

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Atividade recombinogênica induzida pelo extrato aquoso de
pequi (*Caryocar brasiliense*) em células somáticas de *Drosophila
melanogaster***

Antônio Joaquim de Souza Castro

**UBERLÂNDIA - MG
2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Atividade recombinogênica induzida pelo extrato aquoso de
pequi (*Caryocar brasiliense*) em células somáticas de *Drosophila
melanogaster***

Antônio Joaquim de Souza Castro

**UBERLÂNDIA - MG
2007**

**Atividade recombinogênica induzida pelo extrato aquoso de
pequi (*Caryocar brasiliense*) em células somáticas de *Drosophila
melanogaster***

Aluno: Antônio Joaquim de Souza Castro

Orientador: Júlio César Nepomuceno

Dissertação apresentada ao Curso Pós-graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (MG), como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica – Área Genética.

UBERLÂNDIA-MG
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C355a Castro, Antônio Joaquim de Souza, 1980-
Atividade recombinogênica induzida pelo extrato aquoso de pequi
(Caryocar brasiliense) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*
/ Antônio Joaquim de Souza Castro. - 2007.

44 f. : il.

Orientador: Júlio César Nepomuceno.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Mutagênese - Teses. I. Nepomuceno, Júlio César. II. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bio-
química. III. Título.

CDU: 575.224.4

**Atividade recombinogênica induzida pelo extrato aquoso de
pequi (*Caryocar brasiliense*) em células somáticas de *Drosophila
melanogaster***

Aluno: Antônio Joaquim de Souza Castro

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Júlio César Nepomuceno
Examinadores: Dr. Mário Antônio Spanó
Dr. César Koppe Grisólia

Data da defesa: 27/02/2007

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

Dr. Júlio César Nepomuceno

À minha mãe **Herlinda Oliveira da Silva** pelo amor, carinho e incentivo.
Aos meus irmãos **Danilo Antônio de Souza Castro** e **Vitória Izabel
Silva Souza Castro** pelo carinho, amizade e companheirismo.

Agradecimento Especial

Ao Prof. Dr. **Júlio César Nepomuceno**, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (MG) e do Centro Universitário de Patos de Minas (MG), pela paciência, amizade e pela orientação competente.

AGRADECIMENTOS

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade na leitura e sugestões neste trabalho.

Aos colegas do laboratório de citogenética e mutagênese do UNIPAM pelo apoio e colaborações no trabalho.

Aos colegas do Polivalente, em especial a Tânia Gonçalves Maria, Aparecida de Lima, Simone Isabel da Cunha Araújo, Simone Reis, Maria Cristina de Araújo, Júnia Coutinho Antunes, Belkis Corazine Alves Porto e Guilherme Macedo Caixeta pelo apoio e amizade.

Aos meus tios Ronaldo e Ení que sempre mim apoiaram quando permanecia nessa cidade.

Aos amigos, Haroldo Borges Veloso, Vicente de Paulo Rocha e Marcio pela amizade e convivência.

À Cristina das Dores Dias, pelo carisma e sincera amizade durante a realização do trabalho.

Ao Wender Ferreira Costa, pela amizade, apoio e colaboração no trabalho.

Aos colegas de mestrado, em especial a Elaine Sílvia Dutra e a Sabrina Santos Vaz, pela amizade e incentivos.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – Patos de Minas – MG.

Recebemos o apoio Financeiro dos seguintes órgãos:

- ◆ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.
- ◆ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.
- ◆ Universidade Federal de Uberlândia – UFU.
- ◆ Centro Universitário de Patos de Minas – MG.
- ◆ Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais - FAPEMIG

SUMÁRIO

Capitulo Geral

1. Introdução geral	01
1.1 Plantas medicinais	01
1.2 <i>Caryocar brasiliense</i> Camb	04
1.3 Doxorubicina	07
1.4 Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation and Recombination Test – SMART) em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	08
1.5 Objetivos	13
1.6 Referências Bibliográficas	14

Capitulo Único

Resumo	20
Abstract	21
1. Introdução	23
2. Material e Métodos	26
2.1 Agente químico	26
2.2 Preparação do extrato aquoso de <i>Caryocar brasiliense</i>	26
2.3 Teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART)	26
2.3.1 Cruzamentos	27
2.3.2 Coleta dos ovos	27
2.3.3 Tratamento	27
2.3.4 Montagem de lâminas	27
2.3.5 Análise microscópica das asas	28
2.3.6 Análise estatística	28
3. Resultados	29
4. Discussão e Conclusão	36
5. Referências Bibliográficas	41

Listas de Tabelas

Tabela 1. Freqüências de manchas observadas nos descendentes trans-heterozigotos e balanceadores heterozigotos de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão, tratados com extrato aquoso de pequi (EAP) em três diferentes doses (1, 5 e 10%)..... 32

Tabela 2. Freqüências de manchas observadas nos descendentes trans-heterozigotos e balanceadores heterozigotos de *Drosophila melanogaster* do cruzamento de alta bioativação, tratados com extrato aquoso de pequi (EAP) em três diferentes doses (1, 5 e 10%)..... 33

Tabela 3. Freqüências de manchas observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos padrão e de alta bioativação, tratados com extrato aquoso de pequi (EAP) em três diferentes doses (1, 5 e 10%) e doxorrubicina (0,125 mg/mL)..... 34

Listas de figuras

Figura 1 – <i>Caryocar brasiliense</i> – Pequiizeiro	05
Figura 2 – Frutos do pequiizeiro (<i>Caryocar brasiliense</i>).	06
Figura 3 – Fórmula estrutural do quimioterápico Doxorubicina.	07
Figura 4 – Casal de <i>Drosophila melanogaster</i>	09
Figura 5 – (A) Pêlos <i>multiple wing hairs</i> ; (B) Pêlos <i>flare</i>	10
Figura 6 – Fenótipo das asas dos descendentes trans-heterozigotos (A); e dos heterozigotos balanceados (B).	11

1. Introdução Geral

1.1. Plantas medicinais

As plantas são uma importante fonte de produtos naturais ativos, que podem ser utilizados tanto na forma natural ou como modelo para síntese de fármacos. As plantas e microorganismos fornecem a indústria farmacêutica algumas das mais importantes fontes de compostos para pesquisa de novos medicamentos. Na última década, muitos estudos foram direcionados para a medicina popular, com o propósito de identificar produtos naturais com propriedades terapêuticas (Kilani et al., 2005). Em todo mundo, a medicina tradicional está sendo reavaliada por extensivas pesquisas com diferentes espécies de plantas e seus princípios terapêuticos (Scartezzini e Speroni, 2006).

Segundo Maciel et al. (2002) o uso de plantas no tratamento e cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. A medicina caseira ou popular é comum tanto em regiões pobres como nas grandes cidades brasileiras. Assim, as plantas medicinais podem ser comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas, também, em quintais residenciais.

A natureza é uma fonte em potencial de agente fitoterápicos. Produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todas as drogas de uso clínico no mundo. As plantas superiores contribuem mais que 25% desse total. Aproximadamente, metade das espécies de plantas superiores vive nas florestas tropicais, sendo assim, essas florestas representam um reservatório em potencial de várias substâncias com atividade biológica. Elas fornecem produtos químicos naturais com inestimáveis compostos que servem como ponto de partida para o desenvolvimento de novas drogas. O potencial para o descobrimento de novos compostos é enorme, uma vez que somente 1% das espécies tropicais foi estudada do ponto de vista fitoquímico ou farmacológico (Gurib-Fakim, 2006).

As regiões tropicais são consideradas como a principal fonte de plantas medicinais, e assim uma potencial fonte de agentes anticâncer. Diversos vegetais

são usados amplamente, em todo mundo, como especiarias e condimentos na culinária e, vários destes itens, são usados na medicina popular (Manosroi et al., 2005). Como na África, as Américas do Sul e Central, têm uma rica cultura envolvendo plantas medicinais. No entanto, é pouco conhecida e não é devidamente estudada. Os países das Américas do Sul e Central são uma fonte de novos medicamentos desenvolvidos a partir das plantas. As plantas tropicais são fontes diretas de agentes terapêuticos como, por exemplo, o alcalóide D – tubocuralina extraído da *Chondrolendron tomentosum*. Também, as plantas tropicais, são usadas como fontes para elaboração de compostos semi-sintéticos. Um exemplo, é o extrato saponina que é quimicamente alterado para produzir o sapogenina, utilizado para fabricação de esteroides. Substâncias encontradas na flora tropical servem como modelo para síntese de novos compostos. (Gurib-Fakim, 2006).

As pessoas que fazem uso de plantas medicinais podem não compreender a científica razão das propriedades medicinais. Com tudo, elas conhecem, por conhecimento tradicional que algumas plantas podem ser altamente eficientes, se usadas doses terapêuticas. O poder curativo das plantas é mais bem entendido com a ampliação dos conhecimentos sobre as funções fisiológicas humanas.

As plantas medicinais contêm várias classes de fitoquímicos que têm propriedades antimutagênica, antioxidante, anticarcinogênica, imunomoduladora (Punturee et al., 2004). Para Gurib-Fakim, (2006) uma única planta pode conter substâncias de sabor amargo estimulante da digestão, antiinflamatória, compostos que reduzem inchaço e dor, compostos fenólicos que podem agir como antioxidante, anti-bacterial, e anti-fúngico, taninos que age como antibióticos naturais. Alcalóides que aumentam o humor dando a sensação de bem estar, e diversas substâncias que aumentam a eliminação de resíduos e toxinas.

Os compostos fitoquímicos, responsáveis pelas propriedades medicinais, são provenientes do metabolismo secundário e funções fisiológicas das plantas. Esses compostos atuam como princípios ativos e são divididos em vários grupos, de acordo com as funções e estrutura química (Okuda, 2005).

Os fitoquímicos encontrados nas plantas, que são responsáveis pelo poder medicinal, são constituídos de compostos ativos. Esses compostos são

capazes promover respostas fisiológicas quando no organismo animal. No entanto, os fitoquímicos podem ter efeitos benéficos como também causar efeitos indesejáveis ou tóxicos. O mecanismo de ação dos princípios ativos são semelhantes às drogas sintéticas, contudo, geralmente, com menos efeitos adversos devido às interações com outras substâncias existente nas plantas e baixa concentração desses componentes nas plantas (Simões et al., 2001).

Pouco se sabe sobre o potencial de risco que as plantas podem trazer à saúde humana. Componentes anti-nutricional e tóxicos estão presentes em muitas plantas, como ácido oxálico, ácido nítrico e ácido erúxico. Várias dessas substâncias, presentes em algumas plantas, expressam atividades citotóxicas e genotóxicas, mostrando, muitas vezes, uma correlação com a incidência de câncer (Yen et al., 2001).

De acordo com Manosroi et al. (2005), componentes fenólicos e flavonóides, tais como, ácido cinâmico, ácido caféico, ácido sinápico e ácido rosmainico são responsáveis pela ação antioxidante, seqüestradores de radicais livres e metais quelantes. Eles também podem agir nas fases $G_0 - G_1$ e $G_1 - S$ do ciclo de divisão celular inibindo a proliferação celular e tendo, portanto, uma ação antitumoral.

Muitas aplicações clínicas, dos metabólitos secundários das plantas e de seus derivados, são usadas no combate ao câncer há mais de um século. De todas as drogas utilizadas no tratamento contra o câncer, disponíveis entre 1940 e 2002, 40% são produtos naturais ou derivados, com outros 8% produtos sintetizados a partir de produtos naturais. Os agentes anticâncer das plantas em uso clínico podem ser categorizados em quatro principais classes de compostos: alcalóides, epipodofilotoxinas, taxanas e camptotecinas. A maioria destes compostos está associada com a paralisação do ciclo de divisão celular. Alguns agem, principalmente, ligando-se aos microtúbulos, induzindo sua despolimerização e parando o ciclo em metáfase (Balunas e Kinghorn, 2005).

De acordo com Balunas e Kinghorn (2005), uma outra estratégia de combate ao câncer é quimioprevenção, que consiste na suplementação alimentar com compostos naturais, oriundos principalmente das plantas, para reverter ou suprimir o processo de carcinogênese. A carcinogênese é um processo de várias etapas em que uma célula normal é transformada em células cancerosas. Essas

etapas envolvem: a iniciação, que é causada por agentes danosos ao DNA; promoção, que consiste no aumento da proliferação celular; e a progressão que envolve alterações genéticas adicionais.

A quimioprevenção é uma estratégia que almeja interromper cada uma dessas etapas. A estratégia anti-iniciação consiste em induzir reparos na molécula de DNA. A detoxificação como, por exemplo, o seqüestro de radicais livres e de metabólitos carcinogênicos, atua na etapa de anti-promoção. Na anti-progressão a estratégia é suprimir a proliferação, aumentar a imunidade, reduzir o processo inflamatório e aumentar a apoptose (Balunas e Kinghorn, 2005).

1.2. *Caryocar brasiliense Camb.*

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Theales

Família: Caryocaraceae

Gênero: *Caryocar*

Espécie: *Caryocar brasiliense Camb.*

Caryocar brasiliense (figura 1) é uma espécie arbórea nativa dos cerrados brasileiros (Araújo, 1995). Sua ocorrência abrange todo o cerrado brasileiro, sendo encontrado principalmente nas regiões de cerrado denso e cerrado ralo, com distribuição nos Estados de Goiás, Minas Gerais, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia, Ceará, Maranhão, Tocantins e Piauí (Almeida et al., 1998).

É uma planta semidecídua, heliófita, xerófita seletivamente. Ocorre em agrupamento, tanto em formação primária como secundária e pioneiras (Lorenzi, 2000). O pequizeiro é uma espécie que pode ser empregada em programas de reflorestamento de áreas degradadas, e em programas de renda familiar, por ser uma espécie de fruto muito apreciado na região. E ainda possui madeira de boa qualidade, própria para xilografia, construção civil e naval (Pozo, 1997).



Figura 1 – *Caryocar brasiliense* - Pequizeiro

O plantio por sementes ocorre na estação chuvosa. Prefere climas quentes sendo ideais as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil. Na produção de mudas, a maior dificuldade está na demora para a germinação, que só ocorre entre 120 e 360 dias após a semeadura. Para acelerar o processo, submetem-se os caroços a um tratamento em uma solução com ácido giberélico antes de semeá-los (Araújo, 1994).

O pequi é o fruto produzido pela *Caryocar*, cujo nome é derivado da palavra tupi “pyqui” em que Py significa casca e qui espinho. De acordo com a região, pode receber o nome de piqui, piquiá-bravo, amêndoa-de-espinho, grão-de-cavalo, pequerim, suari e piquiá (Almeida et al., 1998). O fruto é drupóide, conforme figura 2, com aproximadamente 3,2 x 6,5 a 7,8 cm, verde, epicarpo coriáceo carnoso, pirênios 1 a 4, envolvidos pelo mesocarpo, com aproximadamente 2,8 a 3,8 x 2,9 cm; mesocarpo amarelo claro, endocarpo lenhoso espinhoso, sementes reniformes (Almeida et al., 1998). A polpa madura é abundante, espessa e de cor clara. A casca é muito aderente às sementes, quando o fruto está verde, mas se solta com facilidade se está amadurecida (Vera et al., 2005). A casca do fruto é responsável por cerca de 84% do peso total, enquanto a polpa representa 10% e o caroço aproximadamente 6% (Ferreira et al., 1987).



Figura 2 – Frutos do pequi (*Caryocar brasiliense*)

A maior importância do pequi é devido ao uso de seus frutos na culinária como fonte de vitaminas e na extração de óleos para fabricação de cosméticos. De acordo com Almeida e Silva (1994), o pequi é utilizado na medicina popular no tratamento de problemas respiratórios, como afrodisíaco, suas folhas são adstringentes e podem estimular a produção da bÍlis. O óleo da polpa pode ser usado no controle de tumores, como também em problemas oftalmológicos devido à deficiência de vitamina A.

O pequi, dentre as várias espécies do Cerrado brasileiro (araticum, baru, buriti, cagaita, jatobá e mangaba), apresenta a maior quantidade de lipídios (20%). Em relação à concentração de proteínas (2,64%), apresenta valores inferiores apenas ao jatobá e baru. O teor de fibras contida na polpa de pequi é de aproximadamente 13% e apresenta cerca de 19,6% de carboidratos (Almeida, 1998; Faccioli e Gonçalves, 1998).

SANO e ALMEIDA (1998) relata que a polpa do pequi apresenta alto teor de pectina (2,23%), em comparação com as outras frutas nativas do Cerrado que apresentam valores inferiores a 1%. A pectina é um importante parâmetro para a industrialização e comercialização das frutas. Com relação à presença de tanino, caracterizada pela adstringência das frutas, o pequi apresenta baixa concentração (0,17%) em comparação com o buriti (1,11%).

O teor de α e β caroteno, que são os precursores de vitamina A, na polpa de pequi é de 7,46mg a cada 100mg de polpa, superada apenas pelo buriti.

Também é altamente rico em vitamina A como em vitamina B1 e B2. A polpa do pequi apresenta 78,72 mg de vitamina C por 100g (Azevedo-Medeiro e Rodriguez-Amaya, 2004).

1.3. Doxorrubicina

O cloridrato de doxorrubicina (figura 3) é um antibiótico antitumoral antraciclínico isolado de culturas de *Streptomyces peucetius var. caesi* (Pharmacia & Upjohn S.p.A.). De acordo com Rocha et al. (2001), a doxorrubicina é, também, conhecida como adriamicina. A adriamicina é um quimioterápico muito utilizado no tratamento de vários tipos de tumores humanos, principalmente em carcinomas de mama, do endométrio, ovário, testículo, tireóide e pulmão. Este quimioterápico é utilizado, também, no tratamento de alguns sarcomas e neoplasias.

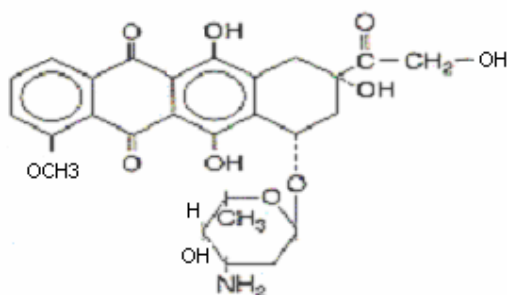


Figura 3 – Fórmula estrutural do quimioterápico Doxorrubicina.

Os antibióticos antraciclínicos possuem uma estrutura de anel tetraciclina com um açúcar incomum, a daunosamina, fixada por ligação glicosídica. Todos os agentes citotóxicos dessa classe possuem componentes quinona e hidroquinona em anéis adjacentes, que lhes permitem atuar como agentes aceptores e doadores de elétrons (Hardman et al., 2002).

O mecanismo de ação das antraciclinas está relacionado com a capacidade desses compostos intercalar com a molécula de DNA afetando muitas de suas funções, bem como síntese de DNA e RNA. Estes compostos provocam ruptura nos filamentos dos ácidos nucléicos, troca de cromátides irmãs e liga-se a

topoisomerase II, impedindo o reparo dos danos no DNA. As antraciclinas, em virtude de seu grupo quinona, também geram radicais livres que atacam o DNA (Hardman et al., 2002).

A exposição de células a doxorrubicina resulta em apoptose devido aos danos ocorrido no DNA e no mecanismo de reparo p53. Nas células que resistem, observa-se aumento da atividade da glutationa peroxidase e atividade diminuída da topoisomerase (Hardman et al., 2002).

A doxorrubicina é metabolizada pela citocromo P450 redutase para formar intermediários radicais semiquinonas, os quais são capazes de reagir com oxigênio para produzirem radicais de ânion superóxido, esses produtos podem gerar peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (OH) os quais são citotóxico para as células (Keizer et al., 1990).

A doxorrubicina, como muitos outros agentes citotóxicos, provoca depleção da medula, que é de curta duração e com rápida recuperação. A mais severa toxicidade inclui a cardiotoxicidade, que é cumulativa e irreversível. Também provoca aberrações cromossômicas e alopecia (Rocha et al., 2001).

1.4. Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

Testes, envolvendo a genética toxicológica, estão concentrados na detecção de agentes indutores de mutações gênicas e de aberrações cromossômica. Estudos avaliando a detecção destes agentes são importantes, porque essas alterações genéticas são consideradas de grande importância para indução de doenças hereditárias, bem como para a iniciação de câncer. Eventos como recombinações mitóticas, conversão gênica e a não-disjunção cromossômica estão associados com o desenvolvimento de vários tumores, isso devido à perda da heterozigose.

Para a detecção de atividade mutagênica e recombinogênica, Graf et al. (1984) descreveram o teste que detecta mutação e recombinação somática em células de asas de *Drosophila melanogaster*, mais conhecido como SMART – *Somatic Mutation And Recombination Test*.

No SMART, a mosca da fruta, *D. melanogaster* (Figura 4), é utilizada como organismo teste na detecção de agentes genotóxicos e, também, na detecção de antígenotóxicos. A *D. melanogaster* é ideal para o estudo de genotoxicidade e antígenotoxicidade *in vivo*, porque é um organismo eucariótico, de pequeno porte, com tempo de geração curto (cerca de 10 dias a 25°C), baixo custo de manutenção em laboratório, e são capazes a ativar, enzimaticamente, promutágenos e procarcinógenos (Graf e Singer, 1992).

Os estoques de *D. melanogaster* são mantidos em frascos de 250 mL, contendo meio de cultura para *Drosophila* preparado com: 820 mL de água, 25 g de fermento biológico (*S. cerevisiae*), 11 g de agar, 156 g de banana e 1 g de nipagin; à temperatura média de 25°C e umidade de 60%.



Figura 4 – Casal de *Drosophila melanogaster*.

As linhagens utilizadas no teste para detecção de mutação recombinação somática em asas de *D. melanogaster* são:

- *mwh/mwh* (*mwh* – multiple wing hairs)
- *flr³/ln(3LR)TM3, ri p^o sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s (flr³ – flare³)*

- *ORR/ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^o sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s (Oregon R – flare³)*

Os indivíduos da linhagem *mwh* possui no cromossomo 3 (3 – 0,3) um gene mutante *mwh*. Esse gene em homozigose recessiva altera o fenótipo dos pêlos da asa de *D. melanogaster*, determinando células com três ou mais pêlos em vez de um (figura 5A).

As moscas da linhagem *flare³* possuem o marcador *flr³*, em um dos braços do cromossomo 3 (3 – 38,8), que afeta o fenótipo do pêlo, dando a aparência de uma chama (figura 5B). Esse marcador em homozigose, em todo o genoma do zigoto, é letal. Devido à letalidade no zigoto, o alelo *flr³* é mantido na linhagem estoque com a presença de um balanceador cromossômico, com múltiplas inversões cromossômicas (TM3, Bd^s - Third Multiple 3, beaded-serrate). Como característica, a mosca portadora desse balanceador possui a borda das asas recortadas e não permite recombinação gênica (Graf et al., 1984; Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

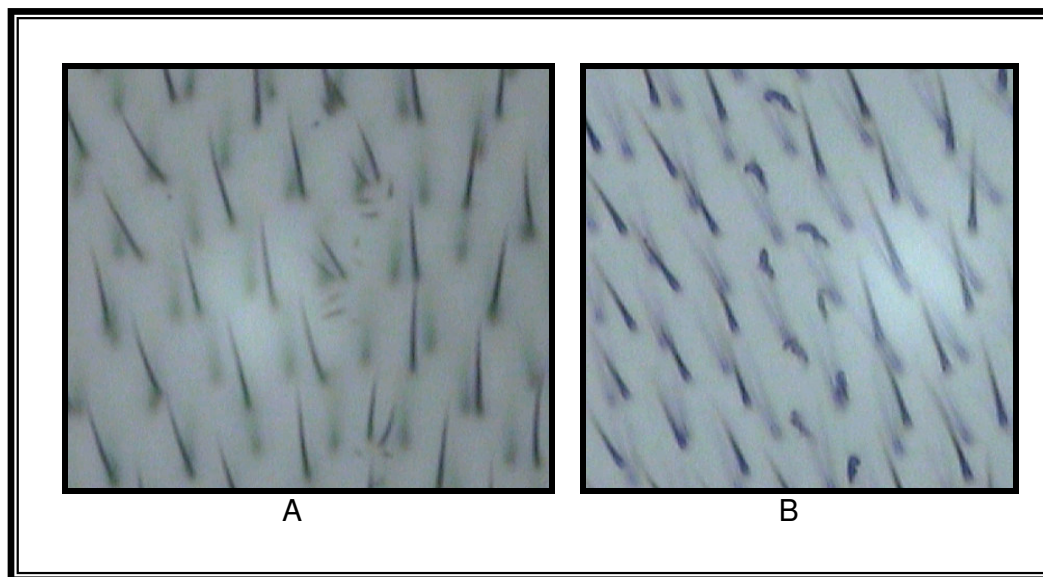


Figura 5 – Pêlos *multiple wing hairs* (A); Pêlos *flare* (B).

Os indivíduos da linhagem *Oregon R – flare³* apresentam a mesma constituição genética da linhagem *flare³*, mas diferindo por apresentar, nos

cromossomos 1 e 2, provenientes da linhagem *Oregon R* resistente ao DDT, alta expressividade das enzimas citocromo P450, as quais são responsáveis pela metabolização e ativação de pró-mutágenos e pró-carcinógenos (Frölich e Würigler, 1989).

Para a realização dos experimentos são realizados os seguintes cruzamentos: 1) cruzamento padrão (ST – *Standard Cross*): fêmeas virgens *flr³* são cruzadas com machos *mwh* (Graf et al., 1989). Cruzamento de alta bioativação (HB – *High Bioactivation Cross*): fêmeas virgens *ORR/flr³* são cruzadas com machos *mwh* (Graf e van Schaik, 1992). O cruzamento HB permite a detecção de promutágenos, devido aos altos níveis de citocromo P450, produzidos pela linhagem *ORR/flr³*, enquanto que o cruzamento ST detecta apenas mutágenos diretos.

Dos cruzamentos descritos acima, obtém-se dois tipos de descendentes: trans-heterozigotos marcados (MH – *mwh+/+flr³*) que possui asas fenotipicamente selvagens; e heterozigoto balanceado (BH – *mwh+/+ TM3, bd⁶*) que apresentam asas fenotipicamente serrilhadas (figura 6) (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

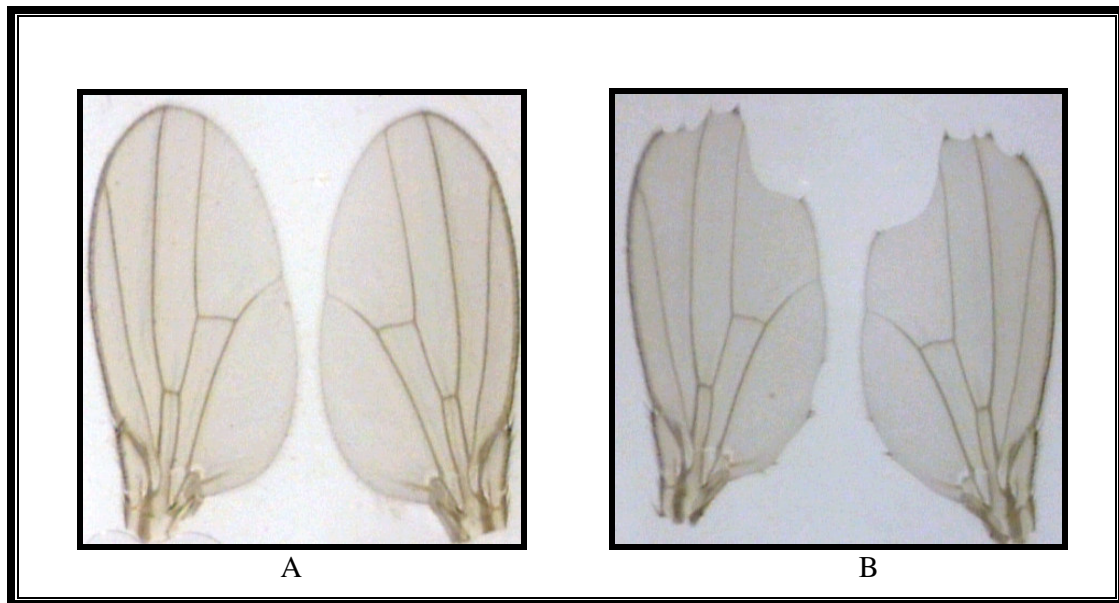


Figura 6 – Fenótipo das asas dos descendentes trans-heterozigotos (A); e dos heterozigotos balanceados (B).

Nos descendentes MH, observam-se todos os tipos de eventos mutacionais, incluindo mutação de ponto, deleção e recombinação gênica. Estes eventos levam à formação de manchas simples (presença apenas do fenótipo *mwh* ou *flr³*) ou gêmeas (fenótipo *mwh* e *flr³*) nas asas de *D. melanogaster*. Já nos descendentes heterozigotos BH não ocorrem eventos recombinogênicos, devido a múltiplas inversões do balanceador gênico. Contudo, nesse caso, manchas simples são produzidas por mutações de ponto e deleções, não aparecendo manchas gêmeas (Frei e Würigler, 1996).

Durante a metamorfose, as células do disco imaginal da asa em larva de *D. melanogaster*, em contato com mutágeno, sofrem mutações ao se diferenciarem nos pêlos das asas. As mutações induzidas são detectadas em moscas adultas que apresentam manchas simples ou gêmeas.

Portanto, o SMART é um teste rápido de curta duração, de fácil realização, baixo custo, no qual as larvas heterozigotas são expostas aos componentes teste. Este teste tem demonstrado ser eficiente para testar atividade genotóxica e antigenotóxica (Graf et al., 1998).

1.5. Objetivos

Por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática, em células de asas de *D. melanogaster*, este trabalho teve com objetivos:

- ◆ Avaliar o potencial genotóxico do extrato aquoso de pequi;
- ◆ Avaliar o potencial antigenotóxico do extrato aquoso de pequi, quando associado à DXR;
- ◆ Verificar se o sistema de ativação citocromo P 450 tem influência na genotoxicidade ou antigenotoxicidade do extrato aquoso de pequi;
- ◆ Qualificar a frequência de recombinação induzida pela DXR;
- ◆ Avaliar os efeitos moduladores do extrato aquoso de pequi sobre as frequências de mutação e recombinação induzidas pela DXR.

1.6. Referências bibliográficas

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M; RIBEIRO, J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis. **Planaltina: EBRAPA-CPAC**. 464 p. 1998.

SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. Cerrado ambiente e flora. **Embrapa**. p. 244-285, 1998.

ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A. Piqui e buriti: importância alimentar para população dos cerrados. **Planaltina: EBRAPA-CPAC**. 38 p. 1994.

ARAÚJO, F.D. A review of *Caryocar basiliense* (Caryocaraceae): an economically valuable of central Brazilian Cerrados. **Economic Botany**. v. 49, p. 40-48, 1995.

ARAÚJO, F.D. The ecology, ethnobotany and management of *Caryocar basiliense* Camb. around Montes Claros, MG, Brasil. 1994. 175 f. Thesis (Doctor in Plant Sciences) – University of Oxford, Oxford, 1994.

AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.17, p. 385-396, 2004.

BALUNAS, M.J. and KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**. v. 78, p. 431-441, 2005.

FACIOLI, N.L.; GONÇALVES, A.G. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de pequi (*Caryocar basiliense* Camb.). *Química Nova*. v. 21, p. 16-19, 1998.

FERREIRA, F.R.; BIANCO S.; DURIGAN, J.F.; BELINGIERI, P.A. Caracterização física e química de frutos maduros de pequi. **In Congresso Brasileiro de Fruticultura, 9. Campinas, São Paulo. Anais.** p. 643-646, 1987.

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. **Mutat. Res.**, v. 334 p. 247-258, 1996.

FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F.E. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. **Mutat. Res.**, v. 216, p. 179-87, 1989.

GRAF, U.; ABRAHAM, S.K. GUZMÁN-RINCÓN, J. WÜRGLER, F.E. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.**, v. 402, p. 203-209, 1998.

GRAF, U.; FREI, H.; KÄGI, A.; KATZ, A.J.; WÜRGLER, F.E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutat. Res.**, v. 222, p. 359-373, 1989.

GRAF, U.; SINGER, D. Genotoxicity testing of promutagens in the wing Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Rev. Int. Contam. Ambient.** v.8, p. 15-27, 1992.

GRAF, U.; VAN SCHAİK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutat. Res.**, v. 271, p. 59-67, 1992.

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mutagen.**, v. 6, p. 153-188, 1984.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of medicine.** v. 27, p. 1-93, 2006.

GUZMÁN-RINCÓN, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic and recombination test as a biomonitor. In BUTTERWORTH, F.M.; CORKUN, L.D.; GUZMÁN-RINCÓN, J. (eds) **Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change**. Phenunm Press, New York, NY, pp169-181, 1995.

HARDMAN, J.G.; LIMBRID, L.E.; GILMAN, A.G. **The pharmacological basis of therapeutics**. 10. edição. McGraw Hill, 2002.

KEIZER, H.G.; PINED, H.M.; SCHUURUIS, G.J.; JOENJE, H. Doxorubicin (adriamycin): A critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. **Pharmacol. Ther.** v.47, p.219-331, 1990.

KILANI, S.; AMMAR, R.B.; BOUHEL, I.; ABDELWAHED, A. HAYDER, N.; MAHMOUD, A. GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Investigation of extracts from (Tunisian) *Cyperus rotundus* as antimutagens and radical scavengers. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 20, p. 478-484, 2005.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Planatarum**. v. 1, p. , 2000.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, p. 429-438, 2002.

MANOSROI, J.; DHUMTANOM, P.; MANOSROI, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Letter**. v. 235, p. 114-120, 2006.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**. v. 66, p. 2012-2031, 2005.

POZO, O.V.C. O pequi (*Caryocar basiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do cerrado no norte de Minas Gerais. 100 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

PUNTUREE, K.; WILD, C.P.; VINITKETKUMNEUN, U. Thai medicinal plants modulate nitric oxide and tumor necrosis factor- α in J774.2 mouse macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 95, p. 183-189, 2004.

ROCHA, A.B.; LOPES, R.M.; SCHWARSTMANN. Natural products in anticancer therapy. **Curr. Opin. Pharmacol.** v. 1, p. 364-369, 2001.

SCARTEZZINI, P.; SPERONI, E. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 71, p. 23-43, 2000.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacologia da planta ao medicamento**. 2ª Edição. Editora da UFSC. 1090 p. 2003.

VERA, R.; NAVES, R.V.; NASCIMENTO, J.L.; CHAVES, L.J.; LEANDRO, W.M.; SOUZA, E.R.B. Caracterização física de frutos do pequi (*Caryocar basiliense* Camb.) no estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v.35, p. 71-79, 2005.

VOGEL, E.W.; ZILSTRA, J.A. Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparasion with genetic damage in early germ-cell stages. *Mutat. Res.*, v. 180, 189-200, 1987.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y.; PENG, H.H. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. **Food and Chemical Toxicology**. v. 39, p. 1045-1053, 2001.

Capítulo Único

Atividade recombinogênica induzida pelo extrato aquoso de pequi (*Caryocar brasiliense*) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

SUMÁRIO

CAPITULO ÚNICO

Resumo	20
Abstract	21
1. Introdução	23
2. Material e Métodos	26
2.1 Agentes químicos	26
2.2 Preparação do extrato aquoso de <i>Caryocar brasiliense</i>	26
2.3 Teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART)	26
2.3.1 Cruzamentos	27
2.3.2 Coleta dos ovos	27
2.3.3 Tratamento	27
2.3.4 Montagem de lâminas	27
2.3.5 Análise microscópica das asas	28
2.3.6 Análise estatística	28
3. Resultados	29
4. Discussão e Conclusão	36
5. Referências Bibliográficas	41

Resumo

A *Caryocar brasiliense* é uma planta, conhecida popularmente como pequi, nativa do cerrado brasileiro, amplamente utilizada na culinária brasileira. O fruto do pequi apresenta alto teor de carotenos (que é uma pro-vitamina A) e retinol e vitamina C. Esses compostos são eficientes antioxidantes, seqüestrando radicais livres e prevenindo a ação mutagênica de agentes físicos e químicos. Contudo, em altas concentrações, podem ter efeitos recombinogênicos e mutagênicos. Para avaliar os efeitos genotóxicos do pequi foram preparados extratos aquosos do pequi (EAP) nas concentrações de 1%; 5% e 10%. Para tanto, utilizou-se o teste da mancha da asa em *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART). O SMART foi realizado por meio dos seguintes cruzamentos: 1) – cruzamento Padrão (ST – Standard Cross): fêmeas virgens $flare^3$ ($flr^3/TM3, Bd^s$) foram cruzadas com machos mwh/mwh ; 2) – cruzamento de alta bioativação (HB – “High Bioactivation Cross”), no qual fêmeas virgens ORR (ORR, $flr^3/TM3, Bd^s$) foram cruzadas com machos mwh/mwh . Desses cruzamento foram obtidos dois tipos de descendentes: heterozigoto marcado (MH - $mwh +/+ flr^3$); heterozigoto balanceado (BH - $mwh +/+ TM3, Bd^s$). Larvas de 72 horas, de ambos cruzamentos, foram tratadas com diferentes concentrações de EAP (1%, 5% e 10%). Como controles negativo e positivo foram utilizados, respectivamente, água destilada e doxorubicina (DXR) (0,125mg/mL). O trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos do EAP e seus efeitos antígenotóxicos contra a ação genotóxica da DXR (0,125mg/mL). Os resultados obtidos demonstraram que o EAP induziu um aumento, estatisticamente significativo, na frequência de manchas mutantes quando comparado com o controle negativo em todas as concentrações do cruzamento HB e somente na concentração de 10% do cruzamento ST. Na análise dos descendentes BH observou-se efeito recombinogênico, do EAP, somente quanto metabolizado pelas P-450. Quando associado a DXR ocorre uma potencialização do efeito genotóxico desse

quimioterápico. Portanto, pode-se concluir que, nestas condições experimentais e nas concentrações testadas, o extrato aquoso de pequi apresentou um potencial mutagênico e recombinogênico.

PALAVRAS CHAVE: Pequi, *Drosophila melanogaster*, SMART, doxorubicina.

Abstract

Caryocar brasiliense is a plant popularly known as pequi, native from the Brazilian “cerrado”, and is widely used in Brazilian cookery. Its fruit presents a high level β -carotenes (which is a pro-vitamin A), retinol and vitamin C. These are efficient anti-oxidizing components, and they scavenging free radicals and prevent mutagenic action of physical and chemical agents. However, in high concentrations it may have mutagenic and recombinogenic effects. So to valuate the genotoxic effects of the pequi we prepared aqueous extracts of pequi (AEP) in concentrations of 1%, 5% and 10%. For this we used the wing spot test in *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART). The SMART was fulfilled through the following crossings: 1) standard cross (ST); flare3 virgin females ($flr^3/TM3$, Bd^6) were crossed with mwh/mwh males; 2) HB – High Bioactivation Cross which ORR (ORR , $flr^3/TM3$, Bd^6) virgin females were crossed with mwh/mwh males. From these crossings, we obtained two kinds of descendents: marked heterozygote (MH - $mwh +/+ flr^3$); balanced heterozygote (BH - $mwh +/+TM^3$, Bd^6). 72-hour larvae from both crossings were treated with different concentrations of AEP (1%, 5% e 10%). Distilled water and doxorubicin (DXR) (0,125mg/mL) were respectively used as negative and positive controls. The present study aimed the valuating the genotoxic effects of AEP and its anti-genotoxic effects against the genotoxic action of DXR (0,125mg/mL). The results obtained demonstrated that AEP induced a statistically significant increase in the frequency of mutant spots, when compared to negative control in all concentrations of HB crossi and only in the concentration of 10 % of ST crossi. In the analysis of HB descendents, we observed a recombinogenic effect of AEP,

only when metabolized by P-450. When associated to DXR, there may be an overpotentiality of the genotoxic effect of this chemotherapy. This way, we may conclude that, in these experimental conditions and in the tested concentrations, the aqueous extract of pequi presented a mutagenic and recombinogenic potential.

Key words: Pequi, *Drosophila melanogaster*, SMART.

1. Introdução

O uso de plantas medicinais, na cura das enfermidades, é tão antigo quanto a existência da espécie humana. Nem sempre o conhecimento sobre as plantas medicinais é baseado em conhecimento científico, mais na medicina folclórica. No entanto, nas últimas décadas, tem sido feito vários estudos com o fim de entender as propriedades terapêuticas das plantas bem como identificar os princípios ativos encontrados nas plantas medicinais.

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas e seus mecanismos de ação são uns dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e farmacológica. As plantas contêm vários constituintes que podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos, devido à presença de compostos diferentes contribuindo para a mesma atividade (Maciel et al., 2002). Portanto, a investigação do uso tradicional de plantas medicinais é importante em dois níveis: primeiro como uma potencial fonte de drogas, e segundo, como medida de segurança para o uso contínuo das plantas medicinais (Vershaeve et al., 2004).

O poder medicinal das plantas é devido aos compostos oriundos de seu metabolismo secundário. Dentre esses compostos destacam-se os terpenóides, fenóis, alcalóides e carotenóides. Devido às suas propriedades antioxidantes atuam como moduladores de mutagênicos e carcinogênicos (Romero-Jiménez et al., 2005).

Extratos de plantas são usados no tratamento de várias doenças, de acordo com o conhecimento acumulado durante vários séculos. Pesquisas científicas mostram que algumas substâncias, presentes nas plantas medicinais, podem ser potencialmente tóxicas e carcinogênicas (Vershaeve et al., 2004).

Caryocar brasiliense Camb., popularmente conhecida como pequi, é uma espécie típica do Cerrado brasileiro. Segundo Marques et al. (2002) o pequi é comumente usado na culinária local em pratos típicos, como também na medicina popular no tratamento de algumas doenças.

O Pequi tem altura média de 6-10m, com tronco tortuoso de 30-40cm de diâmetro. Folhas compostas trifolioladas, com folíolos pubescentes. A polpa é de coloração amarelo-intensa envolve um caroço duro formado por grande quantidade de pequenos espinhos, podendo frutificar de janeiro a abril (Almeida e Silva, 1994).

Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya (2004) mostraram que a polpa do pequi é constituída por altos níveis de componentes nutricionais, como ácidos graxos, carboidratos, proteínas, carotenóides, vitamina E e retinol. De acordo com Almeida (1998), a polpa dessa fruta apresenta grande quantidade de pectina e taninos.

Almeida e Silva (1994) afirmam que o chá da folha atua como regulador menstrual, o óleo da polpa como expectorante e o extrato etanólico das folhas possui atividade contra câncer de pele.

Com o teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART), desenvolvido em *Drosophila melanogaster*, é possível detectar uma grande gama de alterações genéticas, tais como mutação de ponto, deleção, recombinação mitótica (Graf et al., 1984). Neste teste utilizam-se moscas com genes marcadores *mwh* e *flr³*, sendo que as alterações são detectadas pela perda da heterozigose desses genes. Durante o desenvolvimento embrionário da *D. melanogaster*, as células do disco imaginal proliferam mitoticamente para formar o corpo da mosca adulta. Alterações genéticas em umas dessas células do disco imaginal levam à formação de células descendentes, portadoras da alteração, formando clones de células mutantes. Assim as alterações são detectadas por alterações fenotípicas nos pêlos das asas da mosca adulta (Guzmán-Rincón e Graf, 1995).

A doxorubicina (DXR) é um agente quimioterápico utilizado no tratamento de várias neoplasias humanas. O mecanismo de ação dessa droga se dá por intercalações na molécula de DNA, produção de uma ampla variedade de radicais livres e inibição da topoisomerase II. Portanto, têm efeitos genotóxicos, tais como clastogênicos em células somáticas e germinativas, mutagênicos e recombinogênicos (Rocha et al., 2001 e Hardman et al., 2002). Em *D. melanogaster*, no teste SMART, a doxorubicina induz efeitos mutagênicos e recombinogênicos (Frölich e Würgler, 1990).

Tendo em vista que o fruto do pequi, rico em carotenóides, vitamina A e C, com evidências de possíveis efeitos antioxidantes, está sendo muito utilizado tanto na medicina popular quanto como condimento, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico do extrato aquoso de polpa de pequi e seus possíveis efeitos antígenotóxicos quando associado a DXR, por meio do SMART de asa de *Drosophila melanogaster*.

2. Material e métodos

2.1. Agente químico

Doxorrubicina (DXR) cloridrato de (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6,-trideoxi-alfa-11ioxohexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-etóxi-5,12-naftacenodiona (CAS 23214-92-8), conhecido comercialmente como Doxolem®, fabricada por Eurofarma Laboratórios Ltda., São Paulo – SP. Cada frasco contém 10 mg de DXR liofilizada. Possui peso molecular 580 e forma molecular $C_{27}H_{29}NO_{11}.HCl$.

2.2. Preparação do extrato aquoso de *Caryocar brasiliense*

O extrato aquoso do pequi foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. César K. Grisolia, do Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (UnB).

O fruto fresco do pequi (*Caryocar brasiliense*) foi comprado em mercado de Brasília e em seguida extraído sua polpa no laboratório. Logo após, a polpa foi colocada no Soxhlet na proporção de 100 g para 1 L de água destilada. O processo de extração foi protegido do ar, com uma atmosfera de argônio. A extração durou em Soxhlet 10 horas. Após a extração, num Rotavapor por 24 horas, foi retirada a água e obtido o extrato concentrado e imediatamente foi congelado a $-80^{\circ}C$.

2.3. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART)

Os estoques de *Drosophila melanogaster* foram mantidos à temperatura de $25^{\circ}C$ e a umidade relativa do ar de 60%, em frasco de 250 mL contendo meio de

cultura [820 mL de água, 11 g de agar, 156 g de banana, 25g de fermento biológico (*Sacharomyces cerevisiae*) e 1 g de nipagin].

2.3.1 Cruzamentos

- ◆ Cruzamento padrão (ST): fêmeas virgens *flr³/ln(3LR)TM3, ri p^o sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s* foram cruzadas com machos *mwh/mwh*.
- ◆ Cruzamento de alta bioativação (HB): fêmeas virgens *ORR/ORR; flr³/ln(3LR)TM3, ri p^o sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^s* foram cruzadas com machos *mwh/mwh*.

2.3.2 Coleta dos ovos

Após ambos cruzamentos foram coletados os ovos, por um período de 8 horas, utilizando frasco de 250mL contendo meio de cultura próprio para a ovoposição. O meio contém uma base de ágar (10 g de ágar / 250 mL de água), sobre a qual foi colocado meio de fermento (250 g de fermento biológico (*Sacharomyces cerevisiae*) e, aproximadamente duas colheres de chá de açúcar).

2.3.3 Tratamento

Larvas de 72 ± 4 horas, provenientes dos cruzamentos ST e HB foram transferidas para frascos contendo 1,5 g de meio purê de batata (Yoki). Em cada frasco foram adicionado 5 mL de extrato aquoso de pequi em diferentes concentrações (1, 5 e 10%) isoladamente e em associação com doxorubicina (0,125 mg/mL). Como controle negativo foi usada água destilada estéril e como controle positivo, DXR (0,125 mg/mL).

Os adultos emergentes foram coletados e preservados em etanol 70%.

2.3.4 Montagem de lâminas

As moscas foram transferidas de etanol 70% para recipiente contendo água destilada. As asas foram destacadas do corpo da mosca e entendidas, aos pares, em lâminas codificadas. Para fixar as asas, foi utilizada a solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato cloral e 50 mL de água). Deixou-se secar por 1 hora em chapa aquecedora (60^o C). As lâminas foram montadas com lamínulas e solução de Faure. Para que as asas ficassem com a superfície bastante plana, foram colocados, sobre a lamínula, pesos de metal de aproximadamente 400 g e deixadas secar por mais 1 hora em chapa aquecedora (60^o C).

2.3.5 Análise microscópica das asas

As asas de *D. melanogaster* foram analisadas em microscópio óptico de luz (objetiva 40X). Foram registrados o número e os tipos de manchas encontradas (simples ou gêmeas), assim como o tamanho das mesmas, e a posição em que se encontravam nas asas. Ao final da análise, foram comparadas as freqüências de manchas mutantes encontradas nas asas das moscas tratadas com extrato aquoso de pequi com as encontradas nos controles negativos. E as freqüências de manchas mutantes encontradas nas asas das moscas tratadas com extrato aquoso de pequi associado com DXR foram comparadas com as encontradas nos controles positivos. Aproximadamente 24.400 células foram analisadas por asa

2.3.6 Análise estatística

A análise estatística dos experimentos realizados para verificação dos efeitos genotóxico do extrato aquoso de pequi foi realizada por meio do teste descrito por Frei e Würigler (1988). Para análise de antigenotoxicidade, as freqüências de cada tipo de mancha por mosca, foram comparadas aos pares usando o teste *U* de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würigler, 1995).

3. Resultados

As larvas dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH), de ambos os cruzamentos (ST e HB), foram tratadas em idênticas condições. Para a realização do teste foram feitos experimentos independentes: controle negativo (água destilada estéril); controle positivo (doxorrubicina – DXR 0,125 mg/mL); três diferentes concentrações de extrato aquoso de pequi EAP (1, 5 e 10%) isoladamente e três concentrações de EAP (1, 5 e 10%) associadas com doxorrubicina (0,125mg/mL).

A Tabela 1 mostra as freqüências de manchas mutantes nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) do cruzamento padrão (ST), tratados com extrato aquoso de pequi (EAP) nas concentrações de 1, 5 e 10%.

Somente na concentração de 10% de EAP ocorreu aumento estatisticamente significativo no numero total de manchas quando comparado com a freqüência de manchas observada no controle negativo. Assim sendo, procedeu-se análise dos descendentes heterozigotos balanceados (BH), com o propósito de calcular a parcela de eventos recombinogênicos e mutagênicos.

Nos descendentes do cruzamento ST tratados com EAP a 10%, a porcentagem de freqüências total de machas mutantes oriundas por mutações foi de 64,3% e por recombinações foi de 35,7%.

Nos descendentes heterozigotos balanceados (BH), tratados com EAP a 10%, não foram verificados aumentos, estatisticamente significativos, de manchas mutantes em todas as categorias de manchas. Diante dos resultados negativos, observados nas concentrações 1 e 5% de EAP não foram analisados os descendentes BH para essas concentrações.

Os dados da tabela 2 mostram as freqüências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e

heterozigotos balanceados (BH), do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), tratados EAP, nas concentrações de 1, 5 e 10%.

Nos descendentes trans-heterozigotos do cruzamento HB, houve um aumento, estatisticamente significativo, em todas as concentrações testadas, nas freqüências totais de manchas. Na categoria de manchas simples pequenas verificou-se, também, um aumento, estatisticamente significativo, nas concentrações de 1 e 5% de EAP.

Diante do aumento, estatisticamente significativo, dos totais de manchas mutantes dos descendentes MH do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB), foram analisados os descendentes heterozigotos balanceados (BH), para calcular a parcela de eventos recombinogênicos e mutagênicos.

Nos descendentes BH, do cruzamento HB, não foram verificados aumentos, estatisticamente significativos, em todas as concentrações testadas e em todas as categorias de manchas mutantes. Portanto, as porcentagens de eventos mutagênicos dos descendentes do cruzamento HB foram de 22,5%, 33,5% e 25,3% respectivamente nas concentrações de 1, 5 e 10%. E as parcelas de eventos recombinogênicos, para o mesmo cruzamento, foram de 77,5%, 66,5% e 74,7% respectivamente nas concentrações de 1, 5 e 10%.

A figura 2 mostra as freqüências totais de manchas mutantes, por mosca, observadas em asas dos descendentes MH de *Drosophila melanogaster*, provenientes dos cruzamentos ST e HB, tratados com diferentes concentrações de EAP (1, 5 e 10%), água (como controle negativo) e doxorrubicina 0,125mg/mL (como controle positivo).

Os resultados obtidos da análise dos descendentes trans-heterozigotos marcados, dos cruzamentos ST e HB co-tratados com doxorrubicina e diferentes concentrações de EAP (1, 5 e 10%), estão representados na tabela 3.

Nos descendentes do cruzamento ST, foram verificados aumentos, estatisticamente significativos, nas freqüências do número total de manchas e nas freqüências de manchas simples grandes. Estes aumentos foram verificados em todas as concentrações de EAP em associação com DXR, quando comparados ao controle positivo. Nas freqüências de manchas gêmeas houve aumento, estatisticamente significativo, somente nas concentrações de 1 e 5% de EAP, associado a DXR.

Para a categoria de manchas simples pequena, dos descendentes do cruzamento ST, não houve uma diferença estatisticamente significativa, nos indivíduos co-tratados com EAP e DXR, em todas as concentrações, quando comparados ao controle positivo.

Nos descendentes do cruzamento HB verificou-se um aumento, estatisticamente significativo, nas freqüências manchas simples grandes e nos totais de manchas mutantes, nas concentrações de 1 e 5% de EAP associados com DXR. Na categoria de manchas simples pequena houve aumento, estatisticamente significativo, apenas na associação de 5% de EAP com DXR. Na categoria de manchas gêmeas o aumento estatisticamente significativo ocorre apenas na associação de 1% de EAP com DXR.

A figura 3 mostra as freqüências de manchas mutantes, por mosca, observadas em asas dos descendentes MH de *Drosophila melanogaster*, provenientes dos cruzamentos ST e HB, tratadas com diferentes concentrações de extrato aquoso de pequi (1, 5 e 10%) associado com DXR, tendo água como controle negativo.

Tabela 1. Frequência de manchas observadas nos descendentes trans-heterozigotos e balanceadores heterozigotos de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão, tratadas com o extrato aquoso de pequi (EAP) em três diferentes doses (1%, 5% e 10%)

Manchas por indivíduo (No. de manchas) diag. Estatístico ^a														
Tratamento		Nº de Moscas	Pequenas simples (1-2 cels) ^b		Grandes simples (>2 cels) ^b		Gêmeas		Total		manchas <i>mwh</i> ^c	Média das classes de tam. clones <i>mwh</i> ^c (<i>i</i>)	Frequência de clones (10 ⁵ células) ^d	
DXR (mg/mL)	EAP (%)		m = 2	m = 5	m = 5	m = 2	S/ correção por tam. ^{d,e} <i>n/NC</i>	C/ correção por tam. ^{d,e} (2 ^{f-2}) X (<i>n/NC</i>)						
<i>mwh/flr³</i>														
0	0	20	0,30 (06)	0,00 (00)	0,00 (00)	0,30 (06)	6	1,33	0,61	0,39				
0	1	30	0,53 (16) i	0,07 (02) i	0,00 (00) i	0,60 (18) i	18	1,72 {2,11}	1,23 {0,61}	1,01 {0,66}				
0	5	30	0,53 (16) i	0,13 (04) i	0,00 (00) i	0,67 (20) i	20	1,65 {1,91}	1,37 {0,75}	1,07 {0,71}				
0	10	30	0,67 (20) i	0,00 (00) i	0,03 (01) i	0,70 (21) +	21	1,38 {1,42}	1,43 {0,82}	0,93 {0,55}				
0,125	0	20	1,95 (39) +	1,65 (33) +	1,20 (24) +	4,80 (96) +	96	3,15 {3,27}	9,84 {8,91}	21,76 {21,45}				
<i>mwh/TM3</i>														
0	0	20	0,35 (07)	0,00 (00)		0,35 (07)	7	1,00	0,72	0,36				
0	10	20	0,45 (09) i	0,00 (00) i		0,45 (09) i	9	1,22 {2,00}	0,92 {0,20}	0,54 {0,20}				
0,125	0	20	0,85 (17) +	0,30 (6) +		1,15 (23) +	23	1,83 {2,19}	2,36 {1,64}	2,09 {1,87}				

m = fator de multiplicação. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

^dFrequências de clone por mosca dividido pelo número de células analisadas por mosca (48.800).

^fApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

Tabela 2. Frequência de manchas observadas nos descendentes trans-heterozigotos e balanceadores heterozigotos de *Drosophila melanogaster* do cruzamento de alta bioativação, tratados com o extrato aquoso de pequi (EAP) em três diferentes doses (1%, 5% e 10%)

Manchas por indivíduo (No. de manchas) diag. Estatístico ^a																
Tratamento		Nº de Moscas	Pequenas simples (1-2 cels) ^b		Grandes simples (>2 cels) ^b		Gêmeas		Total		manchas mwh ^c	Média das classes de tam. clones mwh ^c (i)	Frequência de clones (10 ⁵ células) ^d			
DXR (mg/mL)	EAP (%)		m = 2	m = 5	m = 5	m = 2	m = 5	m = 2	S/ correção por tam. ^{d,e} n/NC	C/ correção por tam. ^{d,e} (2 ⁱ⁻²) X (n/NC)						
<i>mwh/flr³</i>																
0	0	20	1,15 (23)	0,10 (02)	0,05 (01)		1,30 (26)		26	1,54	2,66	1,93				
0	1	29	1,90 (55) +	0,14 (04) i	0,00 (00) i		2,03 (59)		58	1,45 {1,28}	4,10 {1,43}	2,80 {0,87}				
0	5	29	1,76 (51) i	0,24 (07) i	0,00 (00) i		2,00 (58)		56	1,63 {1,80}	3,96 {1,29}	3,05 {1,13}				
0	10	28	2,11 (59) +	0,07 (02) i	0,00 (00) i		2,18 (61)		61	1,54 {1,54}	4,46 {1,80}	3,25 {1,31}				
0,125	0	20	3,35 (67) +	2,50 (50) +	1,50 (30) +		7,35 (147)		143	3,17 {3,54}	14,65 {10,92}	33,08 {31,73}				
<i>mwh/TM3</i>																
0	0	20	0,70 (14)	0,00 (00)			0,70 (14)		14	1,36	1,51	0,97				
0	1	20	0,45 (09) -	0,00 (00) i		^f	0,45 (09)		9	1,00 {1,92}	0,92 -{0,59}	0,46 -{0,56}				
0	5	20	0,65 (13) -	0,00 (00) i			0,65 (13)		13	1,38 {1,15}	1,33 -{0,18}	0,87 -{0,10}				
0	10	20	0,55 (11) -	0,00 (00) i			0,55 (11)		11	1,27 {1,61}	1,13 -{0,38}	0,68 -{0,29}				
0,125	0,0	20	1,05 (21) i	0,05 (01) i			1,10 (22)		22	1,32 {1,24}	2,25 {0,74}	1,41 {0,44}				

m = fator de multiplicação. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

^dFrequências de clone por mosca dividido pelo número de células analisadas por mosca (48.800).

^fApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

Tabela 3. Frequência de manchas observadas nos descendentes trans-heterozigotos de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão e de alta bioativação, tratadas com o extrato aquoso de pequi (EAP) em três diferentes doses e doxorrubicina (0,125 mg/mL)

Manchas por indivíduo (No. de manchas) diag. Estatístico^a															
Tratamento		Nº de Moscas	Pequenas simples (1-2 cels) ^b		Grandes simples (>2 cels) ^b		Gêmeas		Total		manchas mwh ^c	Média das classes de tam.		Frequência de clones (10 ⁵ células) ^d	
DXR (mg/mL)	EAP (%)		m = 2	m = 5	m = 5	m = 5	m = 2	clones mwh ^c (\hat{i})		S/ correção por tam. ^{d,e} n/NC		C/ correção por tam. ^{d,e} (2 ⁱ⁻²) X (n/NC)			
Cruzamento ST															
0	0	20	0,30 (06)	0,00 (00)	0,00 (00)	0,30 (06)	6	1,33	0,61	0,39					
0,125	0	20	1,95 (39)	1,65 (33)	1,20 (24)	4,80 (96)	96	3,15 3,27	9,84 {9,22}	21,76 {22,19}					
0,125	1	20	1,70 (34) -	5,35 (107) *	3,50 (70) *	10,55 (211) *	197	4,24 4,34	20,18 {19,57}	95,59 {98,74}					
0,125	5	20	2,25 (45) -	4,25 (85) *	3,05 (61) *	9,55 (191) *	180	3,79 3,88	18,44 {17,83}	63,97 {65,59}					
0,125	10	20	2,05 (41) -	2,50 (50) *	1,65 (33) -	6,20 (124) *	119	3,81 3,94	12,19 {11,58}	42,66 {44,37}					
Cruzamento HB															
0	0	20	1,35 (27)	0,15 (03)	0,00 (00)	1,50 (30)	30	1,93	3,07	2,93					
0,125	0	20	3,35 (67)	2,50 (50)	1,50 (30)	7,35 (147)	143	3,17 {3,50}	14,65 {11,58}	33,08 {32,85}					
0,125	1	20	3,85 (77) -	3,95 (79) *	2,55 (51) *	10,35 (207) *	201	3,61 {3,91}	20,59 {17,52}	62,95 {65,68}					
0,125	5	20	2,05 (41) *	5,25 (105) *	1,75 (35) -	9,05 (181) *	175	4,40 {4,91}	17,93 {14,86}	94,64 {111,69}					
0,125	10	20	3,10 (62) -	3,25 (65) -	2,00 (40) -	8,35 (167) -	165	3,68 {4,07}	16,91 {13,83}	54,35 {58,24}					

m = fator de multiplicação. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

^dFrequências de clone por mosca dividido pelo número de células analisadas por mosca (48.800).

^fApenas manchas simples *mwh* podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr*³.

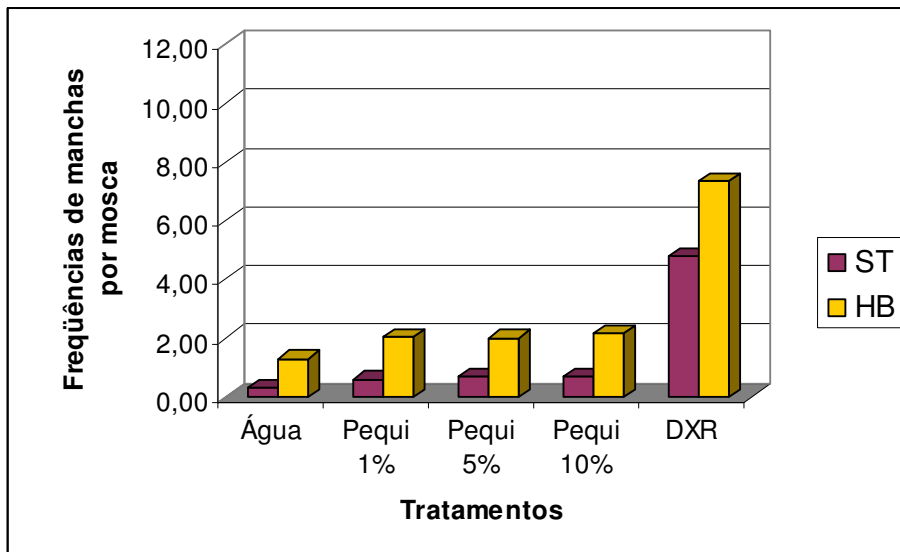


Figura 2: freqüências totais de manchas mutantes por mosca, observadas em asas dos descendentes “MH” de *Drosophila melanogaster*, provenientes dos cruzamentos “ST” e “HB”, tratadas com diferentes concentrações de EAP (1, 5 e 10%).

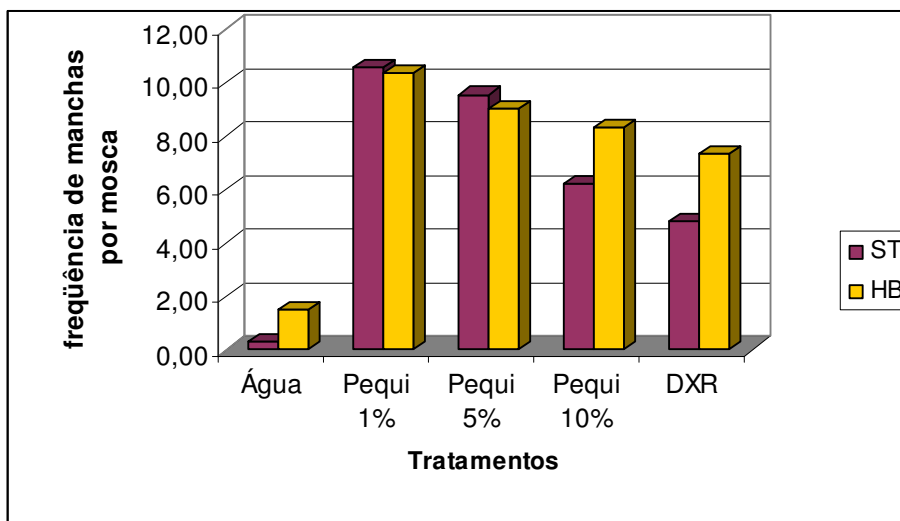


Figura 2: freqüências totais de manchas mutantes por mosca, observada em asas dos descendentes “MH” de *Drosophila melanogaster*, provenientes do cruzamento “ST” e “HB”, tratadas com diferentes concentrações de EAP (1, 5 e 10%) associado com DXR 0,125mg/mL

4. Discussão e Conclusão

O uso da *Drosophila melanogaster* em testes de genotoxicidade é bem estabelecido, devido a sua alta similaridade genômica com mamíferos e é um organismo eucariótico de fácil manutenção em laboratório (Vogel et al., 1999).

O SMART é um teste caracterizado pela sua rapidez, quando comparado com outros testes in vivo, baixo custo, fácil execução e detecta amplos aspectos de alterações genéticas (Graf et al., 1984; 1989). É possível detectar agentes genotóxicos de ação direta, como também agentes genotóxicos indiretos (promutágenos) devido aos altos níveis de citocromo P450 existentes nos descendentes do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB). Esse teste avalia a atividade genotóxica de compostos simples bem como de misturas complexas (Graf et al., 1996). Com a análise dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e dos heterozigotos balanceados (BH) é possível quantificar os eventos recombinogênicos, no total de manchas mutantes detectadas (Spanó et al., 2001). Portanto, o SMART foi usado neste estudo, para avaliar os efeitos genotóxicos do extrato aquoso do pequi (EAP) e sua ação antígenotóxica quando associado à DXR.

Neste experimento, todas as concentrações de EAP apresentaram variações significativas nas freqüências de manchas mutantes no cruzamento HB, quando comparado com os resultados observados no controle negativo. Já no cruzamento ST somente na concentração de concentração de 10% apresentou variação significativa nas freqüências de manchas mutantes. Estes resultados demonstram que, após ser biometabolizado, na presença de enzimas citocromo P-450, o EAP, nestas condições experimentais, apresenta efeitos genotóxicos.

O EAP a 10% induziu aumento na freqüência de manchas no cruzamento ST pode ser devido à alta concentração desse extrato, pois os descendentes do cruzamento ST não são totalmente livres das enzimas citocromo P-450, mas as possuem em níveis basais (Frölich e Würigler, 1989).

As citocromos são um conjunto de enzimas importantes na metabolização de vários fitoquímicos e são capazes de ativar promutágenos em mutágenos (Sun et al. 2000). Promutágenos são substâncias que apresentam maiores freqüências de manchas mutantes nos descendentes do cruzamento HB, após serem metabolizadas pelas citocromo P-450 (Frölich e Würigler, 1989). O EAP, nas concentrações testadas, apresentou maior freqüência de manchas no cruzamento HB, portanto, é possível que exista no EAP algum composto com atividade genotóxica indireta, que necessite de bioativação metabólica, para exercer seus efeitos genotóxicos.

Segundo Paolini et al. (2003) a suplementação de β -caroteno pode interagir com os citocromo P-450 potencializando os efeitos de químicos carcinógenos. Isso mostra que, possivelmente, o β -caroteno necessite de uma metabolização para exercer efeito genotóxico.

De acordo com Graf et al. (1984) as moscas emergentes BH apresentam manchas mutantes somente devido a mutações pontuais, deleção ou não disjunção. Na análise dos descendentes BH, do cruzamento de alta bioativação (HB), não ocorreu aumento estatisticamente significativo de manchas mutantes induzido pelo EAP, mostrando que as manchas mutantes obtidas nos descendentes MH são devido à ocorrência de recombinação. Já na concentração testada nos indivíduos do cruzamento ST a taxa de mutação foi maior que a de recombinação. Assim sendo, esses resultados nos permitem concluir que, nestas condições experimentais, o EAP quando metabolizado, pelas citocromo P-450, exerceu atividade recombinogênica.

Agentes antioxidantes reduzem de forma significativa a genotoxicidade de compostos geradores de radicais livres (Borek, 2005; Halliwell, 200; Marnett, 2000). Geralmente, frutas e verduras são ricas em substâncias antioxidantes. Segundo Edenharter et al., (2003) ratos tratados com frutas e verduras tiveram redução na taxa de micronúcleo induzido por benzo [a] pyrene.

O pequi é altamente rico em substâncias consideradas como antioxidantes (seqüestradores de radicais livres), tais como carotenóides, retinol e vitamina C. Para Stahl e Sies, (1996) os carotenóides são pigmentos importantes, encontrados nas plantas, responsáveis pela coloração de varias frutas. No homem além de ser precursor de vitamina A tem atividade antioxidante. Segundo

Tavan et al. (1997) a vitamina A teve efeito modulador da genotoxicidade do metilazoxmetanol em *Salmonella typhimurium*. Portanto, o pequi apresenta todo o potencial fitoquímico na proteção contra genotoxicidade. Este potencial do pequi foi verificado por Grisolia e Khouri (2004) que não só verificaram a ausência da atividade genotóxica como, também, verificaram o efeito protetor contra a ação clastogênica da bleomicina, que é indutora de radicais livres, em camundongos tratados oralmente com 30 µL de EAP por 10 dias, por meio do teste do micronúcleo.

A provável explicação da evidente genotoxicidade, observada nos tratamentos com o EAP, vem da concentração do extrato utilizada no presente experimento. Nos experimentos, envolvendo a avaliação da genotoxicidade, são utilizadas doses maiores capazes de serem suportadas pelos organismos testes. No presente estudo foram utilizadas doses, possivelmente, altas (1, 5 e 10% do extrato puro). Esta justificativa vem do fato de que na obtenção do extrato puro, é extraída toda água, por meio do rotavapor, concentrando, ainda mais, os constituintes fitoquímicos do fruto. Contudo, estas doses não comprometeram o desenvolvimento da mosca tendo em vista que, na avaliação da citotoxicidade, foram verificadas eclosões, pós-metamorfose, em quase 100% das larvas tratadas. Portanto, nas condições do extrato testado, neste experimento, possivelmente o processo de concentração tenha contribuído para aumentar as concentrações de carotenóides, vitamina A e vitamina C, e estas altas concentrações podem, em vez de seqüestrar, gerarem radicais livres, exercendo efeitos genotóxicos, isto é, ocorreu efeito pro-oxidante.

Para Young e Lowe (2001) o efeito pró-oxidante dos β-carotenos foi verificado no teste cometa quando empregado em altas doses. Em doses maiores que 4 nM começa a ocorrer perda do efeito protetor, e em altíssimas doses (10nM), o β-caroteno causa danos ao DNA. A concentração de β-caroteno também afeta as propriedades das membranas, quando maior a concentração de β-caroteno mais permeável ficam as membranas.

Em vários experimentos, tais como SMART e teste cometa, a vitamina A (retinol) mostrou ser genotóxica quando em altas doses. No teste SMART em uma concentração de 96 nM e no cometa foi genotóxico na concentração de 7 nM (Klamt et al., 2003). O ácido ascórbico, apesar de ser antimutagênico e

anticarcinogênico, também demonstrou efeito genotóxico em altas doses em diferentes sistemas testes (Tripathy et al., 1990).

É possível, também, que o efeito genotóxico do EAP mostrado no presente trabalho não tenha sido encontrado no teste do micronúcleo, devido às diferenças dos testes SMART e micronúcleos. Uma vez que o SMART é capaz de detectar mutação de ponto, deleção e recombinações gênicas (Graf et al., 1984), o teste do micronúcleo detecta somente efeitos clastogênicos e aneugênicos (Von Ledebur e Schmid, 1973; Yamamoto e Kikushi, 1980).

Uma outra hipótese que pode explicar a possível genotoxicidade do EAP é presença de outro componente com atividade genotóxica, uma vez que o EAP é uma mistura complexa. Como exemplo disso temos os alcalóides, encontrados no pequi, que segundo Fu et al (2002), podem ter ação genotóxica e tumorigênica principalmente pela formação de aductos de DNA.

Na associação do EAP com DXR, verificou-se uma potencialização do efeito genotóxico desse quimioterápico tanto no cruzamento ST quanto no HB. No cruzamento ST observou-se que não houve aumento estatisticamente significativo de manchas mutantes simples pequena, isso pode ser devido à ação mutagênica do composto ocorrendo nos estágios iniciais de desenvolvimento embrionário prevalecendo manchas grande, como descreve Graf et al., (1986).

Nos indivíduos tratados com EAP a 10% associado com DXR do cruzamento ST não houve aumento estatisticamente significativo no número de manchas mutantes. É possível que na maior concentração testada da associação de EAP com DXR tenha tido efeito citotóxico, matando células afetadas.

Concluímos que, provavelmente, a ação genotóxica do EAP seja devido a componentes, ou associação de alguns, que são capazes de ativar promutágenos em mutágenos, ou ainda, ser genotóxico direto em *Drosophila melanogaster* e, também, devido à alta sensibilidade e eficiência do SMART em detectar mutações pontuais, deleção e recombinações gênicas.

Diante da importância deste fruto para culinária e de sua ampla distribuição nas regiões de cerrado brasileiro, é importante que se façam novos estudos, em outros organismos teste, para se obter uma melhor avaliação da genotoxicidade do EAP.

Finalmente concluímos que nas condições experimentais deste estudo, o EAP exerce efeito genotóxico em *Drosophila melanogaster* e esse efeito é, ainda, potencializado quando metabolizado pelas citocromo P-450. Concluímos também que o EAP não apresenta efeito modulador da atividade genotóxica da DXR em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

5. Referências Bibliográficas

ABRAHAM, S.K. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. **Mutagenesis**. v. 9, p. 383-386, 1994.

ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A. Piqui e buriti: importância alimentar para população dos cerrados. **Planaltina: EBRAPA-CPAC**. 38 p. 1994.

AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.17, p. 385-396, 2004.

BOREK, C. Antioxidants and the prevention of hormonally regulated cancer. **JMHG**. v.2, p. 346-352, 2005.

EDENHARDER, R.; KRIEG, H.; KÖTTGEN, V.; PLATT, K.L. Inhibition of clastogenicity of benzo [α] pyrene and of its trans-7,8-dihydrodiol in mice in vivo by fruits, vegetables, and flavonoids. **Mutat. Res**. v. 537. p. 169-181, 2003.

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. **Mutat. Res**. v. 244, p. 201-208, 1990.

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. **Mutat. Res.**, v. 334 p. 247-258, 1995.

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutat. Res.**, v. 203 p. 297-308, 1988.

FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F.E. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. **Mutat. Res.**, v. 216, p. 179-87, 1989.

FU, P.P.; XIA, Q.; LIN, G.; CHOU, M.W. Genotoxicity pyrrolizidine alkaloids – mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity. **Int. J. Mol. Sci.** v. 3, p. 948-964, 2002.

GRAF, U.; FREI, H.; KÄGI, A.; KATZ, A.J.; WÜRGLER, F.E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutat. Res.**, v. 222, p. 359-373, 1989

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mutagen.**, v. 6, p. 153-188, 1984.

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E. The somatic white-ivory eye spot test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mol. Mutagen.** v. 27, p. 219-226, 1996.

GUZMÁN-RINCÓN, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic and recombination test as a biomonitor. In BUTTERWORTH, F.M.; CORKUN, L.D.; GUZMÁN-RINCÓN, J. (eds) **Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change**. Plenum Press, New York, NY, pp169-181, 1995.

HALLWELL, B. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker. **Free Radical Biology & Medicine.** v.32, p. 968-974, 2002

HARDMAN, J.G.; LIMBRID, L.E.; GILMAN, A.G. **The pharmacological basis of therapeutics**. 10. edição. McGraw Hill, 2002.

KLAMT, F.; DAL-PIZZOL, F.; ROEHRS, R.; OLIVEIRA, R.B.; DALMOLIN, R.; HENRIQUES, J.A.P.; ANDRADES, H.H.R.; RAMOS, A.L.L.P.; SAFFI, J.; MOREIRA, J.C.F. Genotoxicity, recombinogenicity and cellular preneoplastic transformation induced by vitamin A supplementation. **Mutat. Res.** v. 539, p. 117-125, 2003

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, p. 429-438, 2002.

MARNETT, L. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**. v.21, p. 361-370. 2000.

MARQUES, M.C.S.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; GAVILANES, M.L.; SOUZA, J.A.; PEREIRA, N.E.; NEGRÃO, I.O. Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. **Ciênc. Agrotec.** Edição Especial, p. 1410-1419, 2002.

PAOLINI, M.; ABDEL-RAHMAN, S.Z.; SAPONE, A.; PEDULLI, G.F.; PEROCCO, P.; CANTELLI-FORTI, G.; LEGATOR, M.S. β -Carotene: a cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen? **Mutat. Res.** v.543, p. 195-200, 2003.

ROCHA, A.B.; LOPES, R.M.; SCHWARSTMANN. Natural products in anticancer therapy. **Curr Opin Pharmacol.** v. 1, p. 364-369, 2001.

ROMERO-JIMÉNEZ, M.; CAMPOS-SANCHEZ, J.; ANALLA, M.; MUNOZ-SERRANO, A.; ALONSO-MORAGA, A. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. **Mutat Res.** v. 585, p. 147-155, 2005.

SPANÓ, M.A.; FREI, H.; WÜRGLER, F.E.; GRAF, U. Recombinagenic activity of four compounds in the Standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. **Mutagenesis**. v.16, p. 385-394, 2001.

STAHL, W.; SIES, H. Perspectives in biochemistry and biophysics. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 336, p. 1-9, 1996.

SUN, M.; SAKAKIBARA, H.; ASHIDA, H.; DANNO, G.; KANAZAWA, K. Cytochrome P4501A1-Inhibitory action of antimutagenic anthraquinones in medicinal plants and the structure –activity relationship. **Biosci. Biotechnol. Biochem**. v.64, p. 1373-1378, 2000.

TAVAN, E.; MAZIERE, S.; NARBONNE, J.F.; CASSAND, P. Effects of vitamins A and E on methylloxymethanol-induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* strain TA 100. **Mutat. Res**. v.377. 231-237, 1997.

TRIPATHY, N.K.; WÜRGLER, F.E.; FREI, H. Genetic toxicity of six carcinogens and six non-carcinogens in *Drosophila* wing spot tes. **Mutat. Res**. v. 242, p. 169-180. 1990.

VERSCHAEVE, L.; KESTENS, V.; TAYLOR, J.L.S.; ELGORASHI, E.E.; MAES, A.; VAN PUYVELDE, L.; DE KIMPE, N.; VAN STADEN, J. Investigation of antimutagenic effects of selected South African medicinal plant extracts. **Toxicology in Vitro**. v. 18, p. 29-35, 2004.

VOGEL, E.W.; GRAF, U.; FREI, H.; NIVARD, M.M.J. The results of assay in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. In MCGREGOR DB, RICE JM, VENITT S (eds) The use of Short and Medium-term Test for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carciogenic Hazard Evaluation. **IARC Scientific Publications** n° 146. IARC, Lyon, p. 427-470, 1999.

VON LEDEBUR, M.; SCHMID, W. The micronucleus test; Methodological Aspects. **Mutat. Res.** v. 19, 109-117, 1973.

YAMAMOTO, K.I.; KIKUSHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. **Mutat. Res.** v. 71, 127-131, 1980.

YOUNG, A.J.; LOWER, G.M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v.385, p. 20-27, 2001.