do Brasil, Recife-PE. pp.186.
- GIRI, S.D., CHATTERJEE A., 1998. Modulation of mitomycin C-induced sister chromatid exchanges and cell cycle delay by buthionine sulfoximine and reduced glutathione in mouse bone marrow cells in vivo. Mutation Research, v.413, p.227-234.

- GONZÁLES-CÉSAR, E., RAMOS-MORALES, P., 1997. Sodium azide induces mitotic recombination in *Drosophila melanogaster* larvae. *Mut. Res.*, v.389, p.157-165.
- GRAF, U., 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia* v.51, p.168-173.
- GRAF, U., 1994. The actual situation of SMART (Somatic Mutation and recombination Test) in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient*, v.10:(1), pp.5-7.
- GRAF, U., ABRAHAM, S.K., GUZMÁN-RINCÓN, J., WÜRGLER, F.E., 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mut. Res.*, v.402, p.203-209.
- GRAF, U., FREI, H., KÄGI, A.J., WÜRGLER, F.E., 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mut. Res.*, v.222, p.359-73.
- GRAF, U., WÜRGLER, F.E., 1986. Investigation of Coffee in *Drosophila* Genotoxicity Tests. *Food. Chem. Toxicol.* 24 (8): 835-842.
- GRAF, U., HALL, C.B., VAN SCHAİK, N., 1990. On the excision repair defective cells in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.16, p.225-337.
- GRAF, U., SINGER, D., 1992. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Ver. Int. Contam. Ambient*, v.8, n.1, p.15-27.
- GRAF, U., VAN SCHAİK, N., 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mut. Res.*, v.271, p.59-67.
- GRAF, U., WÜRGLER, F.E., KATZ, A.J., FREI, H., HALL, C.B. E KALE, P.G., 1984. Somatic Mutation And Recombination Test in *D. melanogaster*. *Environmental mutagenesis*, v.6, p.153-188.
- GRAF, U., M. M. GREEN; WÜRGLER, F.E., 1979. Mutagen-sensitive mutants in *Drosophila* effects on premutational damage. *Mutation Res.*, 63: 101-112.

- GRAF, U., WÜRGLER, F.E., 1982. DNA repair dependent mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. Seppo Lakovaara, p.85-99.
- GRAF, U., WÜRGLER, F.E., 1996. The somatic white-ivory spot test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environmental and Molecular Mutagenesis, v.27, p.219-226.
- GUERRA, A.D., 1994. Investigação da Genotoxicidade do Boldo (*Vernonia condensata*, Baker) com *Drosophila*. Dissertação de mestrado – Instituto de Ciências biológicas, Universidade Federal de Goiás, p.149.
- GUZMÁN-RINCÓN, J., GRAF, U., 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. Environmental Science Research; Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change; A Handbook; New York, Plenum Press, v.50, p.169-181
- GUZMÁN-RINCÓN, J., GRAF, U., VARELA, A., POLICRONIADES, R., DELFÍN, A., 1994. Mutación y recombinación somáticas inducidas por neutrones rápidos en la prueba de la mancha del ala de *Drosophila melanogaster*. Ver. Int. Contam. Ambient. v. 10, p.29-30.
- HÄLLSTRÖM, I., 1985. Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. II. Localization of some genes regulating cytochrome P-450 activity. Chem.-Biol. Interactions, v.56, p.173-184.
- HARTMAN, P.E., SHANKEL, D.M., 1990. Antimutagens and antivarcinogens: a SURVEY of putative interceptor molecules. Environ. Mol. Mutagen. v.15, p.148-182.
- HEO, M.Y., SOHN, S.J., AU, W.W., 2001. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. Mut. Res. V.488, p.135-150.
- HOLLINGWORTH, R.M., AHAMMADESAHIB, K.I., GADELHAD, G., MACLAUGHLIN, J.L., 1994. New inhibitors of complex I of the mitochondrial electron transport chain with activity as pesticides. Biochem. Soc. Trans., 22:230.
- HÜBNER, P. GROUX, P.M., WEILBEL, B., SENGSTAG, C., HORLBECK, J., LEONG-MORGENTHALER, P-M E LÜTHY, J., 1997. Genotoxicity of ethyl

- carbamate (urethane) in *Salmonella*, yeast and human lymphoblastoid cells. *Mutation Research*, v.390, p.11-19.
- IARC, MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISK OF CHEMICAL TO MAN, 1974). Some naturally occurring substances. International Agency for Research on Cancer, v.7, p.111-140.
- JOLAD, S.D., HOFFMANN, J.J., SCHRAM, K.H., COLE, J.R., 1982. Uvaricin, a new Antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). *J. Org. Chem.*, 47: 3151-3153.
- JONES, J.A., STARKEY, J.R., KLEINHOF, A., 1980. Toxicity and mutagenicity of sodium azide in mammalian cell cultures. *Mutation Res.*, v. 77, p.299-239.
- KADA, T., INOUE, T., MANIKI, M., 1982. Environmental desmutagens and antimutagens. *Environmental mutag. and plant Biol.* Kleokowski, E. J. (ed.). Praeger, New York. p. 113-152.
- KASTENBAUM, M.A., K.O. BOWMAN., 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mut. Res.*, v.9: 527-549.
- KASUBA, V., ROZGAJ, R., GARAJ, V, ZAGREB, C., 1999. Analysis of sister chromatid exchange and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs. *J. Applied Toxicol.*, v.19 (06), p.401-404.
- KAUR R., ARORA S., THUKRAL A.K. (2015). A report on antimutagenic and antioxidant activities of Gallic Acid. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2015; 3(5): 173-178.
- KILBEY, B., LEGATOR, M. S., NICHOLS, W.W., RAMEL, C., 1984. Hand book of mutagenicity test procedures. Amsterdam, Elsevier, 2nd edition, pp.859.
- KONG, Z., LIU, Z., DING, B., 1995. Study on the antimutagenic effect of pine needle extract. *Mutation Research*, v.347, p.101-104.
- LEIGH, B., 1976. Ring chromosomes and radiation induced chromosome loss. In: *The genetics and Biology of Drosophila*. M. ASBURNER & E. NOVITSKI (eds.). Academic Press, London, New York and San Francisco.v.1b, p.505-528.
- LEWIS, E.B. & BACHER, F., 1968. Methods of feeding ethyl methanesulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Dros. Int. Serv.*, v.43:p. 193.

- LIMA C.N.F., VALERO T.F., LEITE N.F., ALENCAR L.B.B., MATIAS E.F.F., KERNTOPPOF M.R., COUTINHO H. D.M. (2014). Protective action of *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Saff. against toxicity due to mercury chloride in *Escherichia coli*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2014;19(1):179-188.
- LINDSLEY D.L., GRELL E.H., 1968. Genetic variation of *Drosophila melanogaster*. *Carnegie Inst. Wash. Publ.*, v.627, p.472.
- LINDSLEY, D. L., ZIMM, G. G., 1992. The genome of *Drosophila melanogaster*. New York, Academic Press, 1992. pp. 481-483.
- LONDERSHAUSEN, M., LEICHT, W., LIEB, F., MOESCHLER, H., WEISS, H., 1991. Molecular mode of action annonins. *Pesticide Sci.*, 33: 427-438.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A., 2000. Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum, pp.512.
- MARNEWICK, J.L., BATENBURG, W., SWART, P., JOUBERT, E., SWANEVELDER, S., GELDERBLOM, W.C.A., 2004. Ex vivo modulation of chemical-induced mutagenesis by subcellular liver fractions of rats treated with rooibos (*Aspalathus linearis*) tea, honeybush (*Cyclopia intermedia*) tea, as well as green and black (*Camellia sinensis*) teas. *Mutation Research*, v.558, p.145-154.
- MARON, D.M.; AMES, B.N. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mut. Res.*, v.113, p.173-215.
- MARTINS, D.R., CASTRO, D.M.de, CASTELLANDI, D.C., DIAS, J.E., 1995. Plantas medicinais. Viçosa, MG, Brasil. Imprensa Universitária., pp.207.
- MEJÍA, E.G.D., QUINTANAR-HERNÁNDEZ, J.A., LOARCA-PINA, G., 1998. Antimutagenic activity of carotenoids in green peppers against some nitroarenes. *Mutation Research*, v.416, p.11-19.
- MOLLET, P., WÜRGLER, F.E., 1974. Detection of somatic recombination and mutation in *Drosophila*: A method for testing genetic activity of chemical compounds. *Mutation Research*, v.25, p.421-424.

- MORENO, P.R.H.; VARGAS, V.M.F.; ANDRADE, H.H.R.; HENRIQUES, A. T. e HENRIQUES, J.A.P., 1991. Genotoxicity of the Boldine Aporphine Alkaloid in Prokaryotic And Eucaryotic Organisms. *Mut. Res.*, v.00, p.1-8.
- MORGAN, L.V., 1933. A closed X chromosome in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* v.18, p.250-283.
- MORRE, D.J., DE CABO, R., FARLEY, C., OBERLIE ,N.H., MACLAUGHLIN, J.L., 1995. Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase activity of HELA and HL-60, but not liver, plasma membranes. *Life Sci.* 56: 343-348.
- MULLER, H.J. Artificial transmutation of the gene. 1927. *Science*, 66: 84-87.
- NEGI, P.S., JAYAPRAKASHA, G.K., JENA, B.S., 2003. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, v.80, p.393-397.
- NEPOMUCENO, J.C.; SPANÓ, M.A.; GRAF, U., 1997. Avaliação do efeito protetor de extratos de *Moringa oleifera* por meio do teste Smart em asas de *Drosophila melanogaster*. In: 42th National Congress of Genetics, Caxambu-MG, Programa and abstracts. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética. p.176.
- NILAN, R.A., SIDERIS, E.G., KLEINHOF, A., SANDER, C., KONZAK, C.F., 1973. Azide- a potent mutagen. *Mutation Research*, v.17, p.142-144.
- NUNES, W.B., Carvalho S., 2003. Evaluation of the mutagenic potential of *Cochlospermum regium* in *Drosophila melanogaster* male germ cells. *Genetics and Molecular Biology*, 26, 4, p.545-549.
- OBERLIES, N.H., CHANG, C.J., MACLAUGHLIN, J.L., 1997. Structure-activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells. *J.Med. Chem.*, 40: 2102-2106.
- OLIVEIRA, C.M.M., KROPOTOFF, A.B., FELZENSZWALB, I., 1994. IIª Reunião da sociedade brasileira de mutagênese e teratogênese ambiental, Gramado, RS. Simpósio sobre avaliação de risco por substâncias químicas – ILSI – Brasil., pp. 59.

- OPAS/OMS., 1996. Informação de medicamentos, publicação científica. Organização Panamericana de Saúde. No. 525. Edições informatizadas. Espanha.
- PARK, K.K., LIEM, A., STEWART, B.C., MILLER, J.A., 1993. Vinyl carbamate epoxide, a major strong electrophilic, mutagenic and carcinogenic metabolite of vinyl carbamate and ethyl carbamate (urethane). *Carcinogenesis*, v.14, p.441-450.
- PEREIRA, D.G, 1999. Avaliação do Potencial Mutagênico e/ou recombinogênico de *Hyptidendron canun* (Pohl ex benth) R. Harley, em células germinativas e somáticas de *Drosophila melanogaster*. Dissertação de mestrado – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, p.75.
- PINHO F.V.S.A., SILVA G.F., MACEDO G.E., MULLER K.R., MARTINS I. K., TERNES, COSTA J.G.M., ATHAYDE M.L., BOLIGON A.A., KAMDEM J. P., FRANCOJ.L., MENEZES I.R.A., and POSSER T.2014. Phytochemical Constituents and Toxicity of *Duguetia furfuracea* Hydroalcoholic Extract in *Drosophila melanogaster*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Volume 2014, Article ID 838101, 11 pages.
- PRAKASH G., Hosetti B.B., Dhananjaya B.L. (2014). Antimutagenic effect of *Dioscorea Pentaphylla* on genotoxic effect induced by methyl methanesulfonate in the drosophila wing spot test. *Toxicol Int_* 21(3):258-63.
- PURCHASE, I.F.H., 1982. An appraisal of predictive tests for carcinogenicity. *Mutation Research*, v. 99, p.53-71.
- RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A.La R., MONTELEONETO, R., 1991. Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese, Métodos e Critérios de Avaliação. Sociedade Brasileira de Gênética., pp.11-240.
- RAMEL, C., U.K., ALEKPROV, B.N., AMES, T., KADA, L.W., WATTENBERG., 1986. Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. *Mutation Research*, v.121, p.211-223.
- RAMIREZ-VICTORIA, P.; GUZMAN-RINCON, J.; ESPINOSA-AGUIRRE, J.J.; MURILLO-ROMERO, S., 2001. Antimutagenic effect of one variety of green

pepper (*Capsicum spp.*) and its possible interference with the nitosation process. Mutation Research, v.496, p.39-45.

RAUSCHER, R., EDENHARDER; R., PLATT, K.L., 1998. In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. Mutation Research, v.413, p. 129-142.

REZENDE A.A.A, MUNARI C. C. OLIVEIRA P.F. FERREIRA N.H. TAVARES D. C. SILVA M.L.A. REZENDE K.C.S. SPANÓ M.A. 2013. A comparative study of the modulatory effects of (-)- cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. Food and Chemical Toxicology (55) 645-652.

REZENDE A.A.A, MUNARI C. C. OLIVEIRA P.F. FERREIRA N.H. TAVARES D. C. SILVA M.L.A. REZENDE K.C.S. SPANÓ M.A. 2013. A comparative study of the modulatory effects of (-)- cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. Food and Chemical Toxicology (55) 645-652.

RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K., 2003. Mutagênese Ambiental, Ed. Ulbra, 1ªed. Canoas, RJ. Brasil pp.81-112.

RODRIGUEZ-ARNAIZ, R., SOTO, P.O., OYARZÚN, J.C.G. GRAF, U., 1996. Analysis of mitotic recombination induced by several mono-and bifunctional alkylating agents in the Drosophila wing-spot test. Mutation Research, v.351, p.133-145.

ROSSI, C., POLI, P., CANDI, A., BUSCHINI, A., 1997. Modulation of mitomycin-C mutagenicity on *Saccharomyces cerevisiae* by glutathione, cytochrome P-450, and mitochondria interactions. Mutation Research, v.390, p.113-120.

SANTOS, P.L., BOAVENTURA, M.D.A., 1994. Crassiflorina, uma acetogenina tetra-Hidrofurânica citotóxica de *Annona crassiflora* (araticum). Química Nova, 17(5): 387-391.

SANTOS, P.L., BOAVENTURA, M.D.A., SUN, N.J., CASSADY, M.J., OLIVEIRA, A.B., 1995. Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds. Elsev. Sci., 42: 705-707.

- SARKAR, D., SHARMA, A., TALUKDER, G., 1996. Plants extracts as modulators of genotoxic effects. *Botanical Review*, 62: 275-300.
- SANKARANARAYANAN, K., SOBELS, F.H., 1976. Radiation genetics. In: *The genetics and biology of Drosophila*. M. ASHUBURNER, & E. NOVITSKI, E. (eds). Academic Press, London, New York and San Francisco. v.1c, p. 1090 – 1223.
- SHIRAKI, M., HARA, Y., OSWA, T., KUMON, H., NAKAYAMA, T., KAWAKISHI, S., 1994. Antioxidative and antimutagenic effects of the flavins from black tea. *Mut. Res.*, v. 323, p.29-34.
- SILVA AP, SILVA CR, VERAS JH, CHEN-CHEN L, et al. (2014). Genotoxicity and cytotoxicity evaluation of oenothien B and its protective effect against mitomycin C-induced mutagenic action. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 767: 8-12 .
- SILVA C.R., VIEIRA P. M., SANTOS S.C., and CHEN-CHEN L. 2012. Assessment of *Duguetia furfuracea* genotoxic and cytotoxic activity in bacteria and mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 84, núm. 1, 149-156.
- SILVA, M.I., KIEL, C., MENDES, J.C., ARRUDA, A.M.S., 2000. Avaliação das atividades analgésicas e antiinflamatórias da *Annona glabra* (Annonaceae) XVI Simpósio de plantas medicinais do Brasil, Recife-PE. pp.252.
- SILVA, M.V., COSTA, T.R., RODRIGUES, A.B., FERRI, P.H., FERREIRA, L.C., SILVA, M.R.R., 1998. Ação dos Extratos de *Annona crassiflora* e *Hyptis ovalifolia* em isolados de *Cryptococcus neoformans*. X Encontro Científico do Academico de Medicina. Goiânia, Go. pp.18.
- SILVA, C. J., 2002. Avaliação de atividade mutagênica e/ou recombinogênica da *Guazuma ulmifolia* Lamb. (mutamba) em somáticas de *Drosophila melanogaster* através do teste SMART/asa. Tese de Mestrado. Univ. Federal de Goiás, Goiânia, Brasil. pp.50.
- SILVA, S.R., 1998. Plantas do cerrado utilizadas pelas comunidade da região do grande Sertão Veredas. Fundação Pró-natureza, p. 78-79.
- SIQUEIRA J.M. DE, ZIMINIANI, M.G., BOAVENTURA, M.A.D., 1998. Estudo Fitoquímico Biomonitorado das cascas do caule de *Duguetia glabriscula*

- (Annonaceae). XV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Águas de Lindóia, SP. pp.125.
- SMITH, P. D., BAUMEN, C. F., DUSENBERY, R. L., 1983. Mutagen Sensitivity of *Drosophila melanogaster*. VI Evidence from the Excision-Defective “mei-9^{AT1}” mutant from the timing of DNA-repair Activity During Spermatogenesis. Mut. Res. 108: 175-184.
- SOTOMAYOR, R.E., COLLINS, T.F., 1990. Mutagenicity, metabolism, and DNA interactions of urethane. Toxicol. ind. Health, v.6, p.71-108.
- SOUSA, O.V., SILVÉRIO, M.S., LEITE, M.N., SILVA, C., KAPLAN, M.A.C., 2000. Avaliação da atividade biológica de extratos de *Annona coriacea*. XVI Simpósio de plantas medicinais do Brasil, Recife-PE. pp.244.
- SOUSA NC, CARVALHO S, SPANÓ MA and GRAF U (2003). Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.* 41: 293-299.
- SPANÓ, M.A., GRAF, U., 1998. Second workshop at the Federal University of Uberlandia-Uberlandia (MG)- (Brazil): Smart: a method for the detection of mutagenic and recombinogenic activity in somatic cells of *Drosophila*. Rev. Int. Contam. Ambient. v.14 (12), p. 111- 114.
- SPANÓ, M.A., FREI, H., WÜRGLER F.E., GRAF, U., 2001. Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* v.16, no.5 p.385-394.
- STERN, C., 1986. Somatic crossing-over and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 21: 625-730.
- SURRALLÉS, J., CATALÁN, J., CRÉUS, A., NORPPA, H., XAMENA, N., MARCOS, R., 1995. Micronuclei induced by alachlor, mitomycin-C and vinblastine in human lymphocytes: presence of centromeres and kinetochores and influence of staining technique. *Mutagenesis*, v.10 (5), p.417-423.
- TANAKA, K., HAYATSU, T., NEGISHI, T., HAYATSU, H., 1998. Inhibition of *N*-nitrosation of secondary amines in vitro by tea extracts and catechins. *Mut. Res.*, v. 412, p.91-98.

- TOLEDO MRS, PERES MTLP, VIEIRA MC, BAZZANO TSC, et al. (2006). Fitotoxicidade do extrato aquoso de *Duguetia furfuraceae* (St. Hil.) B et H em ratas (*Rattus norvegicus*). *Rev. Bras. Plant. Med.* 8: 217-222
- TRIPATHY, N.K.; WÜRGLER, F.E.; FREI, H. 1990. Genetic toxicity of six carcinogens and six non-carcinogens in the *Drosophila* wing spot test. *Mut. Res.*, 242 (3): 169-80.
- TYRSINA, E.G., ROSSIKHINA, O.G., ABILEV, S.K., TYRSIN; Y., 1994. Inhibition of the bacterial mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine by ascorbic acid and ascorbyl palmitate. *Mutation Research*, v.321, p.81-87.
- YOSHIDA E. H., FERRAZ M. C., TRIBUIANI N., TAVARES R.V.S., Cogo J., SANTOS M.G., FRANCO L.M., DAL-BELO C. A., GRANDIS R. A. D., RESENDE F.A., VARANDA E.A., PUEBLA P., SAN-FELICIANO A., Groppo F. C., OSHIMA-FRANCO Y. (2015). Evaluation of the Safety of Three Phenolic Compounds from *Dipteryx alata* Vogel with Antiophidian Potential. *Chinese Medicine*, 6, 1-12.
- VALENCIA, R., ABRAHAMSON, S., LEE, W.R., VONHALLE, E.S., WOODRUFF, R. C., WÜRGLER, F.E., ZIMMERING, S., 1984. Chromosome mutation tests for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut. Res.*, v.134, p.61-88.
- VARANDA, E.A., VILLEGAS, W., 1994. Atividade mutagênica de uma nova isocumarina isolada de *Paepalanthus vellozioides*. IIª Reunião da sociedade brasileira de mutagênese e teratogênese ambiental, Gramado, RS. Simpósio sobre avaliação de risco por substâncias químicas – ILSI – Brasil. pp. 3.
- VARELLA-GARCIA, M., 1987. Metodologia para avaliação de Potencialidade Mutagênica: Testes não citogenéticos. Instituto de biociência, Letras e Ciências Exatas. UNESP, p.23
- VENNIT, S.; BARTSCH, H.; BECKING, G.; FUCHS, R.P.P.; HOFN. M.; MALAVEILLE, C.; MATSUSHIMA, T.; RAJEWSKY, M.R.; ROBERFROID, M.; ROSENKRANZ, H.S., 1986. Short-term assays using bacteria. In: long-term and short-term assays for carcinogens: A critical appraisal. IARC Sci. Publ. Lyon, v.83, p.143-161.

- VIEIRA ILBF, SOUZA DCP, COELHO LS, CHEN CL and GUILLO LA (2013). *In vitro* mutagenicity and blood compatibility of paclitaxel and curcumin in poly (DL-lactide-co-glicolide) films. *Toxicol. in Vitro* 27: 198-203.
- VOGEL, E.W., 1989. An Introduction Into Basic Principles of Genetic – Toxicology. Blok: Milieuverstoring Genotoxische Staffen, Leiden (The Netherlands); pp. 43.
- VOGEL, H.J.; BONNER, D.M., 1956. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: Partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* v.218, p.97-106.
- VOGEL, E.W., NATARAJAN, A.T., 1979. The relation between reaction kinetics and mutagenic action of mono-functional alkylating agents in higher eukaryotic systems. I. Recessive lethal mutations and translocations in *Drosophila*. *Mut. Res.*, v.62, p.51-100.
- VOGEL, E.W., NATARAJAN, A.T., 1995. DNA damage and repair in somatic and germ cells in vivo. *Mut. Res.*, v.330, p.183-208.
- VOGEL, E.W., NIVARD, M.J.M., 1993. Performance of 181 chemicals in a *Drosophila* assay predominately monitoring interchromosomal mitotic recombination. *Mutagenesis*, v.8, p.57-81.
- VOGEL, E.W., ZIJLSTRA, J.A., 1987. Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, v.182, p.243-264.
- WATERS, M.D., BRADY, A.L., STACK, H.F., BROCKMAN, H.E., 1990. The concept of activity profiles of antimutagens. In: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II*. KURODA, I; SHANKEL, D.M.; WATERS, M.D. (eds.). Plenum Press, New York. p.87-104.
- WATTENBERG, L. W., 1983. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res.*, v. 43 p. 2248-2453
- WIJEN, J.P.H., NIVARD, M.J.M., VOGEL, E.W., 2001. Genetic damage by bifunctional agents in repair-active pre-meiotic stages of *Drosophila* males. *Mut. Res.*, v. 478, p.107-117.

- WÜRGLER, F.E., SOBELS, F., VOGEL, E., 1984. *Drosophila* as an assay system for detecting genetic changes. In: Handbook of mutagenicity test procedure (B.J., KILBEY *et. al.*, Eds), 2nd ed. Elsevier, Amsterdam., pp. 55-61.
- WÜRGLER, F.E.; GRAF, U., 1980. Mutation induction in repair-deficient strains of *Drosophila*. In: GENEROSO, W. M.; SHELBY, M.D.& DE SERRES, F. J. (eds) DNA repair and mutagenesis in eukaryotes. New York Plenum Press. Chapter 15, pp. 223-240.
- YOSHIDA E. H., FERRAZ M. C., TRIBUIANI N., TAVARES R.V.S., COGO J., SANTOS M.G.,FRANCO L.M., DAL-BELO C. A., GRANDIS R. A. D., RESENDE F.A., VARANDA E.A., PUEBLA P.,SAN-FELICIANO A., GROppo F. C., OSHIMA-FRANCO Y. (2015). Evaluation of the Safety of Three Phenolic Compounds from *Dipteryx alata* Vogel with Antiophidian Potential. Chinese Medicine, 6, 1-12.
- ZAHIN M, AHMAD I, GUPTA RC and AGIL F (2014). Punicalagin and ellagic acid demonstrate antimutagenic activity and inhibition of benzo[a]pyrene induced DNA adducts. *BioMed. Res. Int.* 2014: 467465.
- ZHANG Y, WU X, REN Y, FU J, et al. (2004). Safety evaluation of a triterpenoid-rich extract from bamboo shavings. *Food Chem. Toxicol.* 42: 1867-1875.
- ZIJLSTRA, J.A., VOGEL, E., BREIMER, D.D., 1979. Occurrence and inducibility of cytochrome P-450 and mixed-function oxidase activities in microsomes from *Drosophila* larvae. *Mutation Research*, v.64, p.151-152.
- ZIJLSTRA, J.A., VOGEL, E.W., 1988. The ratio of induced recessive lethals to ring-X-loss has prognostic value in terms of functionality of chemical mutagens in *Drosophila melanogaster*. *Mut. Res.*, v.201, p.27-38.
- ZIMMERING, S., 1983. The mei-9a test for chromosome loss in *Drosophila*: a review of assays of 21 chemicals for chromosome breakage. *Environmental Mutagenesis*, v.5, p.907-921.