



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**EFEITOS MODULADORES DA *Annona muricata* E DA *Tabebuia impetiginosa*
SOBRE A GENOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS
SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

Aluna: Neila Coelho de Sousa

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

**UBERLÂNDIA – MG
2008**



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**EFEITOS MODULADORES DA *Annona muricata* E DA *Tabebuia impetiginosa*
SOBRE A GENOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS
SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*
*melanogaster***

Aluna: Neila Coelho de Sousa

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Genética).

**UBERLÂNDIA – MG
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S725e	<p>Sousa, Neila Coelho de, 1966- Efeitos moduladores da <i>Annona muricata</i> e da <i>Tabebuia impetiginosa</i> sobre a genotoxicidade da doxorubicina em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i> / Neila Coelho de Sousa. - 2008.</p> <p>111 f. : il.</p> <p>Orientador: Mário Antônio Spanó.</p> <p>Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Mutagênese - Teses. 2. Plantas medicinais - Teses. I.Spanó, Mário Antônio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 575.224.4</p>
-------	---

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

Palavras-chave: *Annona muricata*, *Tabebuia impetiginosa*, acetogeninas, lapachol, β -lapachona, antígenotoxicidade, Somatic Mutation And Recombination Test – SMART, *Drosophila melanogaster*.



**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica**

**EFEITOS MODULADORES DA *Annona muricata* E DA *Tabebuia impetiginosa*
SOBRE A GENOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS
SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

Aluno: Neila Coelho de Sousa

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^ª Dr^ª Sandra Morelli – UFU

Examinadores: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola – UFU

Prof. Dr. Édson José Fragiorge – EAFU

Prof^ª Dr^ª Ilce Mara de Syllos Cólus – UEL

Prf^ª Dr^ª Lusânia Maria Greggi Antunes - USP

Data da defesa: 30 de abril de 2008.

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

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Uberlândia – MG

2008

Dedicatória Póstuma

Dedico, especialmente, esta tese ao meu pai, José Coelho de Carvalho, que imediatamente após sua partida, lá de cima, enviou-me uma força inexplicável e suficiente para suportar sua ausência de corpo, fornecendo-me um grande “empurrão” para o ingresso no programa de Pós-Graduação.

- Pai, este é o resultado. E é como o senhor dizia: “Fiz o que pude.”. Sua bênção e obrigada.

Quero também lembrar o meu irmão, Jales, tendo a certeza que, mesmo lá de cima, está me acompanhando nesta conquista.

Dedicatória

Dedico esta tese às três pessoas mais importantes da minha vida e que mais sofreram e me apoiaram durante esses anos para a realização desta. À minha mãe, Neusa, pelas orações despendidas durante as minhas indas e vindas nas estradas e pela educação e dedicação para com a minha filha, atuando como avó e mãe, melhor que eu; ao meu marido, Gerzon, que suportou pacientemente a minha ausência e não mediu esforços para apoiar-me em todas as dificuldades; e à grandiosidade da minha filha, Gabriela, que aos cinco anos abdicou da minha presença sem queixas e, ainda, forneceu-me incentivo, à sua maneira.

AGRADECIMENTOS

Para mim, uma das partes mais difíceis na elaboração de uma tese (mas a melhor) é a apresentação dos agradecimentos. Isso, não é por ser difícil agradecer, mas pela dificuldade de expressar ou “medir” a dimensão do auxílio/apoio, onde, muitas vezes, uma palavra é o suficiente para uma grande contribuição. A dificuldade está em pensar que eu possa ter sido injusta, menosprezando ou maximizando alguma pessoa, ou ainda pior, esquecer de alguém, o que é imperdoável. Por isso, primeiro agradeço a Deus pela elaboração desta Tese e já peço perdão a Ele e às pessoas que, porventura, eu possa ter causado injustiças durante esses quatro anos.

Assim, listo os seguintes agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Mário Antônio Spanó, que não recusou meu aceite, mesmo estando com um número elevado de orientandos, e proporcionou-me crescimento intelectual e abertura para pesquisa; além disso, o convívio familiar e ambiente alto astral que é estabelecido em seu laboratório, foi fator crucial para que pudesse suportar a ausência dos meus familiares e permanência no curso.

Aos Coordenadores da Pós-Graduação Prof. Dr. Milton Vieira Coelho e Prof^a Dr^a. Sandra Morelli (vigente), bem como o Secretário Gerson Fraissat e Maria Marlene Macedo, pelo ótimo desempenho do trabalho já realizado e, tenho certeza, que continuarão realizando.

Ao Departamento de Pedagogia do Campus Catalão/UFG e ao Prof. Dr. José Vieira Neto (na qualidade de Diretor do Campus Catalão), pelo apoio e empenho na liberação de três anos de licença para estudos, para que eu pudesse realizar os experimentos nas dependências da UFU.

Ao Dr. Ulrich Graf (Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Sciences, ETH Zürich, CH-8603 Schwerzenbach, Switzerland), pela importância das linhagens que foram desenvolvidas e gentilmente doadas, bem como pelo suporte intelectual e visitas oferecidas ao Laboratório.

Ao Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno, pelo fornecimento dos programas de computação (SMART) e auxílio nos protocolos estatísticos.

Aos professores do programa: Prof^a Dr^a Ana Maria Bonetti, Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola e Prof. Dr. Malcon A. M. Brandeburgo pela competência, dedicação e alegre convivência durante a realização de suas disciplinas.

Aos meus irmãos de laboratório, Silmara de Moraes Pantaleão, Zaira da Rosa Guterres, Bruno L. B. Valadares, Alexandre A. A. de Resende e Edson José Fragiorge, e aos meus amigos Wender F. Costa e Vânia Maria S. Pimenta, pelo convívio excepcional no ambiente de trabalho, pelos inesquecíveis congressos, pela cumplicidade e apoio intelectual.

Ao Sr. Paulo Roberto Moderno, técnico de laboratório, pelo auxílio e prontidão nos experimentos e, principalmente, pela dedicação e convivência alegre.

Ao Prof. Dr. Idelvone Mendes Ferreira, pela gentileza na disponibilização de seu laboratório para montagem de parte dos experimentos no Campus Catalão/UFG.

À minha família, mãe, marido, filha, irmãos (Neide, Ney, Maria Amélia e Alvinho) com os respectivos cônjuges e filhos, que sempre me incentivaram e socorreram nas horas críticas para que eu pudesse levar adiante esse trabalho.

À Irmã Nancy Maria (Tia Duzinha), pela ajuda espiritual oferecida em missas no Convento Mãe Admirável – Anápolis-GO, pelo bom êxito dos trabalhos.

À Prof^a Dr^a e amiga Tânia Maia Barcelos que, por trás dos bastidores, me forneceu doses cavalares de incentivo e apoio.

Obrigada, de coração, a todas essas pessoas.

Simplicidade

Cada semana, uma novidade. A última, foi que pizza previne câncer do esôfago. Acho a maior graça.

Tomate previne isso, cebola previne aquilo, chocolate faz bem, chocolate faz mal, um cálice diário de vinho não tem problema, qualquer gole de álcool é nocivo, tome água em abundância, mas, perai, não exagere...

Diante desta profusão de descobertas, acho mais seguro não mudar de hábitos. Sei direitinho o que faz bem e o que faz mal pra minha saúde.

Prazer faz muito bem.

Dormir me deixa 0 km.

Ler um bom livro, faz-me sentir novo em folha.

Viajar me deixa tenso antes de embarcar, mas, depois, rejuvenesço uns cinco anos!

Viagens aéreas não me incham as pernas; incham-me o cérebro, volto cheio de idéias!

Brigar, me provoca arritmia cardíaca.

Ver pessoas tendo acessos de estupidez, me embrulha o estômago!

Testemunhar gente jogando lata de cerveja pela janela do carro, me faz perder toda a fé no ser humano...

E telejornais... Os médicos deveriam proibir... como doem!

Caminhar faz bem, namorar faz bem, dançar faz bem, ficar em silêncio quando uma discussão está pegando fogo faz muito bem: você exercita o autocontrole e ainda acorda no outro dia sem se sentir arrependido de nada.

Acordar de manhã, arrependido do que disse ou do que fez ontem à noite, isso sim, é prejudicial à saúde.

E passar o resto do dia sem coragem para pedir desculpas, pior ainda.

Não pedir perdão pelas nossas mancadas, dá câncer, guardar mágoas, ser pessimista, preconceituoso ou falso moralista, não há tomate ou muzzarella que previna!

Ir ao cinema, conseguir um lugar central nas fileiras do fundo, não ter ninguém atrapalhando sua visão, nenhum celular tocando e o filme ser espetacular, **uau!**

Cinema é melhor pra saúde do que pipoca.

Conversa é melhor do que piada.

Exercício é melhor do que cirurgia.

Humor é melhor do que rancor.

Amigos são melhores do que gente influente.

Economia é melhor do que dívida.

Pergunta é melhor do que dúvida.

Sonhar é o melhor de tudo e muito melhor do que nada !

Luís Fernando Veríssimo

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia-MG) com apoio financeiro das seguintes Agências de Fomento e Instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos (CECHINEL FILHO e YUNES, 2001).....15
- Figura 2.** Triângulo dourado de Mashelkar*. Representa a relação entre medicina moderna, conhecimento tradicional e o forte uso da ciência e tecnologia no contexto da Biologia de Sistemas (PATWARDHAN e GAUTAM, 2005; LIU e WANG, 2008).....16
- Figura 3.** Fruto e folhas de *Annona muricata* <http://www.nybg.org/bsci/belize/Annona_muricata.jpg> Acesso em 09 de abril de 2008).....18
- Figura 4:** Esqueleto de acetogenina Mono-THF α , α' -diidroxilada, presente em folhas de *A. muricata* (ZAFRA-POLO *et al.*, 1998).....18
- Figura 5.** *Tabebuia impetiginosa*.....24
- Figura 6:** Fórmula estrutural do Lapachol (A) e β -lapachona (B).....26
- Figura 7.** Alterações nas ações das topoisomerases (SILVA *et al.*, 2003).....28
- Figura 8.** Fotomicrografia mostrando pêlos mutantes do tipo flare (seta A) e pêlos normais (seta B) observados em microscópio óptico de luz (aumento de 400x).....35
- Figura 9.** Fotomicrografia mostrando pêlos múltiplos (seta) observados em microscópio óptico de luz (aumento de 1000x).35

Figura 10. Fotomicrografia mostrando mancha gêmea (contendo pêlos múltiplos (**seta A**) e pêlos flare (**seta B**) adjacentes) observada em microscópio óptico de luz (aumento de 1000x).....36

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Comparação geral entre medicina moderna e produtos de plantas (remédios tradicionais) (Liu e Wang, 2008).....7

CAPÍTULO II

Table 1. Summary of Results Obtained with the Drosophila Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny of the Standard (ST) Cross after Chronic Treatment of Larvae with *Annona muricata* (*Am*) and Doxorubicin (DXR).....73

Table 2. Summary of Results Obtained with the Drosophila Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny of the High Bioactivation (HB) Cross after Chronic Treatment of Larvae with *Annona muricata* (*Am*) and Doxorubicin (DXR).....74

Table 3. Summary of Results Obtained with the Drosophila Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny in Pretreatment of Larvae with *Annona muricata* (*Am*) and Treatment Chronic with Doxorubicin (DXR).....75

Table 4. Summary of Results Obtained with the Drosophila Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny in Acute Treatment (5-hr) with Doxorubicin (DXR) and Chronic Posttreatment of Larvae with *Annona muricata* (*Am*)76

CAPÍTULO III

Table 1. Summary of results obtained with the *Drosophila* Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) progeny of the Standard (ST) cross after chronic treatment of larvae with *Tabebuia impetiginosa* (*Ti*) and Doxorubicin (DXR).....100

Table 2. Summary of results obtained with the *Drosophila* Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) progeny of the High Bioactivation (HB) cross after chronic treatment of larvae with *Tabebuia impetiginosa* (*Ti*) and Doxorubicin (DXR).....101

LISTA DE GRÁFICOS

APÊNDICES

APÊNDICE A

Gráfico 1 – Frequência total de manchas do tratamento crônico com *Am* nos cruzamentos ST e HB.....102

APÊNDICE B

Gráfico 2 – Contribuição de mutação e recombinação (em porcentagem) em relação à frequência total de manchas em indivíduos MH do cruzamento ST (co-tratamento).....103

Gráfico 3 – Porcentagem de inibição de *Am* em indivíduos MH do cruzamento ST tratados com DXR (co-tratamento).....103

APÊNDICE C

Gráfico 4 - Contribuição de mutação e recombinação (em porcentagem) em relação à frequência total de manchas em indivíduos MH do cruzamento HB (co-tratamento).....104

Gráfico 5 - Porcentagem de inibição de *Am* em indivíduos MH do cruzamento HB tratados com DXR (co-tratamento).....104

APÊNDICE D

Gráfico 6 - Contribuição de mutação e recombinação (em porcentagem) em relação à frequência total de manchas em indivíduos MH do cruzamento ST (pré-tratamento).....105

Gráfico 7 - Porcentagem de inibição de *Am* em indivíduos MH do cruzamento ST tratados com DXR (pré-tratamento).....105

APÊNDICE E

Gráfico 8 - Contribuição de mutação e recombinação (em porcentagem) em relação à frequência total de manchas em indivíduos MH do cruzamento HB (pré-tratamento).....106

Gráfico 9 - Porcentagem de inibição de *Am* em indivíduos MH do cruzamento HB tratados com DXR (pré-tratamento).....106

APÊNDICE F

Gráfico 10 - Contribuição de mutação e recombinação (em porcentagem) em relação à frequência total de manchas em indivíduos MH do cruzamento ST (pós-tratamento).....107

Gráfico 11 - Porcentagem de inibição de *Am* em indivíduos MH do cruzamento ST tratados com DXR (pós-tratamento).....107

APÊNDICE G

Gráfico 12 - Contribuição de mutação e recombinação (em porcentagem) em relação à frequência total de manchas em indivíduos MH do cruzamento HB (pós-tratamento).....108

Gráfico 13 - Porcentagem de inibição de *Am* em indivíduos MH do cruzamento HB tratados com DXR (pós-tratamento).....108

APÊNDICE H

Gráfico 14 – Frequência total de manchas do tratamento crônico com *Ti* nos cruzamentos ST e HB.....109

APÊNDICE I

Gráfico 15 - Contribuição de mutação e recombinação (em porcentagem) em relação à frequência total de manchas em indivíduos MH do cruzamento ST (co-tratamento).....110

Gráfico 16 - Porcentagem de inibição de *Ti* em indivíduos MH do cruzamento ST tratados com DXR (co-tratamento).....110

APÊNDICE J

Gráfico 17 - Contribuição de mutação e recombinação (em porcentagem) em relação à frequência total de manchas em indivíduos MH do cruzamento HB (co-tratamento).....111

Gráfico 18 - Porcentagem de inibição de *Ti* em indivíduos MH do cruzamento HB tratados com DXR (co-tratamento).....111

LISTA DE ABREVIATURAS

Am – *Annona muricata*

ATP – Adenosine triphosphate

BH – balancer-heterozygous

CYP – citocromo P-450

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DXR – Cloridrato de doxorubicina

FDA – Food and drug administration

flr – flare (pêlo mutante em forma de chama)

GST – Glutathione S-Transferase

HB – High bioactivation

HEP G2 - human hepatocellular carcinoma

MH – Marker-heterozygous

MMC – Mytomicin C

MMP – metilfenilpiridínio (methylphenylpyridinium)

mwh – multiple wing hair (pêlo mutante múltiplo)

MV – Vitamins and minerals

NAD⁺ –Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADH - β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide, Reduced Form Solution

NADP – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NSCLC – Câncer de pulmão de células-não-pequenas

NQO1 – NAD(P)H: quinona oxidoreductase-1

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORR;flr – Linhagem flare oregon resistente

PARP-1 – Poli(ADP-ribose)polymerase-1

SMART – Somatic Mutation and Recombination Test

ST – Standard

TA – Tanic acid

THF – Tetraidrofurano

THP – Tetraidropirano

Ti – *Tabebuia impetiginosa*

Topo – Topoisomerase

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	1
-------------------	---

CAPÍTULO 1

1. Fundamentação teórica.....	5
1.1. As plantas medicinais: história de utilização e importância.....	5
2. <i>Annona muricata</i> (Graviola).....	17
3. <i>Tabebuia impetiginosa</i> (Ipê-roxo ou róseo).....	23
4. A Toxocologia Genética e o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART).....	31
5. Referências bibliográficas.....	39

CAPÍTULO 2

Antigenotoxic activity promoted by <i>Annona muricata</i> L. (Annonaceae) in <i>Drosophila</i> wing spot test	54
Abstract	56
Introduction.....	57
Material and Methods.....	60
Chemical compounds and media.....	60
Strains and crosses.....	60
Larval feeding and experimental schedules.....	61
Genotoxicity evaluation and cotreatment	61
Pretreatment.....	61
Posttreatment.....	61
Analysis of adult flies.....	62
Data evaluation and statistical analysis.....	62
Results and Discussion.....	63
Genotoxicity evaluation and cotreatment.....	63

Pretreatment.....	65
Posttreatment.....	66
Conclusions	67
Acknowledgments	68
References	69

Table 1 – Summary of results obtained with the <i>Drosophila</i> Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) progeny of the standard (ST) cross after chronic treatment of larvae with <i>Annona muricata</i> (<i>Am</i>) and Doxorubicin (DXR).....	73
---	-----------

Table 2 – Summary of results obtained with the <i>Drosophila</i> Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) progeny of the high bioactivation (HB) cross after chronic treatment of larvae with <i>Annona muricata</i> (<i>Am</i>) and Doxorubicin (DXR).....	74
---	-----------

Table 3 – Summary of results obtained with the <i>Drosophila</i> Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) progeny in pretreatment of larvae with <i>Annona muricata</i> (<i>Am</i>) and treatment chronic with Doxorubicin (DXR).....	75
---	-----------

Table 4 – Summary of results obtained with the <i>Drosophila</i> Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) progeny in acute treatment (5-hr) with Doxorubicin (DXR) and chronic post-treatment of larvae with <i>Annona muricata</i> (<i>Am</i>).....	76
--	-----------

CAPÍTULO 3

Modulatory effects of the <i>Tabebuia impetiginosa</i> (Martius ex DC) Standley on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in <i>Drosophila melanogaster</i>	77
Abstract	79
Introduction	80

Material and Methods	83
Chemical compounds and media.....	83
<i>Drosophila</i> strains.....	83
Crossbreedings for the SMART assay.....	83
Experimental procedure.....	83
Evaluation of the data and statistical analysis.....	84
Results	86
Discussion	88
Acknowledgments	92
References	93

Table 1 – Summary of results obtained with the *Drosophila* Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) progeny of the High Bioactivation (ST) cross after chronic treatment of larvae with *Tabebuia impetiginosa* (*Ti*) and Doxorubicin (DXR).....**100**

Table 2 – Summary of results obtained with the *Drosophila* Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) progeny of the High Bioactivation (HB) cross after chronic treatment of larvae with *Tabebuia impetiginosa* (*Ti*) and Doxorubicin (DXR).....**101**

APÊNDICES

Apêndice A – Gráfico 1.....	102
Apêndice B – Gráficos 2 e 3.....	103
Apêndice C – Gráficos 4 e 5.....	104
Apêndice D – Gráficos 6 e 7.....	105
Apêndice E – Gráficos 8 e 9.....	106
Apêndice F – Gráficos 10 e 11.....	107
Apêndice G – Gráficos 12 e 13.....	108
Apêndice H – Gráfico 14.....	109
Apêndice I – Gráficos 15 e 16.....	110
Apêndice J – Gráficos 17 e 18.....	111

RESUMO

Plantas são a base de vários sistemas de medicina tradicional em todo o mundo por milhares de anos e continuam a prover o gênero humano com novos remédios. *Annona muricata* (*Am*) e *Tabebuia impetiginosa* (*Ti*) são espécies que são amplamente usadas na medicina popular brasileira para o tratamento de várias doenças. Estudos prévios com *Am* sugeriram que acetogeninas, identificadas em extratos das folhas, e *Ti* com os constituintes químicos lapachol e β -lapachona, identificados na casca e caule, possuem propriedades biologicamente ativas contra várias linhagens celulares de câncer. O presente estudo avaliou as propriedades genotóxicas e antígenotóxicas do pó de folhas secas de *Am*, comercialmente disponível como um suplemento de planta, e do pó da casca e caule de *Ti*, comercialmente disponível como um produto natural. Para os experimentos, foram utilizados o cruzamento padrão (ST) e o cruzamento de alta bioativação (HB) no Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) de asa em *Drosophila melanogaster*. Três diferentes concentrações (10.0, 20.0 e 40.0%) de *Am* e *Ti* foram usadas. Os testes de antígenotoxicidade envolveram o uso do cloridrato de doxorubicina (DXR) como um indutor de eventos genotóxicos. Foi observado que *Am* e *Ti* puros não modificaram as frequências espontâneas de manchas mutantes em ambos os cruzamentos. Os efeitos protetores contra a genotoxicidade induzida pela DXR foram observados em *Am* (co-tratamento e pré-tratamento), sugerindo que esta planta revela efeitos desmutagênicos, mas experimentos adicionais são requeridos sobre dose-resposta e combinações apropriadas com drogas quimioterapêuticas para um melhor entendimento de seus mecanismos de ação e quimioprevenção. *Ti*, em associação com DXR, foi tóxica em ambos os cruzamentos na concentração mais alta, e no cruzamento HB induziu um considerável efeito potencializador (de ~20.0 a 95.0%) sobre a genotoxicidade da DXR, sugerindo um possível potencial anticarcinogênico, mas pesquisas adicionais são necessárias para determinar os possíveis riscos que podem estar associados com a exposição de organismos a esta mistura complexa.

Palavras-chave: *Annona muricata*, *Tabebuia impetiginosa*, acetogeninas, lapachol, β -lapachona, antigenotoxicidade, Somatic Mutation And Recombination Test – SMART, *Drosophila melanogaster*.

ABSTRACT

Plants have been the basis of many traditional medicine systems throughout the world for thousands of years and continue to provide mankind with new remedies. *Annona muricata* (*Am*) and *Tabebuia impetiginosa* (*Ti*) are species that has been widely used in Brazilian folk medicine for treatment of several diseases. Previous studies with *Am* suggested that acetogenins, identified in leaves extracts, and *Ti* with chemical constituents lapachol and β -lapachone, identified in bark and stem, have biologically active properties against several cancer cell lines. The present study evaluated the genotoxicity and antigenotoxicity properties of *Am* dry leaves powder, commercially available as an herbal supplement and of *Ti* dry bark and stem powder, commercially available as a natural product. For work was used the Standard (ST) cross and High Bioactivation (HB) cross of the wing Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. Three different *Am* and *Ti* concentrations (10.0, 20.0 or 40.0%) were used. The antigenotoxicity tests involved the use of doxorubicin hydrochloride (DXR) as an inducer of genotoxic events. It was observed that *Am* and *Ti* alone did not modify the spontaneous frequencies of mutant spots in both crosses. The protective effects against DXR-induced genotoxicity were observed in *Am* (cotreatment and pretreatment) suggesting that it show des-mutagenic effects, but further experiments are required on dose response and appropriate combinations with chemotherapeutic drugs for a better understanding of its mechanisms of action and chemoprevention. *Ti*, in association with DXR, was toxic in both crosses at the higher concentration, and in the HB cross induced a considerable potentiating effect (from ~20.0 to 95.0%) on the genotoxicity of DXR, suggesting a feasible anticarcinogenic potential, but further research are needed to determine the possible risks that could be associated with the exposure of organisms to this complex mixture.

Key words: *Annona muricata*, *Tabebuia impetiginosa*, acetogenins, lapachol, β -lapachone, antigenotoxicity, Somatic Mutation And Recombination Test – SMART, *Drosophila melanogaster*.

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

“A dicotomia entre o conhecimento e a crença é uma das coisas que espanta e fascina quem analisa o comportamento humano”.

(Bernardo Erdtmann, 2003)

No Brasil, há várias décadas, existe a crença popular de que chás, ou remédios de plantas, se não fizerem bem, mal também não fazem. Ou que, remédio de farmácia cura uma doença e desenvolve outra. No entanto, sabe-se que os pesticidas também têm origem vegetal e que as plantas são capazes de produzir diferentes substâncias tóxicas em grandes quantidades, aparentemente para sua defesa contra vírus, bactérias, fungos e animais predadores. Os diferentes metabólitos secundários produzidos são necessários ao desenvolvimento e especificidades das plantas e, assim, elas apresentam substâncias que podem ter efeitos colaterais graves e desencadear determinadas enfermidades.

O elevado índice de casos de câncer e a cura relativamente baixa dessa enfermidade, bem como severos efeitos colaterais produzidos pela quimioterapia e radioterapia, têm levado a população a fazer uso da medicina tradicional (também chamada popular) para a cura de doenças, ou para a sinergia ou diminuição dos efeitos colaterais de tratamentos convencionais. Também, as pesquisas científicas baseadas em plantas com indicação de uso popular, a partir de misturas ou extratos e não somente de substâncias isoladas, têm levado a um grande crescimento e reconhecimento dos produtos naturais de plantas. O que a grande maioria da população não sabe é que produtos naturais de plantas medicinais também possuem efeitos colaterais.

As pesquisas científicas realizadas com plantas utilizadas na medicina tradicional, a partir de misturas, extratos (aquosos ou etanólicos) e com substâncias isoladas, têm obtido informações muito importantes com relação aos

possíveis efeitos colaterais de tais medicamentos naturais, que devem ser levadas em consideração no momento da sua utilização.

Assim, a intenção deste trabalho é obter esclarecimentos sobre o grande potencial das plantas e, para isso, são necessários diversos estudos que sirvam de base para a interdisciplinaridade entre as diversas áreas, para fins de comercialização segura e com produtos eficazes, uma vez que muitos produtos botânicos são comercializados no mundo inteiro sem serem submetidos ao processo de regulamentação, aos quais dados de segurança e eficácia são requeridos. Além disso, outros fatores (como por exemplo a forma de uso, efeitos colaterais, dosagem, interações com drogas e outras substâncias) também devem ser considerados e, por isso, normas de comercialização e uso devem ser estabelecidas.

Plantas introduzidas, como a Graviola - *Annona muricata* (*Am*), e plantas nativas brasileiras, como o Ipê-roxo ou róseo - *Tabebuia impetiginosa* (*Ti*), vêm sendo utilizadas para o tratamento do câncer, além do tratamento de outras doenças. Chás ou pó das folhas da *Am*, bem como, chás ou pó do caule e/ou casca da *Ti*, estão sendo consumidas sem nenhuma orientação da área de saúde. Produtos dessas duas plantas também são encontrados nas redes de informática (internet), sendo oferecidas como produtos naturais ou como suplementos; cápsulas contendo esses produtos são comercializadas por distribuidores nacionais ou internacionais. No entanto, essas plantas, ou seus componentes, vêm sendo pesquisados cientificamente há várias décadas quanto ao seu potencial anticarcinogênico. Grande quantidade de artigos foi publicada referente a esse potencial e grandes avanços foram conseguidos (principalmente na área da biologia molecular e genética) em relação ao processo de atividade ou ação biológica dessas plantas. De acordo com as pesquisas realizadas, principalmente com experimentos *in vitro*, grande sucesso vem sendo obtido em relação à citotoxicidade de células cancerosas de vários tipos de neoplasias. Porém, muitas pesquisas ainda devem ser realizadas uma vez que os mecanismos de ação ainda não foram totalmente elucidados; também, há a verificação da toxicidade dessas plantas (pesquisas *in vivo* na área farmacológica) que podem trazer riscos ao indivíduo.

Diante do exposto, um estudo sobre a toxicidade genética de plantas medicinais é necessário. Sabemos que a correlação entre mutagênese e carcinogênese é alta. Neste trabalho, foram investigadas a genotoxicidade e antigenotoxicidade de dois produtos naturais de diferentes plantas e de diferentes distribuidores, comercializados no Brasil. Cápsulas de um suplemento de plantas, contendo folhas trituradas de Graviola (*Am*) e cápsulas de um produto natural contendo pó da casca e caule de Ipê-roxo (*Ti*) foram investigados empregando o teste SMART de asa, o qual utiliza como organismo experimental a mosca das frutas – *Drosophila melanogaster*. O SMART é um teste rápido, que utiliza três linhagens da mosca (*mwh*, *flr³* e *ORR;flr³*), às quais são analisadas quanto aos pêlos mutantes de suas asas. O teste fornece resultados de eventos mutacionais ocorridos, como mutações gênicas e cromossômicas e recombinações somáticas, quantifica a contribuição da recombinação de compostos em estudo e detecta compostos genotóxicos e antigenotóxicos de ação direta ou indireta, de acordo com o nível basal e alto de enzimas de metabolização do tipo citocromo P450, respectivamente.

A possibilidade de avaliar simultaneamente, em um só bioensaio genético *in vivo*, a ação recombinante e mutagênica de compostos, utilizando um organismo eucarioto com alta similaridade genética e bioquímica como os mamíferos, através do teste rápido SMART de asa, já justifica avaliar o potencial genotóxico e antigenotóxico dos produtos naturais de *Am* e *Ti* em função de seu uso pela população. Então, este trabalho teve os seguintes objetivos com o suplemento de *Am* e com o produto natural de *Ti*:

- caracterizar qualitativamente a genotoxicidade, incluindo mutações pontuais, mutações cromossômicas e/ou recombinação somática;
- avaliar quantitativamente os diferentes tipos de eventos genotóxicos induzidos pela planta através da comparação dos resultados obtidos em dois diferentes genótipos: *trans-heterozigoto* e *heterozigoto*;
- detectar se os compostos (genotoxinas e antigenotoxinas) das plantas possuem ação direta através da análise dos indivíduos provenientes do cruzamento padrão – que utiliza linhagens portadoras de níveis basais de enzimas de metabolização do tipo citocromo P450 – ou indireta, através do

cruzamento aprimorado, que emprega linhagens com alta atividade de metabolização do citocromo P450;

- avaliar a ação antigenotóxica das plantas contra os efeitos induzidos pelo cloridrato de doxorubicina;
- realizar estudos com partes das plantas (misturas ao invés de substâncias isoladas);
- revisar importância das plantas medicinais e seu processo de utilização pelo homem.

Assim, esta Tese é composta de três capítulos:

Capítulo 1 - Fundamentação teórica – Apresenta uma breve revisão de literatura sobre as plantas medicinais utilizadas no presente trabalho e sobre os testes utilizados para a detecção dos efeitos genotóxicos, antigenotóxicos e/ou moduladores.

Capítulo 2 – Manuscrito intitulado “Antigenotoxic activity promoted by *Annona muricata* L. (Annonaceae) in *Drosophila* wing spot test” a ser submetido para publicação na revista científica *Genetics and Molecular Biology*.

Capítulo 3 - Manuscrito intitulado “Modulatory effects of the *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex DC) Standley on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*” a ser submetido para publicação na revista científica *Genetics and Molecular Biology*.

Uma última parte é constituída pelos apêndices, que constam de gráficos relativos aos resultados dos experimentos obtidos e dos dados contidos nas tabelas dos capítulos 2 e 3.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. As plantas medicinais: história de utilização e importância

A utilização das plantas, como fonte de medicamentos para o tratamento das enfermidades que acometem a espécie humana, remonta à idade antiga (CALIXTO, 2001). Se observarmos a história dos tratamentos em saúde, notamos uma relação com a história da medicina. As mudanças aconteceram de acordo com a evolução cultural-científica.

As plantas têm sido a base de muitos sistemas de medicina tradicional em todo o mundo, por milhares de anos, e continua a prover o gênero humano com novos remédios: inicialmente com chás, poções, tinturas e outras formulações e, depois, com base na descoberta de drogas ou fármacos (JACHAK e SAKLANI, 2007). A história dos fármacos a partir de plantas medicinais se deu a partir do surgimento da química no final do século XVII e, como disciplina científica moderna, no início do século XIX. Os Químicos dessa época estudavam as plantas medicinais apenas para isolar e determinar a estrutura de seus compostos ativos, muito bem conhecidas e experimentadas pelo uso popular ao longo do tempo, e eram de fundamental importância na área médica (por ex.: a morfina, isolada em 1803). Desta época, até por volta de 1900, a fitoquímica de plantas medicinais integrada à química medicinal e à medicina, na procura de princípios ativos, usando plantas consagradas pela medicina popular (também conhecida como medicina tradicional) foi prevalente (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001). Também, o conhecimento sobre plantas pelos povos indígenas foi passado de geração a geração, em várias partes do mundo, através de sua história e tem significativamente contribuído para o desenvolvimento de diferentes sistemas tradicionais de medicina (JACHAK e SAKLANI, 2007).

No século XX, e até os dias atuais, dois paradigmas marcaram a história de fármacos e fitoterápicos de plantas medicinais: ocidental e oriental. Por volta do ano de 1901 até as décadas de 1970-1980, houve a descoberta de fármacos de origem sintética, os quais são moléculas puras, cujo modelo foi a aspirina (Ácido acetil salicílico - AAS). Desse modo, as plantas medicinais eram consideradas sem valor científico, sendo objeto de uso por pessoas sem cultura científica. Os

estudos da fitoquímica se orientaram para a determinação de novas estruturas dos metabólicos secundários e suas possíveis funções nas plantas, esclarecendo os mecanismos de biossíntese e desenvolvendo a área de quimiotaxonomia. Esses fatos – síntese de fármacos – caracterizam o paradigma ocidental, onde as sínteses passaram a ser realizadas, na maior parte, ao acaso, procurando-se encontrar alguma atividade por meio do *screening* maciço. Com isso, a maioria das grandes empresas, principalmente nos Estados Unidos da América (EUA), paralizou suas pesquisas com plantas medicinais entre 1965 e 1980 (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001).

O paradigma oriental é caracterizado pela medicina tradicional (fitoterapia) e manifestou-se por volta das décadas de 1970-1980 até o presente, quando a síntese orgânica de novos fármacos ao acaso mostrou problemas, e as chances de encontrar novos fármacos por *screening* ao acaso diminuíram progressivamente e, ainda, o uso de protótipos tornou-se bastante oneroso, aumentando os custos de 10 vezes a cada 20 anos (800 milhões de dólares a cada 10 anos) aproximadamente, sendo estimado que somente 1 em cada 5.000 compostos terá avanço através da triagem clínica e aprovado para uso (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001; JACHAK e SAKLANI, 2007). Um aspecto importante da Tradicional Medicina Chinesa é a preferência pelas combinações (extratos) no lugar de compostos puros. Assim, do ponto de vista farmacológico, a medicina tradicional possui ações múltiplas e moderadas porque consiste de vários grupos de componentes ativos e com vários efeitos farmacológicos (MIYATA, 2007).

Paradigma ocidental (fármaco) e paradigma oriental (fitoterápico) seguem etapas diferentes e opostas em suas obtenções: o oriental inicia pelos ensaios clínicos, que consiste na última etapa do ocidental. Enquanto um fármaco possui um simples e único composto ativo, com efeitos farmacológicos definidos, o fitoterápico contém centenas de compostos, que variam em suas concentrações, e a atividade farmacológica destas misturas, em grande parte, permanece obscura (YUNES e CECHINEL FILHO, 2001). Entretanto, a descoberta de drogas de origem de plantas tem evoluído e inclui vários campos interdisciplinares e vários métodos de análises. Com o desenvolvimento da Biologia Molecular, das Técnicas Genéticas, da Química Combinatória e da Química Computacional, novas mudanças ocorreram nas metodologias para obtenção de novos fármacos

(JACHAK e SAKLANI, 2007). Porém, muitos estudos científicos suportam e confirmam a eficácia e a segurança do uso terapêutico de determinadas plantas medicinais.

Liu e Wang (2008) apresentam as diferenças entre medicina moderna e remédio de plantas (**Tabela 1**).

Tabela 1: Comparação geral entre medicina moderna e produtos de plantas (remédios tradicionais) (LIU e WANG, 2008).

	Medicina moderna	Remédio de plantas
Mecanismo	Alvo molecular específico	Função holística
Objetivo	Tratamento de doenças e/ou sintomas	Restabelecimento da homeostase
Ação	Rápida	Gradual
Indicação	Doenças agudas e crônicas	Doenças crônicas
Paciente	Considerado como um grupo	Terapia individualizada

O desenvolvimento da medicina tradicional (remédios de plantas medicinais), foi influenciado pelas diferentes condições culturais e históricas. Sua base comum é uma aproximação holística à vida, equilíbrio entre mente, corpo e ambiente, e uma ênfase sobre a saúde, antes que sobre a doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a maioria das drogas manufaturadas foi desenvolvida de plantas medicinais. A influência da cultura e a história sobre o uso da medicina de plantas diferem de país para país e de região para região. A OMS não só reconhece, como também estimula o uso de plantas medicinais (considerando os promissores resultados da Tradicional Medicina Chinesa) pela população, especialmente de países pobres, embora recomende cuidados especiais no seu uso através da distribuição de manuais para orientar estudos científicos, que confirmem sua segurança e a eficácia clínica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Há muitos produtos botânicos sob investigação para seu potencial de proteção de saúde e/ou propriedades de inibição de doenças. A maioria dos

produtos botânicos usados atualmente, com objetivos benéficos de saúde, tem uma longa história de uso (BAST *et al.*, 2002). Drogas botânicas, como definidas pelo "Food and Drug Administration (FDA)", contêm ingredientes de plantas verdes ou secas, partes de planta, componentes isolados ou combinados, algas, fungos macroscópicos ou combinações destes, e podem ser usados em cura, mitigação, tratamento e prevenção de doenças em seres humanos (LIU e WANG, 2008). Nos Estados Unidos as preparações à base de plantas são reguladas em nível estadual e federal e classificadas como suplementos nutricionais e, por isso, não são submetidos aos dados de segurança e eficácia ao FDA para a comercialização desses produtos (TUROLLA e NASCIMENTO 2006; LIU e WANG, 2008). Contrariamente, a Alemanha, a França e outros países europeus, estão intensificando esforços para a unificação de uma legislação referente a esses medicamentos (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem o papel de regulamentar todos os medicamentos, incluindo os fitoterápicos, e fiscalizar as indústrias produtoras de medicamentos com o intuito de proteger e promover a saúde da população, controlando a produção, a liberação para consumo (registro), acompanhamento e comercialização dos medicamentos, podendo retirá-los do mercado caso seu consumo apresente risco para a população. De acordo com a legislação em vigor, entende-se como fitoterápico "aquele medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais; é caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3". As regras que padronizam a produção de fitoterápicos estão no regulamento para o registro, publicado no Diário Oficial da União, por meio da Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2004a; b; c).

Segundo Ribeiro *et al.* (2005), se por um lado a legislação reforça o critério de segurança e eficácia dos fitoterápicos registrados no Brasil, ela privilegia a incorporação, no nosso mercado farmacêutico, as plantas consideradas exóticas e não contempla estudos clínicos de plantas da flora brasileira utilizadas na medicina popular, com estudos realizados com população de perfil epidemiológico

diferente da brasileira, necessitando de cautela na transposição desses resultados para a nossa população; além disso, a nossa legislação desvaloriza a nossa medicina popular, uma vez que a maior parte das plantas utilizadas tradicionalmente pela população ainda não foi avaliada do ponto de vista toxicológico e farmacológico, o que tornaria proibitivo o seu registro como fitoterápico.

Porém, o aumento do consumo de produtos botânicos, principalmente drogas vegetais, transformou seu uso em um problema de saúde pública, devido à possibilidade de acesso a produtos sem adequadas condições de uso, e produzidos sem as preocupações com a qualidade, tais como o potencial de contaminação microbiana, por sua origem natural (BRUGNO *et al.*, 2005) e à falta de informações de toxicidade pré-clínica de plantas medicinais (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Nutracêutico é uma palavra híbrida dos termos nutriente e farmacêutico, conhecido mundialmente, e mais utilizado em marketing que pela comunidade científica. Este termo pode ser considerado um alimento funcional que, quando consumido regularmente, exerce um efeito específico em benefício da saúde, além de suas propriedades nutricionais, sendo que esse efeito deve ser cientificamente provado (ESPÍN *et al.*, 2007).

A Nutracêutica é considerada por alguns como uma nova disciplina científica, que estuda os componentes fitoquímicos presentes nos vegetais, para descobrir seus benefícios à saúde e possíveis curas de doenças. Neste sentido, uma simples planta pode ser definida como um alimento, um alimento funcional, um suplemento alimentar ou uma erva medicinal em diferentes países, dependendo das regulamentações aplicadas a alimentos e medicamentos em cada país, o que torna difícil definir o conceito de plantas medicinais para o propósito de regulação nacional da droga e também confundem pacientes e consumidores (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Têm-se assim, a importância de criar uma política nacional sobre medicina tradicional e plantas medicinais, bem como medidas regulatórias e educacionais que garantam a qualidade desses produtos.

Para o posicionamento e requerimento para uso efetivo e seguro de produtos botânicos Bast *et al.* (2002) propuseram algumas definições:

- Alimento - É um produto botânico integrado na dieta. Seu propósito primário é providir substratos para metabolismo anabólico/catabólico e processos fisiológicos, e/ou aumentar o sabor e palatabilidade dos produtos alimentícios.
- Produto botânico de saúde – É um produto botânico que não é consumido primariamente como fonte de substratos para metabolismo, mas que tem propriedades que podem ajudar a manter e/ou promover saúde.
- Remédio / medicamento de ervas (plantas medicinais) - É um produto botânico usado para curar, tratar e/ou prevenir uma doença ou desordens clinicamente definidas.

Os produtos naturais botânicos são usados como matéria-prima para síntese de moléculas complexas, de interesse farmacológico, e principalmente como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos pelas grandes indústrias.

Substâncias ativas, presentes na planta como um todo, ou em parte dela, na forma de extrato total ou processado, é denominado pela OMS como medicamento fitoterápico. Os medicamentos fitoterápicos são preparações padronizadas, contendo partes de uma ou mais plantas, amplamente comercializados em países pobres ou ricos. Eles são usados geralmente de forma preventiva, tendo em vista que não possuem ação terapêutica imediata, e não são recomendados nas emergências médicas, mas são amplamente aceitos pela população de muitos países, especialmente para o tratamento de algumas doenças, tais como a gripe, problemas gastrintestinais, doenças circulatórias, etc. (CALIXTO, 2001).

Nas últimas décadas observou-se um rápido crescimento do mercado internacional de medicamentos fitoterápicos, especialmente nos países industrializados. Segundo Calixto (2000), esse interesse pela população em obter produtos fitoterápicos foi devido:

- a preferência dos consumidores por terapias naturais;

- a preocupação em relação aos efeitos colaterais freqüentemente observados com os medicamentos sintéticos e a crença errônea de que os medicamentos fitoterápicos não possuem efeitos colaterais;
- a tendência da população em acreditar que os fitoterápicos podem ser efetivos nos tratamentos de doenças quando os medicamentos sintéticos têm falhado;
- a tendência para a automedicação e a preferência da população pelos tratamentos preventivos, especialmente com relação às doenças degenerativas comuns nos processos de envelhecimento;
- a existência de estudos científicos para alguns produtos fitoterápicos comprovando sua eficácia clínica, segurança e melhoria do controle de qualidade dos mesmos; e,
- menores custos para o consumidor dos medicamentos fitoterápicos.

Apesar da crescente importância dos medicamentos fitoterápicos, relativamente poucos estudos foram realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança, sendo que muitas plantas ainda são utilizadas somente com base no seu uso popular bem estabelecido (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). De modo geral, a população acredita que os fitoterápicos não possuem efeitos colaterais importantes por serem obtidos de fontes naturais. No entanto, muitas plantas contêm constituintes tóxicos, os quais podem ocasionar vários efeitos colaterais, como os digitálicos e alcalóides pirrozilidínicos, além de várias drogas anticancerígenas de origem vegetal, que são extremamente tóxicas (CHITTURI e FARREL, 2000). Outros efeitos podem ser ocasionados quando os fitoterápicos possuírem agentes mutagênicos que vão alterar a seqüência das bases no DNA, podendo acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias.

Muitas plantas medicinais exercem ações medicinais específicas, sem função nutricional na dieta humana, e podem ser usadas em resposta a problemas específicos de saúde, sobre intervalos de tempo curto ou longo, e esses efeitos benéficos resultam de combinações de produtos secundários presentes na planta, os quais possuem sua função principal na ecofisiologia (BRISKIN, 2000).

Constituintes fitoquímicos são essenciais para a sobrevivência e funcionamento próprio das plantas, os quais provêem proteção contra herbívoros, microorganismos e competidores; regulam o crescimento e controlam a polinização, a fertilização e o ambiente da rizosfera. Neste aspecto, fitoquímicos são “bons”, ao menos com respeito aos produtos de plantas. Porém, suas atividades biológicas inerentes podem ter efeitos adversos sobre outros organismos. A partir desta perspectiva, os resultados podem ser “ruins” ou no mínimo “ofensivos”, visto que tais organismos podem morrer ou serem seriamente prejudicados. Tais efeitos podem ser indicadores essenciais de propriedades desejáveis, tais como potencial terapêutico, especialmente quando mecanismo de bioatividade pode ser delineado (MOLYNEUX *et al.*, 2007).

Em contraste a produtos sintéticos, muitos produtos de plantas exercem efeitos benéficos diretos de ações aditivas ou sinérgicas de vários compostos químicos, agindo em sítios alvo simples ou múltiplo, associados com um processo fisiológico. Porém, como ações benéficas de plantas medicinais podem estar relacionadas a combinações de fitoquímicos, agindo coletivamente ou sinérgicamente, alteração de componentes fitoquímicos simples poderia afetar potencialmente a eficácia de uma planta medicinal (BRISKIN, 2000).

Está bem estabelecido que a formação de metabólitos reativos de drogas está associada com a toxicidade da droga. Também, vários dados sugerem a formação de metabólitos/intermediários reativos de bioativação direta na toxicidade de plantas e carcinogenicidade. Muitos agentes químicos não são reativos por eles próprios e requerem ativação metabólica por uma variedade de enzimas responsáveis pelo metabolismo da droga para exercerem sua genotoxicidade (SRINIVASAN *et al.*, 2008). Enzimas de fase I, predominantemente as do citocromo P450 humano (CYPs), contribuem para o metabolismo de uma variedade de xenobióticos e para a avaliação de procarcinógenos. Assim, constituintes de plantas podem tanto ser metabolizados por CYPs, levando à formação de metabólitos não tóxicos, que são excretados, como podem levar à formação de metabólitos tóxicos. A inibição de CYPs, por constituintes de plantas, podem tanto diminuir a formação de metabólitos tóxicos e inibir a carcinogênese, como também ter um papel importante na ativação de procarcinógenos (ZHOU *et al.*, 2004).

Enzimas de fase II, como a Glutathione S-Transferase (GST) e NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (NQO1), são detoxificantes. As GSTs possuem um papel fisiológico na iniciação de detoxificação de compostos farmacologicamente ativos, gerados intracelularmente ou encontrados na forma de xenobióticos. Extratos ou substâncias puras de vegetais e o vegetal desidratado em pó têm sido relacionados como ativadores de GST (TORRES *et al.*, 2004; PATEL e MARU, 2008). A indução das GSTs, que sofreram bioativações prévias pelas enzimas de fase I do metabolismo de xenobióticos no interior do citocromo P450, tem como conseqüência a diminuição da toxicidade das substâncias mutagênicas. O balanço entre as enzimas CYP e GST pode influenciar substancialmente o risco de câncer (SRINIVASAN *et al.*, 2008).

A maioria das pesquisas científicas relacionadas com o descobrimento de novos fármacos está centrada em compostos que interagem com os diferentes receptores presentes nos sistemas biológicos (CRECZYNSKI-PASA e PEDROSA, 2001).

As investigações na área de princípios ativos naturais (fármacos e fitoterápicos) dependem do alto grau de interação entre áreas afins, especialmente entre a Botânica, a Química, a Bioquímica, a Farmacologia, a Toxicologia e a Biologia Molecular, e do uso de metodologias adequadas aos objetivos propostos. A validação de plantas medicinais consagradas pela medicina popular na procura de novos fitoterápicos é de grande contribuição nessa busca. Devido às grandes e inúmeras pesquisas voltadas para a área de tratamento do câncer, acrescentaria a essas áreas a Genética Toxicológica, que trata do estudo de substâncias tóxicas ao DNA que levam ao processo de mutagênese, carcinogênese e teratogênese (CECHINEL FILHO e YUNES, 2001).

A **Figura 1** apresenta alguns procedimentos gerais da química medicinal moderna para a obtenção de compostos biologicamente ativos, e se baseiam no fato de que toda substância, independentemente de sua proporção na planta e de ser conhecida ou não, pode ser um princípio ativo.

Um novo campo científico - a Biologia de Sistemas - também conhecida como Genômica Funcional, estuda as interações de diferentes componentes (por ex.: meios moleculares e cadeias regulatórias) dentro de um organismo para elucidar funções fisiológicas relevantes e comportamento; ela tem como objetivo a

integração das informações obtidas pelas plataformas tecnológicas: genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica (ROCHA *et al.*, 2006; LIU e WANG, 2008). A metabolômica é uma nova e rápida tecnologia de desenvolvimento que detecta, quantifica e cataloga o tempo relacionado de processo metabólico de um sistema biológico integrado sob condições ambientais específicas; é uma medida quantitativa de resposta metabólica multiparamétrica (ROBERTSON, 2005; ZHOU *et al.*, 2006). A caracterização dos moldes metabólicos de plantas constitui outro parâmetro que servirá na identificação de constituintes bioativos e para aumentar os conhecimentos de segurança, eficácia e complexidade de uma dada combinação terapêutica (LIU e WANG, 2008).

A **Figura 2**, que mostra o triângulo dourado de Mashelkar, representa uma plataforma de farmacologia reversa para a descoberta de drogas, através da integração efetiva da cultura tradicional, base da evidência da medicina moderna e o poder da ciência e tecnologia contemporânea, onde estratégias holísticas são refletidas de princípios da Biologia de Sistemas (PATWARDHAN e GAUTAM, 2005; LIU e WANG, 2008). Todavia, fontes variáveis de biomassa, ingredientes ativos desconhecidos, dificuldades na qualidade de controle, falta de avaliação de segurança, mecanismos de ação obscuros, etc., constituem desafios em termos de padronização para aderir às normas industriais (LIU e WANG, 2008).

A aplicação da Biologia de Sistemas a problemas particulares em plantas necessitará refinamento de tecnologias básicas pós-genômicas. Plantas são formas especiais de todos os sistemas vivos, os quais nos capacitam a estudar desde o fluxo de células vivas individuais, até aos mais especializados tecidos/órgãos (ROBINS e BOLWELL, 2007).

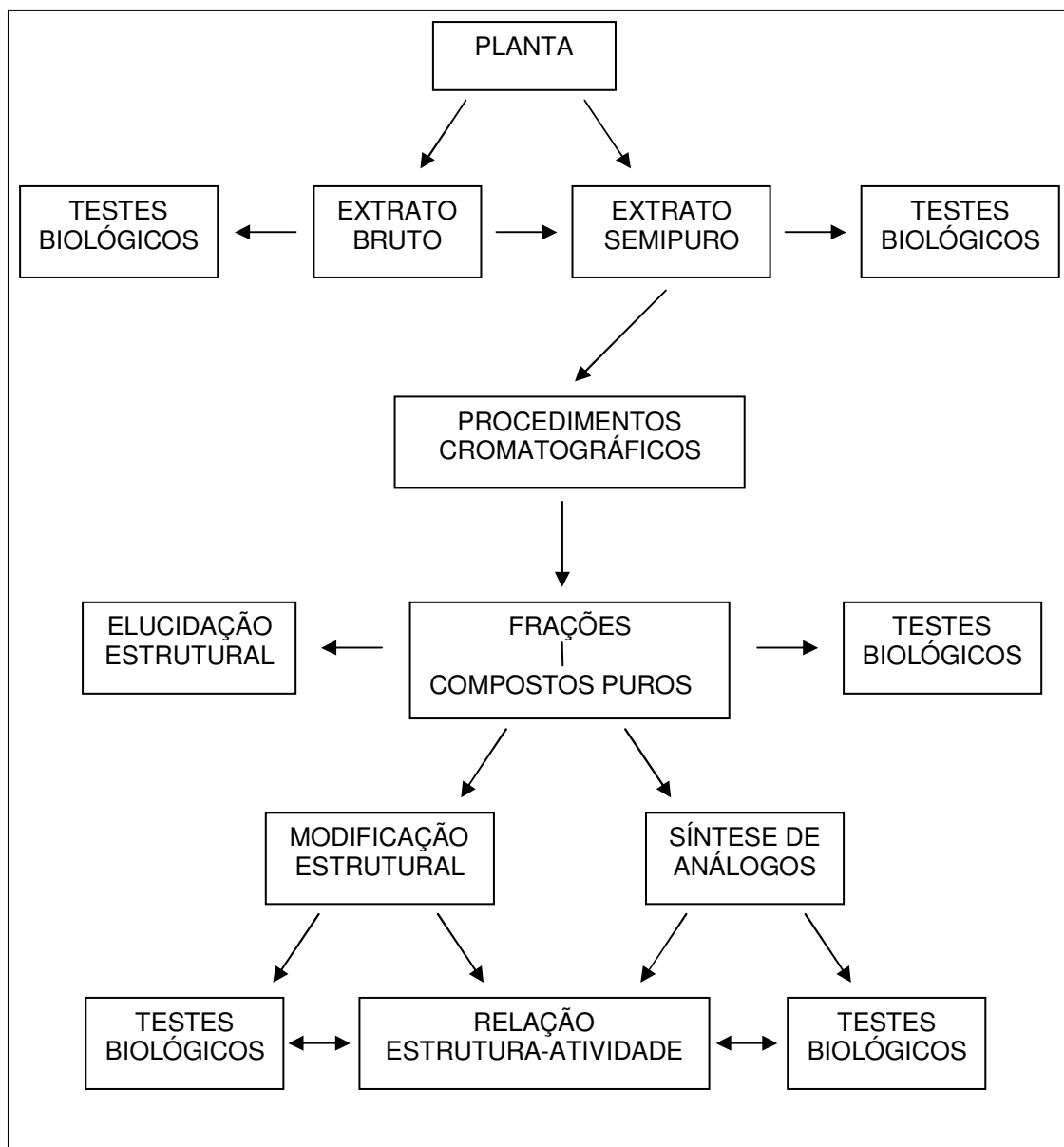


Figura 1. Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos (CECHINEL FILHO e YUNES, 2001).

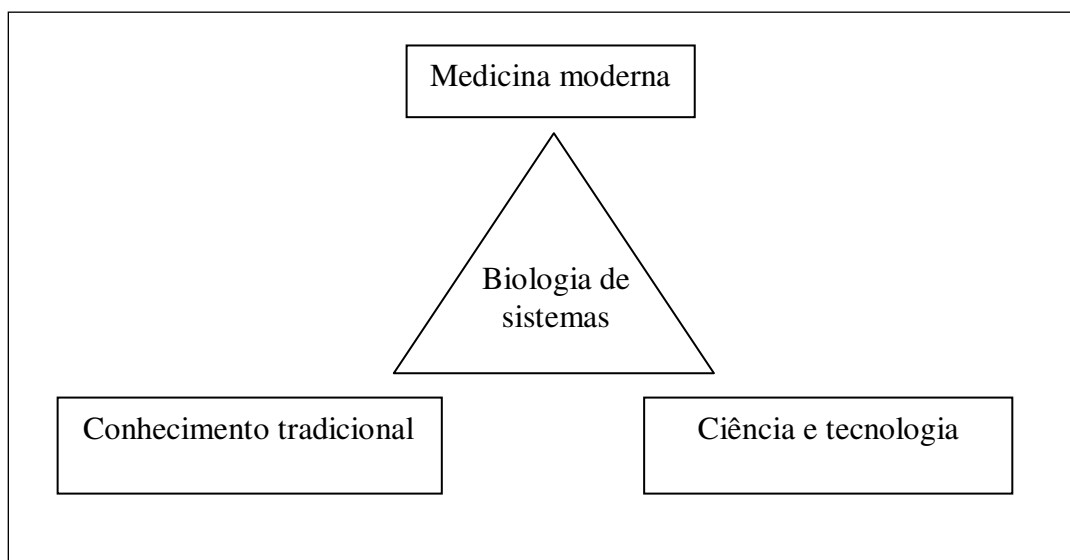


Figura 2. Triângulo dourado de Mashelkar*. Representa a relação entre medicina moderna, conhecimento tradicional e o forte uso da ciência e tecnologia no contexto da Biologia de Sistemas (PATWARDHAN e GAUTAM, 2005; LIU e WANG, 2008).

* Mashelkar, R. A. (2003). Chitrakoot Declaration, *National Workshop on Ayurveda Research Scenario – Challenges, Opportunities and Prospects for Excellence*. National Botanical Research institute, 24-26 May 2003, Lucknow, India.

2. *Annona muricata* (Graviola)

A família Annonaceae compreende um grande número de espécies com distribuição pantropical, sendo que mais de 60 espécies são do gênero *Annona* (MORTON, 1987). Essa família é constituída por árvores e arbustos, que se caracteriza por apresentar flores andróginas, solitárias ou em inflorescências, axilares ou terminais, opositófilas ou não; cálice de três sépalas, corola de seis pétalas bisseriadas, geralmente carnosas ou crassas, estames numerosos, gineceu dialicarpelar; fruto sincárpico ou apocárpico, muricado ou não; carpídios sésseis ou estipitados, secos ou carnosos, deiscentes ou indeiscentes; sementes com endosperma ruminado (PONTES *et al.*, 2004). A **Figura 3** apresenta fruto e folhas da *A. muricata*.

Um dos principais interesses dessa família é que as anonáceas possuem um grupo de fitoquímicos denominados acetogeninas de anonáceas, com propriedades biologicamente ativas, como aplicações pesticidas patenteadas e atividade antitumoral (RUPPRECHT *et al.*, 1990). Várias acetogeninas vêm sendo constantemente avaliadas (com identificação de novos compostos inibitórios) como candidatas promissoras para uma futura geração de drogas para a batalha contra os atuais tumores resistentes à quimioterapia. As acetogeninas possuem um esqueleto comum, freqüentemente caracterizado por cadeia não-ramificada C₃₂ ou C₃₄ derivada de ácido graxo, finalizando em uma γ -lactona. Várias funções oxigenadas, tais como hidroxil, cetona, epóxido, tetrahydrofurano (THF) e tetrahidropirano (THP), podem estar presentes em ligações duplas ou triplas, e os vários tipos são caracterizados com base na natureza dos grupos funcionais presentes (BERMEJO *et al.*, 2005). São classificados em cinco tipos principais, de acordo com o número e posições dos anéis THF: não-THF, mono-THF, adjacente THF, não-adjacente bis-THF e tri-THF (KIM *et al.*, 1998). A **Figura 4** mostra o esqueleto de uma acetogenina presente em folhas de *A. muricata*.

A espécie *Annona muricata* L. é conhecida popularmente no Brasil como graviola. Nos EUA, como soursop; em países de língua espanhola, como guanábana; e na França, corossolier (MORTON, 1987).



Figura 3: Fruto e folhas de *Annona muricata*.

<http://www.nybg.org/bsci/belize/Annona_muricata.jpg> Acesso em 09 de abril de 2008).

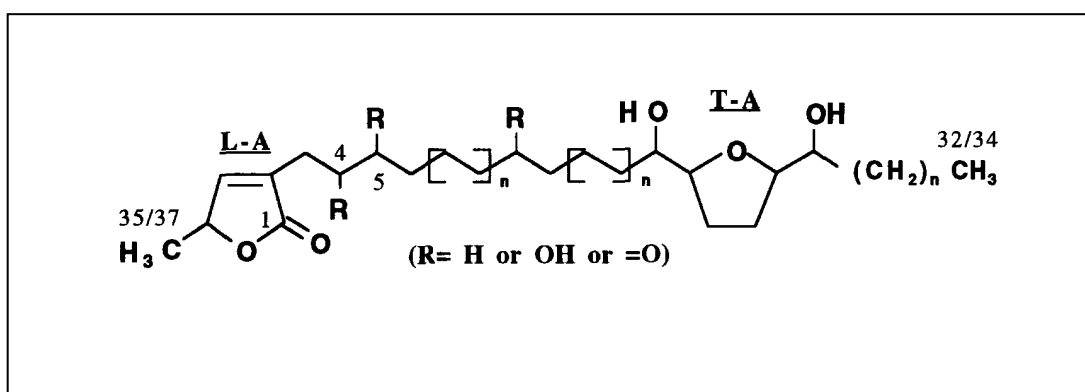


Figura 4. Esqueleto de acetogenina Mono-THF α , α' -dihidroxilada, presente em folhas de *A. muricata* (ZAFRA-POLO *et al.*, 1998).

A *A. muricata* é uma espécie introduzida (Martius 1841) e possui grande importância econômica no nordeste brasileiro, principalmente nos Estados da Bahia, Paraíba, Pernambuco e Ceará, porque é cultivada para a utilização de seus frutos na fabricação de sucos, sorvetes, compotas, geléias e doces (DO SACRAMENTO *et al.*, 2003; PONTES *et al.*, 2004).

Na medicina popular, todas as partes da árvore de *A. muricata* podem ser usadas, conferindo diferentes propriedades e usos. É utilizada no tratamento da gripe, tosse, astenia, doenças parasitárias e problemas digestivos (WENINGER *et al.*, 1986; DE FEO, 1992). Relatos de pesquisas demonstram que *A. muricata* possui efeito antidepressivo, antiparasítico, antimoluscicida, antiviral, antimalárico, antibacteriano, anticâncer e pesticida biodegradável (MISAS *et al.*, 1979; GBEASSOR *et al.*, 1990; BORIES, *et al.*, 1991; SUNDARRAO *et al.*, 1993; WU *et al.*, 1995a; RIESER *et al.*, 1996; ZENG *et al.*, 1996; HASRAT *et al.*, 1997; PADMA *et al.*, 1998; DOS SANTOS e SANT'ANA, 2001). Porém, na cidade de Guadalupe (México), dados epidemiológicos e pesquisas experimentais têm associado um tipo de Parkinsonismo com o fruto e chás das folhas de *A. muricata*, o que sugere perda neuronal (CHAMPY *et al.*, 2004; CAPARROS-LEFEBVRE e STEELE, 2005).

Nas folhas de *A. muricata* existem vários tipos de acetogeninas com anéis mono-THF (**Figura 4**) com propriedades citotóxicas para linhagens celulares de tumores sólidos, às quais podem se citar:

- **Annomuricins A e B** - bioativas contra células de carcinoma de pulmão A-549, carcinoma de mama MCF-7 e adenocarcinoma de cólon HT-29 (WU *et al.*, 1995a).
- **Muricatocins A e B** - bioativos contra células de carcinoma de pulmão A-549, carcinoma de mama MCF-7 e adenocarcinoma de cólon HT-29, com citotoxicidade acentuada para carcinoma de pulmão A-549 (WU *et al.*, 1995b).
- **Annomuricin C e muricatocin C** - bioativos contra linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon HT-29, com citotoxicidade acentuada para carcinoma de pulmão A-549 e carcinoma de mama MCF-7 (WU *et al.*, 1995c).
- **Annomutacin e (2,4-trans e cis)-10R-annonacin-A-ones** - bioativos contra linhagens celulares de tumores de pulmão A-549, mama MCF-7, cólon HT-

29, com citotoxicidade seletiva contra linhagens celulares tumorais humanas de pulmão A-549 (WU *et al.*, 1995d).

- **Annohexocin** - citotoxicidade e seletividade para linhagens celulares de tumor de pulmão A-549, de mama MCF-7, de adenocarcinoma de cólon HT-29, de rim A-498, de próstata PC-3 e de pâncreas PACA-2 (ZENG *et al.*, 1995).
- **Annopentocins A (1), B (2) e C (3); cis (4) e trans-annomuricin-D-ones (5)** - (1) – citotoxicidade seletiva para carcinoma de células pancreáticas (PACA-2), (2) e (3) citotoxicidade seletiva para carcinoma de células de pulmão (A-549), mistura de (4) e (5) – citotoxicidade seletiva para linhagens celulares de câncer de pulmão (A-549), colon (HT-29) e pâncreas (PACA-2) com potencial igual ou superior à adriamicina (ZENG *et al.*, 1996).
- **Muricoreacin e murihexocin C** - citotoxicidade para linhagens celulares de carcinoma de pulmão (A-549), de mama (MCF-7), de rim humano (A-498), adenocarcinoma de colon (HT-29), seletividade citotóxica para adenocarcinoma de próstata (PC-3) e carcinoma de pâncreas (PACA-2) (KIM *et al.*, 1998).
- **Annocatalin** - alta seletividade citotóxica para linhagens celulares de hepatoma humano Hep 2,2,15 (LIAW *et al.*, 2002).

Biologicamente, as acetogeninas (metabólitos secundários) são potentes inibidoras da NADH ubiquinona oxidorreductase (enzima essencial no complexo I) levando a uma fosforilação oxidativa na mitocôndria, de mamíferos, e dos sistemas de transporte de elétrons mitocondrial em insetos. São, também, potentes inibidoras da NADP oxidase ligada à membrana plasmática de células cancerosas. Agem diretamente no sítio catalítico da ubiquinona, dentro do complexo I, e na glicose desidrogenase microbiana (ZAFRA-POLO *et al.*, 1998; ALALI *et al.*, 1999).

O complexo I tem um papel importante na manutenção da função bioenergética da célula, por dirigir a síntese de ATP de equivalentes reduzidos mitocondriais produzidos nos meios metabólicos oxidativos centrais (BERMEJO *et al.*, 2005; ICHIMARU *et al.*, 2006).

A presença de grupos hidroxil adjacentes ao anel (anéis) THF é um aspecto estrutural comum de acetogeninas naturais (ABE *et al.*, 2004). Makabe *et al.*, (2006) sintetizaram três acetogeninas com convergência estereoseletiva e

examinaram a atividade inibitória com NADH-ubiquinona oxidorreductase mitocondrial de coração bovino. Os resultados indicaram que, para a manutenção do potente efeito inibitório, a lactona hidroxilada não pode ser substituída por anéis hidroxilados mono- ou bis-THF, com uma cadeia longa alquil, à qual pode ser vista em acetogeninas usuais.

O mecanismo de citotoxicidade seletiva das acetogeninas, e os fatores que modulam a eficácia contra células cancerosas, no entanto, são desconhecidos. A atividade antitumoral desses compostos, e outros inibidores da cadeia respiratória, devem ser próprios, devido às células tumorais possuírem maior demanda energética e/ou aquelas com alta dependência de fosforilação oxidativa devem ser mais sensíveis a efeitos citotóxicos desses compostos. A eficiência para controlar o crescimento de células tumorais implica em mecanismos adicionais, além de produção de energia mitocondrial, na qual a indução de apoptose está envolvida (BERMEJO *et al.*, 2005).

A inibição do complexo I mitocondrial aumenta a quantidade de espécies químicas reduzidas ou semi-reduzidas de transportadores de elétrons, os quais reagem com o oxigênio molecular para gerar ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, o que leva à promoção de amplificação de efeitos deletérios, levando à indução de sinais para desencadear a cascata apoptótica (BERMEJO *et al.*, 2005).

Certos tipos de acetogeninas, como a annonacina, são muito tóxicas para neurônios dopaminérgicos e não-dopaminérgicos e imitam a neurodegeneração de substância negra e estriada induzida pela rotenona (inibidora do complexo I mitocondrial) e MPP (methylphenylpyridinium) que causam Parkinsonismo experimental (CHAMPY *et al.*, 2004; BERMEJO *et al.*, 2005). Essa acetogenina, bem como a squamocina – uma acetogenina bis-THF, isolada de vários gêneros de anonáceas, são descritas como indutoras de apoptose em linhagens celulares de tumores humanos (linhagens celulares de leucemia HL-60), com mecanismo de produção de espécies de oxigênio reativas pelo complexo I mitocondrial inibindo parcialmente o evento iniciador, seguido de ativação da caspase-3 (processo executor principal) à qual dirige a indução de apoptose em células tumorais (ZHU *et al.*, 2002; BERMEJO *et al.*, 2005). Squamocina demonstrou inibição da proliferação de células K-562 (leucemia mielóide crônica) via parada

G2/M do ciclo celular mitótico em associação com a indução de p21, p27 e a redução de atividades quinases Cdk1 e Cdk25C (LU *et al.*, 2006).

Assim, é verificado por meio desses dados, que *A.muricata* possui acetogeninas que são potentes inibidoras do complexo I mitocondrial (NADH: ubiquinona oxidoreductase) e, por esse fator, esta planta pode atuar como pesticida e como indutora de apoptose em linhagens de células cancerosas. Estudos com esta planta e outras espécies e gêneros da família Annonaceae, seja por melhor conhecimento de processos celulares e/ou identificação/síntese de novas plantas/compostos inibitórios de células tumorais, são de extrema relevância para o desenvolvimento de drogas antitumorais, principalmente no que se refere a tumores resistentes à quimioterapia e à citotoxicidade seletiva, observada em várias linhagens tumorais.

3. *Tabebuia impetiginosa* (Ipê-roxo ou róseo)

Ipê é uma palavra de origem tupi que significa “árvore cascuda”. Esse nome popular é designado para várias espécies de árvores do gênero *Tabebuia*, com características de flores brancas, amarelas, róseas, lilás ou roxas.

Uma das espécies desse gênero, *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex DC) Standley 1936, família Bignoniaceae, possui vários sinônimos botânicos: *Handroanthus avellanadae* (Lorentz & Griseb.) Mattos, *H. impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, *Tabebuia avellanadae* Lorentz e Griseb., *T. dugandii* Standl., *T. ipê* (Mart.) Standl., *Gelsemium avellanadae* (Lorentz e Griseb.) Kuntze, *Tecoma adenophylla* Bureau ex K.Schum., *T. avellanadae* (Lorentz e Griseb.) Speg., *T. impetiginosa* Mart. ex. DC. (SALIS e CRISPIM, 2006).

O Ipê é conhecido popularmente no Brasil como pau d’arco, ipê, ipê-roxo, ipê róseo, peúva, piúva-da-mata, e em países de língua latina como lapacho e taheebo. A *Tabebuia impetiginosa* (*Ti*) ocorre em quase todo o território brasileiro, Paraguai, Argentina, entre outros países. Sua árvore possui de 10 a 35 metros de altura e 30 a 40 cm de diâmetro (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

Sua inflorescência, de cor rósea arroxeadada, forma nos galhos bolas de flores, às vezes muito próximas, o que levou os botânicos que a descreveram a chamá-la pela primeira vez de “árvore buquê” (**Figura 5**). Florescem durante os meses de maio a setembro, com árvores totalmente despidas de folhagem. Os frutos amadurecem no início das chuvas.

Ipê-roxo, pau d’arco, lapacho e taheebo são designações mais freqüentes para *T. impetiginosa*, que é utilizada, principalmente, como planta medicinal. Assim, um dos grandes motivos de estudo das plantas deste gênero é a presença de constituintes biologicamente ativos, o lapachol e β -lapachona, que são do grupo das quinonas, com maior interesse por seus efeitos anticancerígenos (FONSECA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003). Constituintes da casca do caule de *T. impetiginosa*, além de diversas quinonas, são dialdeídos ciclopentenos, ácido benzóico, derivados de benzaldeídos, glicosídeos e flavonóides (KOYAMA *et al.*, 2000; WARASHINA *et al.*, 2004; WARASHINA *et al.*, 2005).



Figura 5. *Tabebuia impetiginosa*.

As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos naturais, e são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico. Esses compostos são importantes em processos bioquímicos vitais (cadeia respiratória, fotossíntese e controle da coagulação sangüínea) e estudos farmacológicos, destacando-se, principalmente, o fato de provocarem o estresse oxidativo, que induz a formação deletéria endógena de espécies reativas de oxigênio, e a inibição do complexo das topoisomerasas, que provoca o desencadeamento de apoptose. Porém, formas isoméricas diferem muito em suas propriedades físicas, químicas e quanto à ação biológica (SILVA *et al.*, 2003). Drogas anticâncer contendo quinonas incluem a Adriamicina (doxorrubicina), Daunorrubicina, Mitomicina C, Streptonigrina e análogos desses agentes (BACHUR *et al.*, 1978; SILVA *et al.*, 2003). São exemplos de quinonas com atividade antibiótica e antitumoral as mitomicinas e as antraciclinas.

O Lapachol (2-hidroxi-3-[3-metil-2-butenil]-1,4-naftoquinona), uma naftoquinona natural (**Figura 6-A**), é um dos principais representantes do grupo das quinonas das tabebuias que, em seu metabolismo, na presença da enzima citocromo P450 redutase e NADPH, causam danos ao DNA, enquanto radical ânion superóxido e radical hidroxil são gerados. Assim, citocromo P450 redutase é capaz de reduzir o Lapachol e, desse modo, produzir espécies de oxigênio ativas (KUMAGAI *et al.*, 1997).

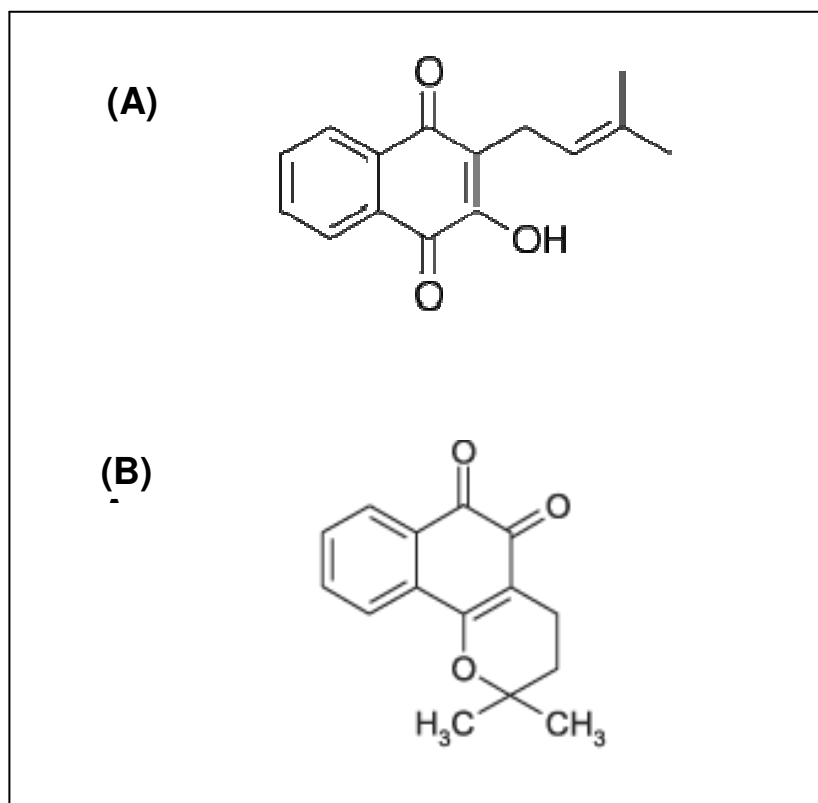


Figura 6: Fórmula estrutural do Lapachol (A) e β -lapachona (B).

Topoisomerasas são enzimas que podem criar ou relaxar a superelocoidização do DNA durante a replicação, e também podem induzir ou remover alças ou ligações em uma cadeia. Existem dois tipos básicos de isomerasas: as enzimas do tipo I (Topo I) que induzem uma quebra unifilamentar no duplex de DNA; e as enzimas do tipo II (Topo II) que causam uma quebra em ambos os filamentos. Qualquer alteração no balanço entre essas enzimas é suficiente para induzir a morte celular programada – apoptose (SILVA *et al.*, 2003).

Os agentes ou compostos inibidores das topoisomerasas podem agir estabilizando o complexo topo-DNA ou inibindo cataliticamente essas enzimas. A β -lapachona age como inibidora das enzimas Topo I e II (**Figura 7**), com ação dependente da presença NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1, o que difere de outros inibidores de Topo I, como a camptotecina e topotecan (LI *et al.*, 1995; FRYDMAN *et al.*, 1997; MIYAMOTO *et al.*, 2000).

A NQO1 é expressa em maior grau em vários tipos de tumores (mama, célula de pulmão não-pequena, pâncreas, colo-retal e próstata) do que em tecidos normais (REINICKE *et al.*, 2005). Atualmente, estudos exploram a hiperativação da PARP-1, a qual facilita o reparo do DNA (liberação de quebras da fita de DNA), para terapia de câncer de pulmão de células-não-pequenas. Quando o dano no DNA oprime o reparo, PARP-1 torna-se hiperativada, conduzindo à rápida depleção de NAD⁺, perda dramática dos níveis de ATP e clivagem proteolítica de p53/PARP-1, conduzindo à apoptose, um explicável meio para terapia seletiva (BEY *et al.*, 2007).

A β -lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2*H*-naftol[1,2-*b*]piran-5,6-diona), uma naftoquinona pirânica (**Figura 6-B**), também como representante fundamental das quinonas das tabebuias, possui efeitos indutores de apoptose (SILVA *et al.*, 2003). A indução de apoptose pela β -lapachona foi demonstrada por meio de vários experimentos, com diferentes linhagens de células cancerosas, que configuram mecanismos de ações diferentes, como envolvimento do ciclo redox, gerando o estresse oxidativo; inibição das topoisomerasas I e II; ativação de “checkpoints” durante o ciclo celular; diminuição da razão Bcl/Bax, ativação de caspases e perda da atividade telomerase; hiperativação de poli(ADP-ribose)polimerase-1 (PARP-1) dependente de NAD(P)H, quinona oxidoreductase-

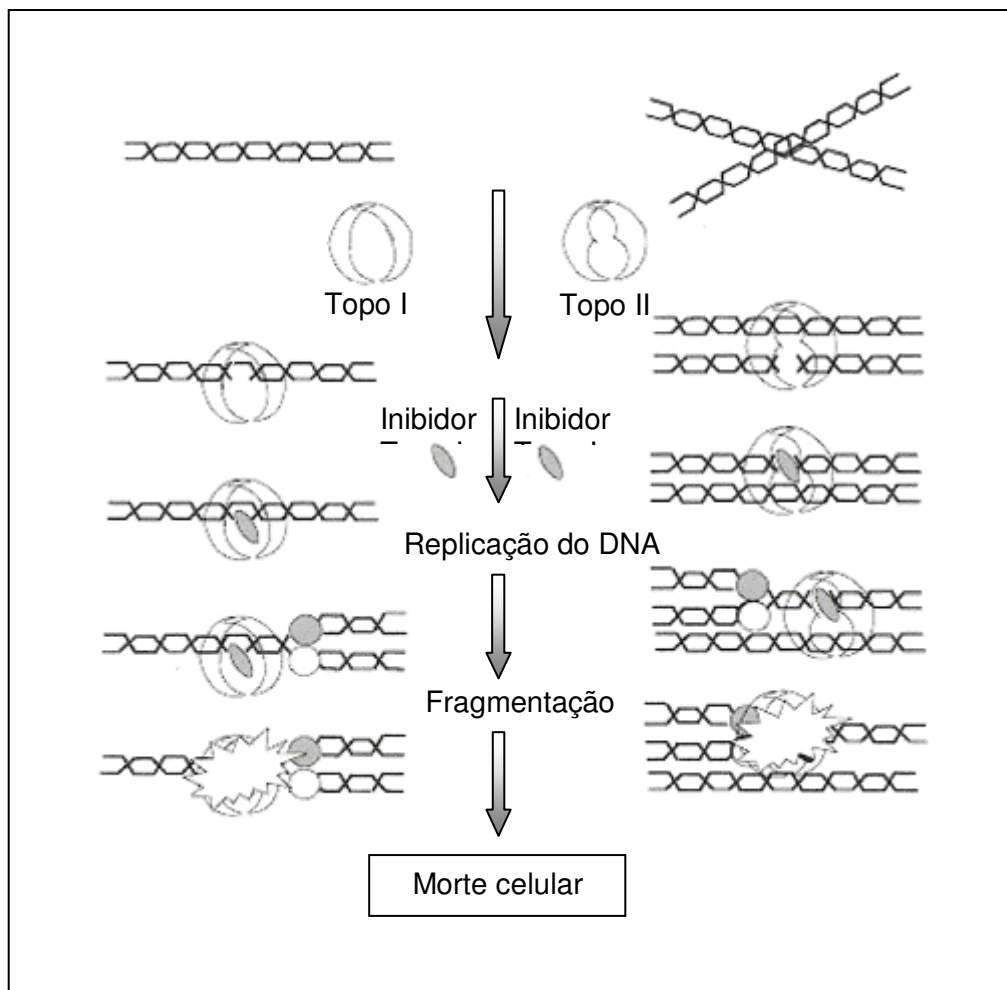


Figura 7. Alterações nas ações das topoisomerases (SILVA *et al.*, 2003).

1 (NQO1) (CHAU *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2003; WOO e CHOI, 2005; WOO *et al.*, 2006).

Pontos de checagem (checkpoints) existem em fases específicas do ciclo de proliferação celular, com a finalidade de resguardar a integridade genômica e, quando o dano no DNA é irreparável, a célula sofre apoptose. Em células cancerosas, os checkpoints são debilitados e resultam em acúmulo de dano genético. Assim, vários estudos têm sugerido ativação direta de checkpoints, como estratégia seletiva contra o câncer, induzida pela β -lapachona (LI *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2003).

Citotoxicidade sinérgica também é verificada entre β -lapachona e taxol e entre β -lapachona e radioterapia (LI *et al.*, 1999; MIYAMOTO *et al.*, 2000). A ação da β -lapachona pode também estar associada com eventos de recombinação homóloga, enquanto atua como inibidora da Top I ou em combinação com outras drogas terapêuticas (FREI e WÜRGLER, 1996; VAN WAARDENBURG *et al.*, 2004).

A *T. impetiginosa* (casca e caule) é utilizada na medicina popular como diurético, adstringente, para tratamento de úlceras e problemas gastrintestinais, sífilis, candidíase, câncer, diabete, prostatite, constipação e alergia (PARK *et al.*, 2003). Dados de pesquisas encontrados na literatura demonstram que *T. impetiginosa*, ou seus compostos isolados – Lapachol e β -lapachona, possuem propriedades antipsoriática, antifúngica, antimicrobiana, antiviral, antiinflamatória, antiulcerogênica, anticancerígena, antibacteriana, antimalárica, tripanossomicida e como quimioprolifático contra infecção por cercárias de *Schistosoma mansoni* (ANESINI e PEREZ, 1993; MÜLLER *et al.*, 1999, PORTILLO *et al.*, 2001; FONSECA *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2003; MENNA-BARRETO *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2006). Porém, outros estudos demonstraram que o Lapachol apresenta sinais toxicológicos e efeitos como anorexia e náusea, e a β -lapachona com toxicidade muito superior ao Lapachol (MORRISON *et al.*, 1970; FONSECA *et al.*, 2003).

Outro aspecto de risco desta planta (e também de outras plantas que podem ser adquiridas pela população em mercados e feiras livres), foi verificado em pesquisa científica, quando amostras de cascas do caule de Ipê, comercializadas em São Luís (MA), foram avaliadas quanto à presença de

material microbiológico. Os resultados demonstraram que nas amostras havia várias espécies de fungos, inclusive três espécies de *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger*) (AMARAL *et al.*, 2001).

4. A Toxicologia Genética e o Teste de Mutação E Recombinação Somática (SMART)

A Genética Toxicológica situa-se na interface entre a Toxicologia e a Genética e analisa a mutagênese, a carcinogênese e a teratogênese, visando descrever resultados produzidos por substâncias genotóxicas em vários organismos e obter conclusões que podem ser extrapoladas para o homem. Ela pode ser definida como sendo a investigação sistemática de todos os efeitos que os agentes físicos e químicos presentes em nosso ambiente podem exercer sobre o sistema genético do homem, bem como, de suas remotas conseqüências para o futuro das espécies; ela avalia tando as agressões que o DNA e os sistemas reguladores da vida sofrem, como as estratégias de se defender ou corrigirem falhas (MOUTSCHEN, 1985).

As mutações são erros nos processos de vida, mas essenciais para a sobrevivência dessa mesma vida, e são definidas como sendo qualquer alteração do DNA. No entanto, a alteração genética é o processo básico que permite a uma célula normal evoluir à célula cancerosa. As causas do câncer têm sido determinadas para serem o resultado de predisposição genética, exposição ambiental, infecção por um agente apropriado (por exemplo, o vírus papiloma humano) ou uma combinação destes (BISHOP e SCHIESTL, 2001).

Uma neoplasia origina-se de uma célula ancestral comum que, em um determinado momento, deu início a um programa de divisão não próprio e esta transformação maligna é o resultado do acúmulo de mutações em grupos específicos de genes: os proto-oncogenes e os supressores tumorais (CUNHA, 2001). Os proto-oncogenes agem como reguladores positivos, comandando a síntese de uma variedade de produtos que controlam o crescimento, a proliferação e a diferenciação celular (TLSTY *et al.*, 1995). Quando mutados, transformam-se em oncogenes, produzem proteínas defeituosas ou em quantidades alteradas que corrompem os sinais usuais de entrada na fase G1 do ciclo celular, deixando as células destituídas dos reguladores positivos do processo proliferativo e entram progressivamente em divisão (SCHMANDT e MILLS, 1993). Recentemente, dados de pesquisa realizados por Sureban *et al* (2008) demonstraram que a proteína reguladora de tradução RBM₃ é um novo

proto-oncogene que previne a catástrofe mitótica, pois induz transformação quando superexpressada e é essencial para a progressão de células por meio da mitose.

A função principal dos genes supressores de tumor é bloquear a passagem da fase G1 para a S quando identificam qualquer anormalidade no material genético. Quando esses genes não são funcionais as células portadoras desses genes podem ser duplicadas, passando a acumular mutações em taxas mais altas que os níveis normais, liberando a célula das restrições por eles impostas, podendo resultar em crescimento celular anormal (TLSTY *et al.*, 1995; BISHOP e SCHIESTL, 2001).

O processo de carcinogênese em geral dá-se lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável. Esse processo passa por vários estágios antes de chegar ao tumor: iniciação, promoção e progressão (ALMEIDA *et al.*, 2005). As células mantêm sistemas de sustentação específicos que as levam à morte programada – a apoptose, na busca de evitar o acúmulo de danos no DNA e preservar a integridade do organismo. Porém, células cancerosas possuem habilidade de lograr esta apoptose para a contribuição da expansão do tumor e para torná-lo resistente à terapia (RUOSLAHTI, 1996).

É sabido que muitos agentes que participam das etapas de iniciação ou promoção de tumores malignos não induzem danos mutagênicos e/ou clastogênicos e, também, muitos compostos capazes de danificar o DNA agem como promotores de eventos recombinacionais mitóticos, não havendo correspondência perfeita entre mutagenicidade e recombinogênese. Assim, um outro parâmetro genético da genotoxicidade e da carcinogenicidade é a recombinação mitótica. Esse evento genotóxico pode resultar em perda de heterozigosidade e conduzir às etapas de iniciação e promoção de tumores malignos, sendo que alguns agentes podem ser recombinogênicos sem serem mutagênicos, enquanto outros induzem lesões tanto mutagênicas quanto recombinogênicas (WÜRGLER e VOGEL, 1986; TURNER *et al.*, 2003). A ocorrência de mutação e recombinação mitótica em indivíduos heterozigotos pode levar à homozigose ou hemizigose de uma variedade de genes supressores de tumor, que se expressam com um padrão recessivo. A permuta mitótica também

está envolvida com a duplicação gênica, conduzindo à amplificação de proto-oncogenes (superexpressão), o que leva ao excesso de produto gênico e interfere em etapas posteriores à iniciação (CAVENEY *et al.*, 1986; BISHOP, 1987).

Sabendo que agentes antimutagênicos são produtos ou processos que reduzem mutações e, como já exposto anteriormente, que os fatores que determinam a mutagenicidade em organismos pluricelulares quase sempre produzem neoplasias, testes de mutagenicidade/genotoxicidade e antimutagenicidade/antigenotoxicidade são referenciais para carcinogenicidade e anticarcinogenicidade. Ainda, se recombinação mitótica pode constituir um importante mecanismo no desenvolvimento de certos tipos de cânceres humanos, biotestes de avaliação de eventos recombinogênicos são de interesse indubitável.

Porém, muitos antimutágenos ou anticarcinógenos já publicados foram mostrados para serem mutagênicos ou carcinogênicos, mas aquelas substâncias que possuem ambos os efeitos, a direção do efeito parece ser dependente sobre o mutágeno usado e o sistema de teste. Disso, pode-se concluir que a prática corrente de identificação de antimutágenos e anticarcinógenos por suas atividades contra químicos específicos em sistemas de testes específicos não é o suficiente para sustentar a conclusão que a mesma substância será similarmente ativa em outros sistemas (ZEIGER, 2003).

A mosca das frutas *Drosophila melanogaster* é um organismo experimental utilizado em sistemas de testes para detecção de compostos químicos com atividade genotóxica e antigenotóxica por possuir algumas vantagens: é um organismo eucariótico com curto ciclo de geração (por volta de 10 dias a 25°C); possui caracteres morfológicos controlados geneticamente e facilmente detectáveis, grande número de mutantes e linhagens caracterizadas geneticamente; alto número de indivíduos na prole; os meios de cultura são baratos e permitem cruzamento de grande número de animais; e é capaz de ativar enzimaticamente promutágenos e procarcinógenos *in vivo* (WÜRGLER e VOGEL, 1986; GRAF e SINGER, 1992).

Com o término do projeto de seqüenciamento do genoma da *Drosophila*, estudos de comparação mostraram que dois terços dos genes implicados em cânceres humanos têm equivalência na mosca, incluindo o supressor de tumor, *TP53*, pois compartilham domínios similares (SUTCLIFFE e BREHM, 2004).

Diante de todas essas vantagens pode-se dizer que a *Drosophila* é um excelente organismo experimental para estudar mecanismos moleculares de genotoxicidade e antigenotoxicidade, com respostas relevantes e que podem ser extrapoladas com um índice de acerto de 92% para humanos (CUNHA, 2001).

O “Somatic Mutation and Recombination Test” (SMART) utiliza a *Drosophila melanogaster* como organismo experimental, possibilita a detecção simultânea de mutações gênica (mutação de ponto e deleção) e cromossômica (quebras cromossômicas, não-disjunção e translocação) e/ou recombinação mitótica (somática), voltada especialmente sobre os eventos relacionados com recombinação homóloga (GRAF *et al.* 1984; WÜRGLER e VOGEL, 1986).

Esse teste baseia-se na perda da heterozigose induzida por genotoxinas que levam à ocorrência dos diferentes eventos genotóxicos que vão afetar as células dos discos imaginiais presentes na larva. Se uma alteração genética ocorre em uma dessas células do disco imaginal, essa alteração estará presente em todos os descendentes celulares e formarão um clone de células mutantes. Se a alteração causa um dano visível no fenótipo, o clone celular mutante pode ser detectado como uma mancha de células mutantes sobre os tricomas das asas da mosca adulta. A análise do teste é feita através da observação desses pêlos mutantes (grupos celulares formando manchas) com fenótipo marcador específico: *mwh* e/ou *flr*³. A intensidade e a natureza do dano genético ocorrido na larva podem ser avaliadas com relação ao número e tipos de manchas, respectivamente, às quais são manifestadas nas asas. Manchas que expressam o fenótipo *mwh* ou *flr*³ são denominadas simples e indicam se a lesão gerada foi por mutações gênicas ou cromossômicas ou recombinação (Figuras 8 e 9); manchas gêmeas são expressas pelos dois fenótipos – *mwh* (multiple wing hairs) e *flr* (flare) – e se originam exclusivamente por recombinação somática (Figura 10) (GRAF *et al.*, 1984). O tamanho das manchas nos dá a informação de correlação do tempo de atuação da genotoxina ao decorrer da embriogênese e, desta forma, com o momento da indução do dano genético. Como células monossômicas ou portadoras de grandes deleções dividem-se raramente, aumentos restritos ao número de manchas simples pequenas podem ser indicativos de clastogênese ou aneugênese (GRAF *et al.*, 1995).

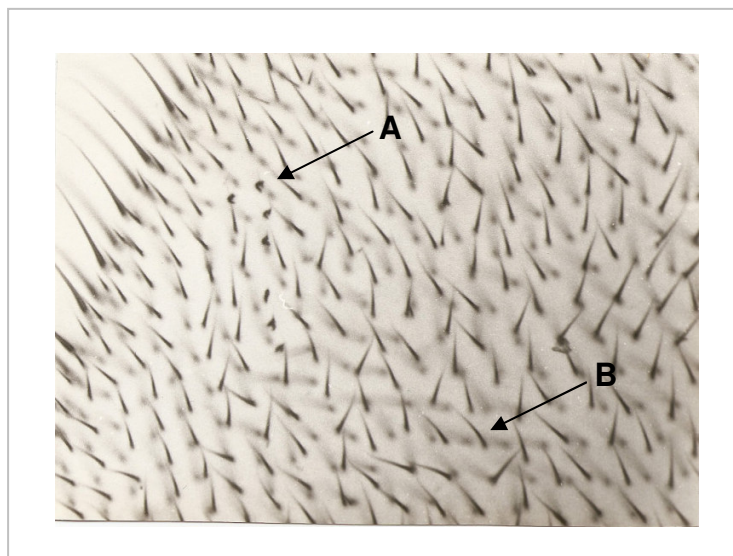


Figura 8. Fotomicrografia mostrando pêlos mutantes do tipo flare (seta A) e pêlos normais (seta B) observados em microscópio óptico de luz (aumento de 400x).



Figura 9. Fotomicrografia mostrando pêlos múltiplos (seta) observados em microscópio óptico de luz (aumento de 1000x).

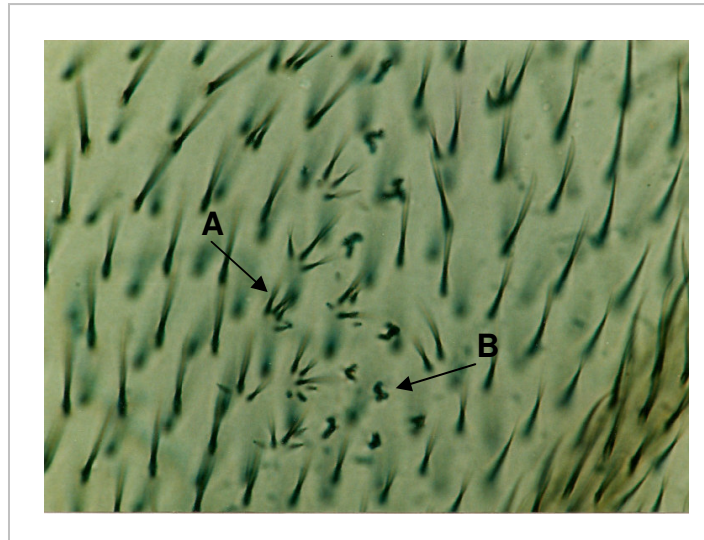


Figura 10. Fotomicrografia mostrando mancha gêmea [contendo pêlos múltiplos (**seta A**) e pêlos flare (**seta B**) adjacentes] observada em microscópio óptico de luz (aumento de 1000x).

As linhagens denominadas *mwh*, *flr³* e *ORR*; *flr³* garantem dois tipos de cruzamentos: padrão – *mwh* X *flr³* e de alta capacidade de bioativação metabólica – *mwh* X *ORR*; *flr³*. O cruzamento padrão detecta genotoxinas de ação direta, pois utiliza linhagens portadoras de nível basal de enzimas de metabolização do tipo CYP. O cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica detecta genotoxinas de ação indireta, e utiliza linhagens com alto nível constitutivo de enzimas CYP, o que lhes confere alta atividade de metabolização, capacitando ativação enzimática de promutágenos e procarcinógenos (GRAF e SINGER, 1992; GRAF e VAN SCHAİK, 1992; GUZMÁN-RINCÓN e GRAF, 1995).

Ambos os cruzamentos produzem larvas trans-heterozigotas para os marcadores recessivos *mwh* e *flr³* e larvas heterozigotas para o cromossomo TM3. Indivíduos TM3 apresentam múltiplas inversões que eliminam os produtos da recombinação e, portanto, permitem quantificar a contribuição real da recombinação, quando os resultados são comparados aos obtidos para os indivíduos trans-heterozigotos (GRAF *et al.*, 1984).

Ainda, em relação ao SMART, todas as características citadas são válidas também para estudos de antigenotoxicidade. Tratamentos simultâneos (co-tratamento), pré e pós-tratamento de várias durações com dois ou mais compostos são possíveis, e podemos ainda identificar agentes desmutagênicos e biantimutagênicos (KADA *et al.*, 1982; GRAF *et al.*, 1998).

Assim, o teste SMART de *asa* é, sem dúvida, de alta eficiência na detecção de agentes mutagênicos e antimutagênicos, bem como de agentes recombinogênicos e antirecombinogênicos, e está bem validado com um número estimado de mais de 400 diferentes substâncias químicas ou misturas complexas (GRAF *et al.*, 1998; SARIKAYA e AKIR, 2005; PANTALEÃO *et al.* 2007) e também com produtos de plantas medicinais (SOUSA *et al.*, 2003; ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2005).

Com o extenso uso e facilidade de disponibilização de plantas medicinais, há o crescente interesse sobre a toxicidade dessas plantas. A segurança e a qualidade das plantas medicinais devem ser asseguradas diretamente de extensas pesquisas, farmacovigilância, extenso controle regulatório e melhor comunicação entre pacientes e profissionais da saúde (ZHOU *et al.*, 2004).

Estudos de genotoxicidade e antigenotoxicidade podem ajudar na avaliação de segurança e efetividade de plantas medicinais (ROMERO-JIMÉNEZ *et al.*, 2005).

A necessidade de se obter uma política de regulamentação de produtos de plantas, bem como, normas de comercialização e uso é fato preponderante. Neste sentido, as pesquisas com plantas medicinais na área da Toxicologia Genética devem ser estimuladas e intensificadas, com o intuito de contribuir para a segurança, qualidade e eficácia desses produtos, oferecendo à população esse conhecimento e, ainda, proporcionar a indicação de novos produtos com propriedades farmacológicas como forma alternativa de medicamentos, com baixo custo e fácil acesso.

Diante de todos os relatos e dos experimentos verificados acerca do potencial anticancerígeno dos compostos existentes nas plantas *Annona muricata* e *Tabebuia impetiginosa* pode-se estabelecer a hipótese de que testes de antigenotoxicidade realizados com o SMART, com estas duas plantas, poderão determinar uma diminuição significativa de eventos genotóxicos, ou não, quando provocados por agentes indutores de genotoxicidade, em experimentos *in vivo*, como forma de contribuição de mais pesquisas com plantas medicinais.

“[...] nature is the best combinatorial chemist and possibly has answers to all diseases of mankind.”

(JACHAK e SAKLANI, 2007).

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M.; KENMOCHI, A.; ICHIMARU, N.; HAMADA, T.; NISHIOKA, T.; MIYOSHI, H.. Essential structural features of acetogenins: role of hydroxy groups adjacent to the bis-THF rings. **Bioorg Med Chem Lett**, v.14, p.779-782, 2004.

ALALI, F. Q.; LIU, X.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **J Nat Prod**, v.62, p.504-540, 1999.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: an introduction. **Quim Nova**, v.28, p.118-129, 2005.

AMARAL, F. M. M.; ROSA, L. M. V.; COUTINHO, D. F.; GONÇALVES, L. H.; RIBEIRO, M. N. Qualidade microbiológica das cascas do caule de *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Griseb. comercializadas em São Luís/Maranhão. **R Visão Academ**, Curitiba, v.2, p.65-70, 2001.

ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol**, v.39, p.119-128, 1993.

BACHUR, N. R.; GORDON, S. L.; GEE, M. V. A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals. **Cancer Res**, Zurich, v.38, p.1745-1750, 1978.

BAST, A.; CHANDLER, R. F.; CHOY, P. C.; DELMULLE, L. M.; GRUENWALD, J.; HALKES, S. B. A.; KELLER, K.; KOEMAN, J. H.; PETERS, P.; PRZYREMBEL, H.; de REE, E. M.; RENWICK, A. G.; VERMEER, I. T. M. Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.12, p.195-211, 2002.

BERMEJO, A.; FIGADÈRE, B.; ZAFRA-POLO, M-C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Nat Prod Rep**, v.22, p.269-303, 2005.

BEY, E. A.; BENTLE, M. S.; REINICKE, K. E.; DONG, Y.; YANG, C-R.; GIRARD, L.; MINNA, J. D.; BORNMANN, W. G.; GAO, J.; BOOTHMANN, D. A. An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by β -lapachone. **PNAS**, v.104, p.11832-11837, 2007.

BISHOP, J. M. The molecular genetics of cancer. **Science**, v.235, p.305-311, 1987.

BORIES, C.; LOISEAU, p.; CORTES, D.; MYINT, S. H.; HOCQUEMILLER, R.; GAYARAL, P.; CAVÉ, A.; LAURENS, A. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. **Planta Med**, v.57, p.434-436, 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial**, Brasília, 18 mar., 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 89 de 16 de março de 2004. Determina a publicação da “Lista de registro simplificado de fitoterápicos”. **Diário Oficial**, Brasília, 18 mar., 2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Determina a publicação da “Lista de referências bibliográficas para a avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos”. **Diário Oficial**, Brasília, 18 mar., 2004c.

BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiol**, v.124, p.507-514, 2000.

BRUGNO, A.; BUZZO, A. A.; NAKAMURA, C. T.; PEREIRA, T. C.; MATOS, D.; PINTO, T. J. A. Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais. **R Bras Ciên Farm**, v.41, p.491-497, 2005.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v.33, p.179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R.; CALIXTO, J. B. (ed) **Plantas Medicinais: sob a óptica da Química medicinal moderna**. ARGOS: Chapecó: ARGOS, 2001. p. 297-315.

CAPARROS-LEFEBVRE, D.; STEELE, J. Atypical parkinsonism on Guadeloupe, comparison with the parkinsonism-dementia complex of Guam and environmentaltoxic hypothesis. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.19, p.407-413, 2005.

CAVENEY, W.; KOUFOS, A.; HANSEN, M. F. Recessive mutant genes predisposing to human cancer. **Mutat Res**, v.168, p.3-14, 1986.

CECHINEL FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R.; CALIXTO, J. B. (ed) **Plantas Medicinais: sob a óptica da Química medicinal moderna**. ARGOS: Chapecó: ARGOS, 2001. p. 47-75.

CHAMPY, P.; HÖGLINGER, G. U.; FEGER, J.; GLEYE, C.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; GUERINEAU, V.; LAPRÉVOTE, O.; MEDJA, F.; LOMBÒS, A.; MICHEL, P. P.; LANNUZEL, A.; HIRSCH, E. C.; RUBERG, M.. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces a nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. **J Neurochem**, v.88, p.63-69, 2004.

CHAU, Y.; SHIAH, S.; DON, M.; KUO, M. Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor β -Lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. **Free Radic Biol Med**, v.24, p.660-670, 1998.

CHITTURI, S.; FARRELL, G. C. Herbal hepatotoxicity: an expanding but poorly defined problem. **J Gastroenterol Hepatol**, v.15, p.1093-1099, 2000.

CRECZYNSKI-PASA, T. B.; PEDROSA, R. C. Alvos moleculares na pesquisa de fitofármacos e fitoterápicos. In: YUNES, R.; CALIXTO, J. B. (ed) **Plantas Mediciniais: sob a óptica da Química medicinal moderna**. ARGOS: Chapecó: ARGOS, 2001. p. 195-234.

CUNHA, K. S. **Agentes antineoplásicos como indutores de toxicidade genética em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2001. 115f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

DE FEO, V. Medicinal and magical plants in the northern Peruvian Andes. **Fitoterapia**, v.63, n.5, p.417-440, 1992.

DO SACRAMENTO, C. K.; FARIA, J. C.; DA CRUZ, F. L.; BARRETO, W. S.; GASPAR, J. W.; LEITE, J. B. V. Caracterização física e química de frutos de três tipos de gravioleira (*Annona muricata* L.). **R Bras Frutic**, v.25, n.2, p.329-331, 2003.

DOS SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**, v.8, n.2, p.115-120, 2001.

ESPÍN, J. C.; GARCÍA-CONESA, M. T.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Nutraceuticals: facts and fiction. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2986-3008, 2007.

FONSECA, S. G. C.; BRAGA, R. M. C.; SANTANA, D. P. Lapachol – chemistry, pharmacology and assay methods. **R Bras Farm**, v.84, p.9-16, 2003.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutagenesis**, v.11, p.315-325, 1996.

FRYDMAN, B.; MARTON, L. J.; SUN, J. S.; NEDER, K.; WITIAK, D. T.; LIU, A. A.; WANG, H.; MAO, Y.; WU, H.; SANDERS, M. M.; LIU, L. F. Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by β -Lapachone and related naphthoquinones. **Cancer Res**, v.57, p.620-627, 1997,

GBEASSOR M.; KEDJAGNI, A. Y.; KOUMAGLO, K.; DE SOUZA, C.; AGBO, K.; AKLIKOKOU, K. *In vitro* antimalarial activity of six medicinal plants. **Phytother Res**, v.4, n.3, p.115-117, 1990.

GRAF, U. 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, 1995.

GRAF, U.; SINGER, D. Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **R Int Contam Ambient**, v.8, n.1, p.15-27, 1992.

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

GUZMÁN-RINCÓN, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: BUTTERWORTH, F. M.; CORKUN, L.D.; GUZMÁN-RINCÓN, J. editors. **Biomonitoring and biomarkers of environmental change**. Plenum Press: New York, p.169-181, 1995.

HASRAT, J. A.; BRUYNE, T.; BACKER, P.; VAUQUELIN, G.; VLIETININCK, A. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HT_{1A} receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. **J Pharm Pharmacol**, v.49, p.1145-1149, 1997.

ICHIMARU, N.; ABE, M.; MURAI, M.; SENOH, M.; NISHIOKA, T.; MIYOSHI, H. Function of the alkyl side chains of Δ lactone-acetogenins in the inhibitory effect on mitochondrial complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase). **Bioorg Med Chem Lett**, v.16, p.3555-3558, 2006.

JACHAK, S. M.; SAKLANI, A. Challenges and opportunities in drug discovery from plants. **Curr Sci**, v. 92, p.1251-1257, 2007.

KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, M. Environmental desmutagens and antimutagens. In: KLEKOWSKI, E. J, Jr. (ed) **Environmental mutagenesis, carcinogenesis and plant biology**. New York: Praeger, 1982. p. 133-152.

KIM, G.; ZENG, L.; ALALI, F.; ROGERS, L. L.; WU, F.; SASTRODIARDJO, S.; McLAUGHLIN, J. L. Muricoreacin and MurihexocinC, monotetrahydrofuran acetogenins, from the leaves of *Annona muricata*. **Phytochemistry**, v.49, n.2, p.565-571, 1998.

KOYAMA, J.; MORITA, I.; TAGAHARA, K.; HIRAI, K. Cyclopentene dialdehydes from *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, v.53, p.869-872, 2000.

KUMAGAI, Y.; TSURUTANI, Y.; SHINYASHIKI, M.; HOMMA-TAKEDA, S.; NAKAI, Y.; YOSHIKAWA, T.; SHIMOJO, N. Bioactivation of lapachol responsible for DNA

scission by NADPH-cytochrome P450 reductase. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.3, p.245-250, 1997.

LI, C.; LI, Y.; PINTO, A. V.; PARDEE, A. B. Potent inhibition of tumor survival *in vivo* by β -Lapachone plus taxol: combining drugs imposes different artificial checkpoints. **PNAS**, v.96, p.13369-13374, 1999.

LI, C.; WANG, C.; PARDEE, A. B. Induction of apoptosis by β -Lapachone in human prostate cancer cells. **Cancer Res**, v.55, p.3712-3715, 1995.

LI, Y.; SUN, X.; LaMONT, J. T.; PARDEE, A. B.; LI, C. J. Selective killing of cancer cells by β -Lapachone: direct checkpoint activation as a strategy against cancer. **PNAS**, v.100, p.2674-2678, 2003.

LIAW, C-C; CHANG, F-R; LIN, C-Y; CHOU, C-J; CHIU, H-F; WU, M-J; WU, Y-C
New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **J Nat Prod**, v.65, p.470-475, 2002.

LIU, Y.; WANG, M-W. Botanical drugs: challenges and opportunities. **Life Sci**, v.82, p.445-449, 2008.

LU, M-C.; YANG, S-H.; HWANG, S-L.; LU, Y-J; LIN, Y-H.; WANG, S-R.; WU, Y-C.; LIN, S-H. Induction of G2/M phase arrest by squamocin in chronic myeloid leukemia (K562) cells. **Life Sci**, v.78, p.2378-2383, 2006.

MAKABE, H.; KIMURA, Y.; HIGUCHI, M.; KONNO, H.; MURAI, M.; MIYOSHI, H.
Synthesis of (4*R*,15*R*,16*R*,21*S*)- and (4*R*,15*S*,16*S*,21*S*)-rollicosin, squamostolide, and their inhibitory action with bovine heat mitochondrial complex I. **Bioorg Med Chem**, v.14, p.3119-3130, 2006.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; HENRIQUES-PONS, A.; PINTO, A. V.; MORGADO-DIAZ, J. A.; SOARES, M. J.; DE CASTRO, S. L. Effect of a β -Lapachone-derived

naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. **J Antimicrob Chemother**, v.56, p.1034-1041, 2005.

MISAS, C. A. J.; HERNÁNDEZ, N. M. R.; ABRAHAM, A. M. L. Contribución a la evaluación biológica de plantas cubanas. IV. **Rev Cubana Med Trop**, v.31, p.29-35, 1979.

MIYAMOTO, S.; HUANG, T. T.; WUERZBERGER-DAVIS, S.; BORNMANN, W. G.; PINK, J. J.; TAGLIARINO, C.; KINSELLA, T. J.; BOOTHMAN, D. A. Cellular and molecular responses to topoisomerases I poisons: exploiting synergy for improved radiotherapy. **Ann NY Acad Sci**, v.922, p.274-292, 2000.

MOLYNEUX, R. J.; LEE, S. T.; GARDNER, D. R.; PANTER, K. E.; JAMES, L. F. (2007). Phytochemicals: the good, the bad and the ugly? **Phytochemistry**, v.68, p.2973-2985, 2007.

MORRISON, R. K.; BROWN, D. E.; OLESON, J. J.; COONEY, D. A. Oral toxicology studies with lapachol. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.17, p.1-11, 1970.

MORTON, J. F. Soursop. In: **Fruits of warm climates**. p.75-80, 1987. Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/soursop.html>> Acesso em: 16 jun. 2006.

MOUTSCHEN, J. **Introduction to genetic toxicology**. Chichester – New York – Brisbane – Toronto – Singapore, John Wiley & Sons, Introd., xi-xv, 1985.

MÜLLER, k.; SELLMER, A.; WIEGREBE, W. Potential antipsoriatic agents: lapacho compounds as potent inhibitors of HaCaT cell growth. **J Nat Prod**, v.62, p. 1134-1136, 1999.

PADMA, P.; PRAMOD, N. P.; THYAGARAJAN, S. P.; COSA, R. L. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus. **J Ethnopharmacol**, v.61, p.81-83, 1998.

PANTALEÃO, S. M.; ALCÂNTARA, A. V.; ALVES, J. P. H.; PAVANIN, L. A.; GRAF, U.; REZENDE, A. A. A.; VALADARES, B. L. B.; FRAGIORGE, E. J.; SOUZA, N. C.; GUTERRES, Z. R.; SPANÓ, M. A. Assessing the impact of pollution on the Apuratuba river in Brazil using the *Drosophila* wing spot test. **Environ Mol Mutagen**, v.48, p.96-105, 2007.

PARK, B-O. KIM, J-R.; LEE, S-E.; KIM, K. S.; TAKEOKA, G. R.; AHN, Y-J.; KIM, J-H. Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. **J Agricult Food Chem**, v.53, p.1152-1157, 2005.

PARK, B-O.; LEE, K-G.; SHIBAMOTO, T.; LEE, S-E.; TAKEOKA, G. R. Antioxidant activity and characterization of volatile constituents of Taheebo (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC). **J Agricult Food Chem**, v.51, p.295-300, 2003.

PARK, B-S.; LEE, H-K.; LEE, S-E.; PIAO, X-L.; TAKEOKA, G. R.; WONG, R. Y.; AHN, Y-J.; KIM, J-H. Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. **J Ethnopharmacol**, v.5, p.255-262, 2006.

PATEL, R.; MARU, G. Polymeric black tea polyphenols induce phase II enzymes via Nrf2 in mouse liver and lungs. **Free Rad Biol & Med**, v.44, p.1897-1911.

PATWARDHAN, B.; GAUTAM, M. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. **Drug Discov Today**, v.10, p. 495-502.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, P. J. M. Flora paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Bot Bras**, v.18, p.281-293, 2004.

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **J Ethnopharmacol**, v.76, p.93-98, 2001.

REINICKE, K. E.; BEY, E. A.; BENTLE, M. S.; PINK, J. J.; INGALLS, S. T.; HOPPEL, C. L.; MISICO, R. I.; ARZAC, G. M.; BURTON, G.; BORNMAMNN, W. G.; SUTTON, D.; GAO, J.; BOOTHMAN, D. A. (2005). Development of β -Lapachone prodrugs for therapy against human cancer cells with elevated NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 levels. **Clin Cancer Res**, v.11, p.3055- 3064, 2005.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A. M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Rev Bras Farmacogn**, v.15, p.65-70, 2005.

RIESER, M. J.; GU, Z-M.; FANG, X-P.; ZENG, L.; WOOD, K. V.; McLAUGHLIN, J. L. Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from seeds of *Annona muricata*. **J Nat Prod**, v.59, p.100-108, 1996.

ROBERTSON, D. G. Metabonomics in toxicology: a review. **Toxicol Sci**, v. 85, p. 809-822, 2005.

ROBINS, R.; BOLWELL, G. P. Phytochemistry and the new technologies: tackling the critical barriers to advancing systems biology. **Phytochemistry**, v.68, p. 2134-2135, 2007.

ROCHA, T. L.; EVARISTO, R. G. S.; SILVA, L. P.; SOUZA, D. S. L.; MARRA, B. M.; COSTA, P. H. A.; SÁ, M. F. G. Metabolômica – aplicações e perspectivas. Documentos, **Embrapa**, Brasília-DF. 38p. 2006. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalho/doc189.pdf>> Acesso em: 25 set. 2007.

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

RUOSLAHTI, E. How cancer spreads. **Sci Am**, v.275, p. 42-47, 1996.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y-H.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: a review. **J Nat Prod**, v.53, p.237-278, 1990.

SALIS, S. M; CRISPIM, S. M. A. Densidades de árvores listadas como ameaçadas de extinção na Bacia do Alto Paraguai. Comunicado técnico 54, Corumbá: **Embrapa**, 2006. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/COT54.pdf>> Acesso em: 03 mar. 2008.

SARIKAYA, R.; AKIR, Ş.(, Genotoxicity testing of four food preservatives and their combinations in the *Drosophila* wing spot test. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.20, p.424-430, 2005.

SCHMANDT, R.; MILLS, G. B. Genomic components of carcinogenesis. **Clin Chem**, v.39, p. 2375-2385, 1993.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. An overview of a chemistry and pharmacology of naphthoquinones with emphasis on β -Lapachone and derivatives. **Quím Nova**, v.26, p.407-416, 2003.

SILVA, R. M. G.; SOUSA, N.C.; GRAF, U.; SPANÓ, M. A. Antigenotoxic effects of crude extract from *Mandevilla velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson (Apocinaceae) on cyclophosphamide-induced micronuclei in mice and urethane-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Genet Mol Biol**, (2008). (*In press*).

SOUSA, N. C.; CARVALHO, S.; SPANÓ, M. A.; GRAF, U. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Environ Mol Mutagen**, v. 41, p. 293-299, 2003.

SRINIVASAN, P.; SUCHALATHA, S.; BABU, P. V. A.; DEVI, R. S.; NARAYAN, S.; SABITHA, K. E.; DEVI, C. S. S. Chemopreventive and therapeutic modulation of green tea polyphenols on drug metabolizing enzymes in 4-Nitroquinoline 1-oxide induced oral cancer. **Chemico-Biol Interac**, v. 172, p.224-234, 2008.

SUNDARRAO, K.; BURROWS, I.; KUDUK, M.; YI, Y. D.; CHUNG, M. H. SUH, N. J.; CHANG, I. M. Preliminary screening of antibacterial and antitumor activities of Papua New Guinean native medicinal plants. **Int J Pharmacogn**, v.31, p.3-6, 1993.

SUREBAN, S. M.; RAMALINGAM, S.; NATARAJAN, G.; MAY, R.; SUBRAMANIAM, D.; BISHNUPURI, K. S.; MORRISON, A. R.; DIECKGRAEFE, B. K.; BRACKETT, D. J.; POSTIER, R. G.; HOUCHEM, C. W.; ANANT, S. Translation regulatory factor RBM₃ is a proto-oncogene that prevents mitotic catastrophe. **Oncogene**, Abstract (2008). Disponível em: <<http://www.nature.com/onc/journal/vaop/ncurrent/abs/onc200897a.html>>. Acesso em: 27 abr. 2008.

SUTCLIFFE, J. E.; BREHM, A. Of flies and men; p53, a tumour suppressor. **FEBS Lett**, v.567, p.86-91, 2004.

TLSTY, T. D.; BRIOT, A.; GUALBERTO, A.; HALL, I.; HESS, S.; HIXON, M.; KUPPUSWAMY, D.; ROMANOV, S.; SAGE, M.; WHITE, A. Genomic instability and cancer. **Mutat Res**, v.120, p. 121-125, 1995.

TORRES, M. C. L; SOARES, N. F. F.; MAIA, J. F. Parâmetros cinéticos da Glutathione S-transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciênc Tecnol Aliment**, v.24, p.243-248, 2004.

TURNER, D. R.; DREIMANIS, M.; HOLT, D.; FIRGAIRA, F. A.; MORLEY, A. A. Mitotic recombination is an important mutational event following oxidative damage. **Mutat Res**, v.522, p.21-26, 2003.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev Bras Ciên Farm**, v.42, p.289-306, 2006.

VAN WAARDENBURG, R. C. A. M.; JONG, L. A.; van DELFT, F.; van EIJDHOVEN, M. A. J.; BOHLANDER, M.; BJORNSTI, M.; BROUWER, J.; SCHELLENS, J. H. M. Homologous recombination is a highly conserved determinant of the synergistic cytotoxicity between cisplatin and DNA topoisomerase I poisons. **Mol Cancer Ther**, v.3, p.393-402, 2004.

WARASHINA, T.; NAGATANI, Y.;NORO, T. Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, v.65, p.2003-2011, 2004.

WARASHINA, T.; NAGATANI, Y.;NORO, T. Further constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, v.66, p.589-597, 2005.

WENIGER, B.; ROUZIER, M.; DAGUILH, R.; HENRYS, D.; HENRYS, J. H.; ANTON, R. La médecine populaire dans le Plateau Central D'Haiti. 2 inventaire ethnopharmacologique. **J Ethnopharmacol**, v.17, p.13-30, 1986.

WOO, H. J.; CHOI, Y. H. Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by β -Lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity. **Int J Oncol**, v.26, p.1017-1023, 2005.

WOO, H. J.; PARK, K.; RHU, C.; LEE, W. H.; CHOI, B. T.; KIM, G. Y.; PARK, Y.; CHOI, Y. H. β -Lapachone, a quinone isolated from *Tabebuia avellanedae* induces apoptosis in HepG2 hepatoma cell line through induction of Bax and activation of caspase. **J Med Food**, v.9, p.161-168, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines: report of a WHO global survey. Geneva. P.5-9, 2005. Disponível em: <http://www.correofarmaceutico.com/documentos/190905_plantas.pdf> Acesso em: 10 jul. 2006.

WU, F.; GU, Z., ZENG, L.; ZHAO, Y. Z.; McLAUGHLIN, J. L. Additional bioactive acetogenins, anomutacin and (2,4-*trans* and *cis*)-10*R*-annonacin-A-ones, from the leaves of *Annona muricata*. **J Nat Prod**, vol.58, p.430-1437, 1995d.

WU, F.; GU, Z., ZENG, L.; ZHAO, Y. Z.; McLAUGHLIN, J. L. Muricatocins A and B, two new bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from leaves of *Annona muricata*. **J Nat Prod**, v.58, p. 902-908, 1995b.

WU, F.; GU, Z., ZENG, L.; ZHAO, Y. Z.; McLAUGHLIN, J. L. New bioactive monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins, Annomuricin C and Muricatocin C, from the leaves of *Annona muricata*. **J Nat Prod**, vol.58, p.909-915, 1995c.

WU, F.; GU, Z., ZENG, L.; ZHAO, Y. Z.; McLAUGHLIN, J. L. Two new cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins, annonomuricins A and B, from the leaves of *Annona muricata*. **J Nat Prod**, v.58, p.830-836, 1995a.

WÜRGLER, F. E.; VOGEL, E. *In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In: DE SERRES, F. J. (ed.). **Chemical mutagens, principles and methods for their detection**. Plenum Press, New York, v. 10, 1986, p.1-72.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. C. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.; CALIXTO, J. B. (ed) **Plantas Medicinais: sob a óptica da Química medicinal moderna**. ARGOS: Chapecó: ARGOS, 2001. p. 17-44.

ZAFRA-POLO, M. C.; FIGADÈRE, B.; GALLARDO, T.; TORMO, J. R.; CORTES, D. Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action. **Phytochemistry**, v.48, p.1087-1117, 1998.

ZENG, L.; WU, F-E.; OBERLIES, N. H.; McLAUGHLIN, J. L. Five new monotetrahydrofuran ring acetogenins from leaves of *Annona muricata*. **J Nat Prod**, v.59, p.1035-1042, 1996.

ZENG, L.; WU, F-W.; McLAUGHLIN, J. L. Annohexocin, a novel mono-THF acetogenin with six hydroxyls, from *Annona muricata* (Annonaceae). **Bioorg Med Chem Lett**, v.5, p.1865-1868, 1995.

ZHOU, M.; LIU, P.; JIA, W.; ZHAO, A.; QIU, M.; QIU Y.; SU, M. Evaluation of therapeutic effects of TCM based on metabolic variations. **Modern Trad Chin Med Mat Med**, v. 8, p.113-119, 2006.

ZHOU, S.; KOH, H-L.; GAO, Y.; GONG, Z.; LEE, E. J. D. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. **Life Sci**, v.74, p.935-968, 2004.

ZHU, X-F.; LIU, Z-C.; XIE, B-F.; LI, Z-M.; FENG, G-K.; XIE, H-H.; WU, S-J.; YANG, R-Z.; WEI, X-Y.; ZENG, Y-X. Involvement of caspase-3 activation in squamocin-induced apoptosis in leukemia cell line HL-60. **Life Sci**, v.70, p.1259-1269,2002.

CAPÍTULO 2

**MANUSCRIPT FOR
GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY**

Manuscript for Genetics and Molecular Biology

Antigenotoxic activity promoted by *Annona muricata* L. (Annonaceae) in *Drosophila*
wing spot test

Neila Coelho de Sousa^{1,2}, Regildo Márcio Gonçalves da Silva², Silmara de Moraes
Pantaleão², Ulrich Graf³, Mário Antônio Spanó^{2*}

¹*Universidade Federal de Goiás, Campus de Catalão, Catalão (GO), Brazil*

²*Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia,
Uberlândia (MG), Brazil*

³*Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Sciences, ETH Zurich, CH-
8603 Schwerzenbach, Switzerland*

Running title: Antigenotoxic activity of *Annona muricata*

*Send correspondence to Mário Antônio Spanó. Laboratório de Mutagênese, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Bloco D – Sala 2D52, Campus Umuarama, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil. E-mail: maspano@ufu.br

Key words: Antigenotoxicity; SMART; Somatic Mutation And Recombination Test; wing spot test

Abstract

Annona muricata L. is one of the most important cultivated species of Annonaceae in the North-Eastern states of Brazil and has been widely used in folk medicine for the treatment of several diseases. Previous studies suggested that acetogenins, identified in seeds, leaves, roots and fruit extracts may be the responsible metabolites for the biological activities. The chemotherapeutic agent doxorubicin (DXR) is widely used in genotoxicity studies as reference mutagen. The present study evaluated the genotoxic properties of *A. muricata* dry leaves powder, commercially available as an herbal supplement, using the Standard (ST) cross and the High Bioactivation (HB) cross of the wing Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. As genotoxic activity was not detected, this herbal supplement was assayed in association (cotreatment, pretreatment and posttreatment) with the chemotherapeutic agent DXR. The protective effects against DXR-induced genotoxicity were observed, suggesting that *A. muricata* may show des-mutagenic effects, depending on the particular experimental procedure. Therefore, due to the lack of information on genotoxic or antigenotoxic effects of *A. muricata* and/or of Annonaceous acetogenins, further experiments are required on dose response and appropriate combinations with chemotherapeutic drugs for a better understanding of its mechanism of action and chemoprevention.

INTRODUCTION

Natural products, such as herbs, spices and foods have been studied with respect to their biological characteristics in order to obtaining sources of new drugs of natural origin, with lack of toxicity and fewer side effects (Clark, 1996; Rates, 2001). In Brazil, different research groups have discovered new substances from plants, with pharmacological activities as well as investigated for the possible presence of mutagenic and/or genotoxic substances (Craveiro *et al.*, 1994; Varanda *et al.*, 2002). However, according to Luna *et al.* (2005), Brazil has a largest biodiversity of vegetal species in the world, but in fact, less than 5% have been evaluated to detect biologically active phytochemicals.

The Annonaceae is a family of flowering plants that is represented by about 650 species and 40 genus in the Neotropics. The centers of concentration are the Amazonian Rainforest and the Guiana's region (Ribeiro *et al.*, 1999). *Annona muricata* L. is popularly known as graviola, jaca do Pará, guanábano, guanábana, soursop, corossolier, and it is one of the most important cultivate species of Annonaceae, especially in the North-Eastern states of Brazil. The pulpy fruit of *A. muricata* is edible and consumed as juice, ice cream and jelly (Do Sacramento *et al.*, 2003).

This plant has been used in folk medicine for the treatment of protozoal diseases, as a sedative, anti-diarrheic and anti-diabetic. Trypanocidal and leishmanicidal activities have been report by the extracts from *A. muricata* (Osorio *et al.*, 2007). The literature reports that this plant also has anti-viral, anti-bacterial and high molluscicidal activities (Bories *et al.*, 1991; Dos Santos and Sant'Ana, 2001; Luna *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2006). Previous studies suggested that from this plant many acetogenins, identified in seeds, leaves, roots and fruit extracts may be the responsible metabolites for the biological activity against parasites (Chang *et al.*, 2003).

The Annonaceous acetogenins are antitumor and pesticidal agents that are found only in the plant family Annonaceae. Chemically, they are derivatives of long-chain fatty acids. Biologically, they exhibit their potent bioactivities through depletion of ATP levels via inhibiting complex I of mitochondria and inhibiting the NADH oxidase of plasma membranes of tumor cells (Alali *et al.*, 1999).

Acetogenins *cis*-corosolone and annocatalin, isolated from the leaves of *A. muricata*, exhibited significant activity in vitro cytotoxic assay in human hepatoma cell lines, Hep G2 and Hep 2,2,15 (Liaw *et al.*, 2002). Other acetogenins, especially annonacin, were toxic in vitro to dopaminergic neurons, and induced neuropathological abnormalities in rats intravenously administered with annonacin (Champy *et al.*, 2004, Bermejo *et al.*, 2005). Acetogenins are potent lipophilic inhibitors of complex I of the mitochondrial respiratory chain (Champ *et al.*, 2005; Bermejo *et al.*, 2005). It could be associated with the consumption of plants of the Annonacea family and a syndrome similar to Parkinson's disease in the Caribbean (Lannuzel *et al.*, 2006).

The anthracycline antibiotics Adriamycin® (doxorubicin - DXR) is a widely used chemotherapeutic agent with potential role of DNA synthesis inhibition, free radical formation and lipid peroxidation, DNA binding and alkylation, DNA cross-linking, interference with DNA strand separation and helicase activity, direct membrane effects, and the initiation of DNA damage via the inhibition of topoisomerase II. A critical evaluation of the mechanisms of action of DXR is presented by Gewirtz (1999).

The somatic mutation and recombination test (SMART) using wings in the fruit fly *Drosophila melanogaster* is a flexible and sensitive short-term test for the detection of genotoxicity of individual chemical compounds and complex mixtures and shows to be most suited to the detection of recombinagenic activity of genotoxic chemicals (Graf *et al.*, 1984; 1989; Graf and van Schaik, 1992; Spanó *et al.*, 2001).

The number of evidences related to use of medicinal plants and the biological effects of herbs, spices or food extracts is constantly increasing, but scientific data in terms of evaluation of the cytotoxic, genotoxic and carcinogenic effects of plants substances or extracts is missing in most cases. The aim of the present study was to evaluate the genotoxic effects of *A. muricata* dry leaves power, commercially available as an herbal supplement by Raintree Nutrition Inc. As genotoxic activity was not detected in vivo experiments, using the *D. melanogaster* wing spot test, this herbal supplement was assayed in association (cotreatment, pretreatment and posttreatment) with the chemotherapeutic agent

DXR. The protective effects against DXR-induced genotoxicity and recombination were observed.

MATERIAL AND METHODS

Chemical compounds and media

The herbal supplement Graviola (Soursop), a 100% pure finely milled *A. muricata* dry leaves powder, was obtained from Raintree Nutrition, Inc., Carson City, NV (USA). Doxorubicin (DXR) (Biorrub®), was manufactured by Lemery (Mexico City – Mexico), imported and distributed by Laboratórios Biossintética Ltda. (Taboão da Serra, SP, Brazil). Ultrapure water (18.2 MΩ) was obtained from a MilliQ system (Millipore, Vimodrone, Milan, Italy). Mashed potato flakes were obtained from Yoki Alimentos S. A. – São Bernardo do Campo, SP, Brazil.

Strains and crosses

Three *D. melanogaster* strains were used for the SMART wing assay: (i) the multiple wing hairs strain having the genetic constitution $y; mwh\ j$; (ii) the flare-3 strain with the genetic composition $flr^3/In(3LR)TM3, ri\ p^p\ sep\ I(3)89Aa\ bx^{34e}\ e\ Bd^S$; and (iii) the ORR; flare-3 strain with the genetic constitution of $ORR; flr^3/In(3LR)TM3, ri\ p^p\ sep\ I(3)89Aa\ bx^{34e}\ e\ Bd^S$. The latter strain carries chromosomes 1 and 2 from a DDT-resistant Oregon (R)R line (Dapkus and Merrel, 1977), which is characterized by an increased level of cytochrome P450 (Hällström and Blanck, 1985; Saner *et al.*, 1996). The genetic markers *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0.3) and *flare-3* (*flr*³, 3-38.8) are located on the left arm of chromosome 3. Two crosses were carried out: (1) the Standard (ST) cross, where $flr^3/In(3LR)TM3, ri\ p^p\ sep\ I(3)89Aa\ bx^{34e}\ e\ Bd^S$ females were mated with $y; mwh\ j$ males (Graf *et al.*, 1989); and (2) the High Bioactivation (HB) cross, where $ORR; flr^3/In(3LR)TM3, ri\ p^p\ sep\ I(3)89Aa\ bx^{34e}\ e\ Bd^S$ females were mated with $y; mwh\ j$ males (Graf and van Schaik, 1992). The latter cross is highly sensitive to promutagens and procarcinogens due to the increased level of cytochrome P450 presented in the $ORR; flr^3/TM3, Bd^S$ strain. Both crosses produced experimental larval progeny comprising: (i) marker-heterozygous (MH) flies ($mwh\ +/+ flr^3$) with phenotypically wild-type wings; and (ii) balancer-heterozygous (BH) flies ($mwh\ +/+ TM3, Bd^S$) with phenotypically serrate wings.

Larval feeding and experimental schedules

Eggs were collected from the two crosses over an 8-hr breeding period in culture flasks containing an agar-agar base (3% w/v) topped with a layer of fermenting live baker's yeast supplemented with sucrose.

Genotoxicity evaluation and cotreatment

Third instar larvae (72 ± 4 -hr) were collected from the two crosses and transferred to glass vials containing 1.5 g of mashed potato flakes plus herbal supplement from *A. muricata* (5.0, 10.0, 20.0 or 40.0% w/w) lightly ground in a mortar and pestle, and rehydrated with 5 mL ultrapure water (to evaluate the *A. muricata* genotoxic effects) or DXR (0.125 mg/mL) (to evaluate the *A. muricata* antigenotoxic effects). Negative (ultrapure water) and positive (DXR 0.125 mg/mL) controls were included in both experiments. Larvae were allowed to feed on the medium until completion of their larval life (~ 48 hr).

Pretreatment

Larvae (67 ± 4 -hr) were collected from the two crosses and transferred to glass vials containing 1.5 g of mashed potato flakes plus *A. muricata* (10.0, 20.0 or 40.0% w/w) lightly ground in a mortar and pestle, and rehydrated with 5 mL ultrapure water. After 5-hr of pretreatment, larvae were removed from the glass tubes, washed with ultrapure water, and transferred to glass tubes containing 1.5 g of mashed potato flakes rehydrated with 5 mL of DXR (0.125 mg/mL). Negative (ultrapure water) and positive (DXR 0.125 mg/mL) controls were included in both experiments. Larvae were allowed to feed on the medium until completion of their larval life (~48-hr).

Posttreatment

Larvae (67 ± 4 -hr) were collected from the two crosses and transferred to glass vials containing 1.5 g of mashed potato flakes rehydrated with 5 mL of DXR (0.125 mg/mL). After 5-hr of treatment, larvae were removed from the glass tubes, washed with ultrapure water, and transferred to glass tubes containing mashed potato flakes plus *A. muricata* (10.0, 20.0 and 40.0% w/w) lightly ground in a mortar and pestle, and rehydrated with 5 mL ultrapure water. Negative (ultrapure

water) and positive (DXR 0.125 mg/mL) controls were included in both experiments. Larvae were allowed to feed on the medium until completion of their larval life (~48-hr). Additional information about the feeding protocols was reviewed by Spanó et al. (2001).

Analysis of adult flies

Hatched adults flies were collected and stored in 70% ethanol. The wings of MH flies were mounted on slides in Faure's solution and examined for spots under a compound microscope at 400X magnification. The wings of BH flies were mounted and analyzed whenever a positive response was obtained in the MH progeny. A comparison of the results obtained from MH and BH flies was used to quantify the recombinagenic potential of DXR alone or DXR in combination with the herbal supplement from *A. muricata* (Frei et al., 1992; Frei and Würigler, 1995; Spanó et al., 2001).

Data evaluation and statistical analysis

The data were evaluated according to the multiple-decision procedure of Frei and Würigler (1988; 1995). The frequencies of each type of mutant clone per fly were compared with the concurrent negative control series using the conditional binomial test of Kastenbaun and Bowman (1970), with significance levels set at $\alpha=\beta=0.05$. For the analysis of the herbal supplement from *A. muricata* on DXR-induced genotoxicity, the data were evaluated according to the Mann-Whitney nonparametric *U*-test and Wilcoxon rank sum test (Frei and Würigler, 1995).

Based on the control-corrected frequencies of clone formation per 10^5 cells, the percentages of inhibition by *A. muricata* were calculated as follows: genotoxin alone – genotoxin plus *A. muricata*/genotoxin alone x 100 (Abraham, 1994).

RESULTS AND DISCUSSION

The dry leaves powder from *A. muricata* was assayed in somatic cells of the *Drosophila* wing imaginal disk, by feeding of larvae derived from ST cross and HB cross. The HB cross is characterized by a constitutively increased level of cytochrome P450 which make the *Drosophila* SMART more sensitive for the detection of promutagens and procarcinogens (Graf and Singer, 1992; Graf and van Schaik, 1992). All experiments were performed in duplicate. Since no statistical differences were found between the results of individuals experiments, the data were pooled. To assess the statistical significance of the frequency of mutant spots observed between flies treated with *A. muricata* alone, the results were compared with the data from the corresponding negative controls. To assess the statistical significance of the frequency of mutant spots observed between flies from the cotreated, pretreated or posttreated series, the results were compared with the data from the corresponding positive controls.

Genotoxicity evaluation and cotreatment

In a first approach was investigated the genotoxic activity of *A. muricata*. Tables 1 and 2 present, respectively, the frequencies of mutant spots observed in the MH descendants (genotype *mwh/flr³*) from the ST cross and HB cross treated with *A. muricata* dry leaves powder alone, with the reference mutagen alone (DXR 0.125 mg/mL) (positive control), and with ultrapure water (negative control). The four concentrations of *A. muricata* (5.0, 10.0, 20.0 or 40.0% w/w) alone had no significant effect on the frequencies of any category of spots (small single, large single, twins or total spots) in both crosses, with exception of one positive result observed with small single spots for *A. muricata* 10% in HB cross.

The positive control DXR is a direct-acting mutagen that produced statistically significant induction of all categories of spots in MH individuals of both ST and HB crosses. As positive responses were obtained in the MH progeny, the wings of BH flies (genotype *mwh/TM3*) were also mounted and analyzed. The positive control DXR produced statistically significant induction of all categories of spots in BH individuals of both ST and HB crosses, except for small single spots in BH individuals of HB cross.

In MH descendants, single spots (mostly *mwh* but occasionally also *flr³*) can result from point mutations, chromosomal aberrations, or recombination. Twin spots (*mwh* and *flr³*) are produced by mitotic recombination between the proximal marker *flr³* and the centromere of chromosome 3. In BH descendants, only *mwh* single spots can be recovered (Graf *et al.*, 1984). Based on the frequencies of the *mwh* clones, the clone formation frequencies per cell and cell division without and with correction for control frequencies were calculated (Tables 1 and 2). A comparison of these clone formation frequencies can be used to quantify the recombinagenic activity of the tested substance (Frei *et al.*, 1992; Frei and Würzler, 1995; Spanó *et al.*, 2001). The recombinagenic activity of DXR was over 95% in both crosses. These data are in good agreement with previous observations that also demonstrated that DXR is a preferential inducer of homologous recombination when compared with mutational events in *D. melanogaster* somatic cells (Lehmann *et al.*, 2003; Fragiorge *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008; Valadares *et al.*, 2008).

The negative results observed with *A. muricata* in the somatic cells of *D. melanogaster* prompt us to study this herbal supplement in association with the reference mutagen DXR.

To evaluate the statistical significance of cotreatments, the results of the different *A. muricata* concentrations in association with DXR were compared with the positive control. The results shown in Tables 1 and 2 indicate that, in the MH descendants, cotreatments conducted with *A. muricata* and DXR produced responses that were significantly lower than those produced by DXR alone. The protective effects were not dose-related. The percentages of inhibition ranged from ~47.0 (for *A. muricata* 40.0%) to ~73.0% (for *A. muricata* 20.0%) in ST cross and from ~23.0 (for *A. muricata* 10.0%) to ~68.0% (for *A. muricata* 20.0%) in HB cross. Nevertheless, comparisons of the clone formation frequencies obtained in cotreated series showed that the percentages of recombination still remain elevated, ranging from ~91.0% (for *A. muricata* 10.0%) to ~96.0% (for *A. muricata* 5.0%) in the ST cross and ranging from ~88.0% (for *A. muricata* 20.0%) to ~94.0% (for *A. muricata* 10.0%) in the HB cross.

The mechanisms used by *A. muricata* to inhibit the genotoxicity of DXR were not analysed directly in the present study. Nevertheless, one feasible

mechanism of *A. muricata* metabolites action is its interaction with the enzyme systems catalyzing the activation of DXR. Similar results were obtained by Lehmann *et al.* (2000) with tannic acid (TA) on the genotoxicity of mytomicin C (MMC) and the same line of argument was applied to explain the protective effect of TA in relation of MMC. So, when present during DXR exposure, *A. muricata* may have a desmutagenic effect. According to Hartman and Shankel (1990), “desmutagens” or “interceptors” are biologically prevalent or synthetic molecules that are most often small metabolites proficient in binding to, or reacting with, mutagenic chemicals and free radicals. Many of this class of “blocking agents” are “soft” and “hard” nucleophiles with consequently varying abilities to react with particular class of electrophiles, the major classes of direct-acting mutagens.

Pretreatment

To evaluate the statistical significance of pretreatments with *A. muricata*, the results were compared with the respective positive control (DXR). The results shown in Table 3 indicate a significant protective effect of a 5h pretreatment on the frequency of all types of spots in MH individuals from the ST cross and HB cross, with the exception of small single spots frequency of the pretreatment with *A. muricata* 40.0% in ST cross. The protective effects of *A. muricata* against the genotoxicity of DXR were not dose-related. The percentages of inhibition ranged from ~53.0 (for *A. muricata* 40.0%) to ~93.0% (for *A. muricata* 20.0%) in ST cross and from ~44.0 (for *A. muricata* 20.0%) to ~81.0% (for *A. muricata* 40.0%) in HB cross. Comparisons of the clone formation frequencies obtained in pretreated series showed that the percentages of recombination also remain elevated, ranging from ~72.0% (for *A. muricata* 20.0%) to ~90.0% (for *A. muricata* 40.0%) in the ST cross and ranging from ~71.0% (for *A. muricata* 40.0%) to ~86.0% (for *A. muricata* 20.0%) in the HB cross.

Similar results were obtained by Costa and Nepomuceno (2006) in 4-hr pretreatments of *Drosophila* larvae with a mixture of antioxidant vitamins and minerals (MV) and furthermore treated with DXR. The explanation presented by the authors was that, for the pretreatment effect, the cytochrome P450 enzymes were inhibited by MV causing a reduction in the bioactivity of DXR. Although DXR is considered a direct-acting mutagen, it is a useful antineoplastic drug with

multiple mechanisms of cytotoxicity. One such mechanism involves the reductive bioactivation of the quinone ring to a semiquinone radical, which can exert direct toxic effects and/or undergo redox cycling (Ramji *et al.*, 2003). The same line of argument could also be applied in the present study to explain the protective effect of *A. muricata* pretreatments.

Posttreatment

To evaluate the statistical significance of posttreatments with *A. muricata*, the results were compared with the positive control DXR. The results shown in Table 4 indicate a significant protective effect of a ~48-hr posttreatment on the frequency of small single spots for all concentrations of *A. muricata*; twin spots for *A. muricata* 40.0%; and total spots for *A. muricata* 10.0 and 40.0% in MH individuals from the ST cross. The protective effects of *A. muricata* against the genotoxicity of DXR were not dose-related. The percentage of inhibition was ~15.0% (for *A. muricata* 10.0 and 40%). Comparisons of the clone formation frequencies obtained in posttreated series showed that the percentages of recombination also remain elevated (~92.0%).

In the HB cross was observed an inducing effect on the frequency of small single spots for *A. muricata* 10.0%; a significant protective effect on the frequency of twin spots for all concentrations of *A. muricata*; and a significant protective effect on the frequency of total spots for *A. muricata* 20.0 and 40.0%. The protective effects of *A. muricata* against the genotoxicity of DXR were not dose-related. The percentage of inhibition ranged between ~17.0 – 23.0% (for *A. muricata* 40.0 and 20.0%, respectively). Comparisons of the clone formation frequencies obtained in posttreated series showed that the percentages of recombination ranged from 88.0 to 93.0%.

Comparatively to the cotreated and pretreated series, a lesser inhibitory effect was observed in the posttreated series.

When *A. muricata* was administered after DXR exposure, it may have a weak bio-antimutagenic effect. According to Hartman and Shankel (1990), the antimutagenesis may be effected by many levels, among them are the neutralization of premutagenic or mutagenic lesions by chemical compounds or by various DNA repair mechanisms that remove or circumvent lesions; and utilization

of mechanisms that enhance induction of error-free DNA repair, block error-prone DNA repair, or increase the metabolic inactivation of mutagens.

CONCLUSIONS

Overall, the results demonstrate that *A. muricata* by itself was nongenotoxic in MH descendants of both ST cross and HB cross. However, combined treatments (cotreatments, pretreatment and posttreatment) of DXR with *A. muricata* display an inhibitory effect on the incidence of mutant spots. We concluded that since toxic effect was not detected in all experimental series, these inhibitory results may be interpreted as antigenotoxic effects of *A. muricata*, which show des-mutagenic or may show bio-antimutagenic effects (weak effect), depending on the particular experimental procedure. Therefore, due to the lack of information on genotoxic or antigenotoxic effects of *A. muricata* and/or of Annonaceous acetogenins, further experiments are required on dose response, appropriate combinations with chemotherapeutic drugs for a better understanding of its mechanism of action and chemoprevention.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

REFERENCES

- Abraham SK (1994) Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis* 9: 383-386.
- Alali FQ, Liu X-X and McLaughlin, JL (1999) Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *J Nat Prod* 62:504-540.
- Bermejo A, Figadère B, Zafra-Polo M-C, Barrachina I, Estornell E and Cortes D (2005) Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod Rep* v.22, p.269-303.
- Bories C, Loiseau P, Cortes D, Myint SH, Hocquemiller R, Gayaral P, Cavé A and Laurens A (1991) Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. *Planta Med* v.57, p.434-436.
- Chang F-R, Liaw C-C, Lin C-Y, Chou C-J, Chiu H-F, Wu Y-C. (2003) New Adjacent Bis-Tetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona muricata*. *Planta Med* v. 69, p. 241-246.
- Champy P, Höglinger GU, Féger J, Gleve C, Hocquemiller R, Laurens A, Guérineau V, Laprévotte O, Medja F, Lombés A, Michel PP, Lannuzel A, Hirsch EC and Ruberg M. (2004) Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *J Neurochem* 88: 63-69.
- Champy P, Melot A, Guérineau V, Gleye C, Fall D, Hoglinger GU, Ruberg M, Lannuzel A, Laprevotte O, Laurens A, Hocquemiller R (2005) Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Mov Disorders* 20: 1629-1633.
- Clark AM (1996) Natural products as a resource for new drugs. *Pharm Res* 13: 1133-1144.
- Costa WF and Nepomuceno JC (2006) Protective effects of a mixture of antioxidant vitamins and minerals on the genotoxicity of Doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 47: 18-24.
- Craveiro AA, Machado MI, Alencar JW and Matos FJ (1994) Natural product chemistry in north-eastern Brazil. *Ciba Found Symp* 185: 95-102.

- Dapkus J. and Merrell DJ (1977) Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 87:685-697.
- Do Sacramento CK, Faria JC, Da Cruz FL, Barreto WS, Gaspar JW and Leite JBV (2003) Caracterização física e química de frutos de três tipos de gravioleira (*Annona muricata* L.). *Rev Bras Frutic* 25: 329-331.
- Dos Santos AF and Sant'Ana AEG (2001) Molluscicidal properties of some species of *Annona*. *Phytomedicine* 8: 115-120.
- Fragiorge EJ, Spanó MA and Antunes LMG (2007) Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Gen Mol Biol* 30:449-455.
- Frei H and Würgler FE (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat Res* 203: 297-308.
- Frei H and Würgler FE (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat Res* 334: 247-258.
- Frei H, Clements J, Howe D and Würgler FE (1992) The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 279:21-33.
- Gewirtz DA (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics Adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57: 727-741.
- Graf U and Singer D (1992) Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev Int Contam Ambient* 8:15-27.
- Graf U and van Schaik N (1992) Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 271: 59-67.
- Graf U, Frei H, Kägi A, Katz AJ and Würgler FE (1989) Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 222:359-373.

- Graf U, Würigler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB and Kale PG (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ Mutagen 6:153-188.
- Hällström I and Blank A (1985) Genetic regulation of the cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosomal determination of some cytochrome P-450-dependent reactions. Chem Biol Interact 56:151-171.
- Hartman PE and Shankel DM (1990) Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. Environ Mol Mutagen 15:145-182.
- Kastenbaum MA and Bowman KO (1970) Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutat Res 9: 527-549.
- Lannuzel L, Höglinger GU, Champy P, Michel PP, Hirsch EC and Ruberg M (2006) Is atypical parkinsonism in the Caribbean caused by the consumption of Annonaceae? J Neural Transm Suppl 70: 153-157.
- Lehmann M, Franco A, Vilar KSP, Reguly ML and Andrade HHR (2003) Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Mutat Res 539:167-175.
- Lehmann M, Graf U, Reguly ML and Andrade HHR (2000) Interference of tannic acid on the genotoxicity of mytomycin C, methylmethanesulfonate, and nitrogen mustard in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Environ Mol Mutagen 36:195-200.
- Liaw CC, Chang FR, Lin CY, Chou CJ, Chiu HF, Wu MJ and Wu YC (2002) New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. J Nat Prod 65: 470-475.
- Luna JS, De Carvalho JM, De Lima MR, Bieber LW, Bento ES, Franck X and Sant'Ana AE (2006) Acetogenins in *Annona muricata* L. (annonaceae) leaves are potent molluscicides. Nat Prod Res 20: 253-257.
- Luna JS, Dos Santos AF, De Lima MR, De Omena MC, De Mendonça FA, Bieber LW and Sant'Ana AE (2005) A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. J Ethnopharmacol 28: 199-206.

- Osório E, Arango GJ, Jiménez N, Alzate F, Ruiz G, Gutiérrez D, Paco MA, Gimenez A and Robledo S (2007) Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *J Ethnopharmacol* 22: 630-635.
- Pereira DG, Antunes LMG, Graf U and Spanó MA (2008) Protective effects of *Panax ginseng* C.A. Meyer on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Biol* (in press).
- Ramji S, Lee C, Inaba T, Patterson AV and Riddick DS (2003) Human NADPH-Cytochrome P450 reductase overexpression does not enhance the aerobic cytotoxicity of Doxorubicin in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 63: 6914-6919.
- Rates SM (2001) Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-613.
- Ribeiro JELS, Hopkins MJG, Vicentini A, Sothers CA, Costa MAS, Brito JM, Souza MAD, Martins LHP, Lohmann LG, Assunção B, Pereira EC, Silva CF, Mesquita MR and Procópio LC (1999) Flora da reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Ed. INPA, Manaus, 816 p.
- Saner C, Weibel B, Würzler FE, Sengstag C (1996) Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Mol Mutagen* 27:46-58.
- Spanó MA, Frei H, Würzler FE and Graf U (2001) Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* 16: 385-394.
- Takahashi JÁ, Pereira CR, Pimenta LP, Boaventura MA and Silva LG (2006) Antibacterial activity of eight Brazilian annonaceae plants. *Nat Prod Res* 20: 21-26.
- Valadares BLB, Graf U and Spanó MA (2008) Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol* 46:1103-1110.
- Varanda EA, Pozetti GL, Lourenço MV, Vilegas W and Raddi MS (2002) Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. *J Ethnopharmacol* 81: 257-64.

TABLE 1. Summary of Results Obtained with the *Drosophila* Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny of the Standard (ST) Cross after Chronic Treatment of Larvae with *Annona muricata* (*Am*) and Doxorubicin (DXR)

Genotypes and treatments		Number of flies	Spot for fly (number of spots) statistical diagnosis ^a				Spots with <i>mwh</i> clone ^b (<i>n</i>)	Frequency of clone formation/10 ⁵ cells ^c		Recombination (%)	Inhibition ^d (↓) or induction ^d (↑) (%)
DXR (mg/mL)	<i>Am</i> (%)		Small single spots (1-2 cells) ^e <i>m</i> = 2	Large single spots (>2 cells) ^e <i>m</i> = 5	Twin spots <i>m</i> = 5	Total spots <i>m</i> = 2		Observed	Control corrected		
<i>mwh/flr³</i>											
0	0	60	0.28 (17)	0.08 (5)	0.03 (2)	0.40 (24)	23	0.79			
0	5.0	60	0.42 (25) ns	0.08 (5) ns	0.03 (2) ns	0.53 (32) ns	32	1.09	0.31		
0	10.0	60	0.33 (20) ns	0.05 (3) ns	0.00 (0) ns	0.38 (23) ns	23	0.79	0.00		
0	20.0	60	0.30 (18) ns	0.13 (8) ns	0.03 (2) ns	0.47 (28) ns	28	0.96	0.17		
0	40.0	60	0.30 (18) ns	0.02 (1) ns	0.08 (5) ns	0.40 (24) ns	23	0.79	0.00		
0	0	40	0.30 (12)	0.05 (2)	0.03 (1)	0.038 (15)	14	0.72			
0.125	0	40	10.68 (427) +	60.78 (271) +	9.68 (387) +	27.13 (1085) +	1039	53.23	52.51	95.08	
0.125	5.0	40	3.93 (157) *	2.88 (115) *	4.28 (171) *	11.08 (443) *	421	21.57	20.85	60.29 ↓	
0.125	10.0	40	2.75 (110) *	2.93 (117) *	3.70 (148) *	9.38 (375) *	352	18.03	17.32	67.01 ↓	
0.125	20.0	40	2.10 (84) *	2.48 (99) *	3.43 (137) *	8.00 (320) *	290	14.86	14.14	73.07 ↓	
0.125	40.0	40	4.18 (167) *	3.95 (158) *	6.33 (253) *	14.45 (578) *	555	28.43	27.72	47.21 ↓	
<i>mwh/TM3</i>											
0	0	40	0.25 (10)	0.00 (0)	f	0.25 (10)	10	0.51			
0.125	0	40	0.80 (32) +	0.48 (19) +		1.28 (51) +	51	2.61	2.10		
0.125	5.0	40	0.35 (14) *	0.05 (2) *		0.40 (16) *	16	0.82	0.31	85.24 ↓	
0.125	10.0	39	0.72 (28) ns	0.03 (1) *		0.74 (29) *	29	1.52	1.01	51.90 ↓	
0.125	20.0	38	0.34 (13) *	0.03 (1) *		0.34 (14) *	14	0.75	0.24	88.57 ↓	
0.125	40.0	38	0.66 (25) ns	0.13 (5) *		0.79 (30) *	30	1.62	1.11	47.14 ↓	

Marker-trans-heterozygous (MH) flies (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous (BH) flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würigler (1995). *U*-test, two-sided, probability levels: +, $P \leq 0.05$ vs. untreated control; *, $P \leq 0.05$ vs. DXR only; ns, not significant.

^bConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^cFrequency of clone formation: clones/flies/48,800 cells (without size correction).

^dCalculated as [DXR alone – (DXR + *Am*) / DXR alone] X 100, according to Abraham (1994).

^eIncluding rare *flr³* single spots.

^fOnly *mwh* single spot can be observed in balancer-heterozygous individuals.

TABLE 2. Summary of Results Obtained with the *Drosophila* Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny of the High Bioactivation (HB) Cross after Chronic Treatment of Larvae with *Annona muricata* (*Am*) and Doxorubicin (DXR)

Genotypes and treatments		Number of flies	Spot for fly (number of spots) statistical diagnosis ^a				Spots with <i>mwh</i> clone ^b (<i>n</i>)	Frequency of clone formation/10 ⁵ cells ^c		Recombination (%)	Inhibition ^d (↓) or induction ^d (↑) (%)
DXR (mg/mL)	<i>Am</i> (%)		Small single spots	Large single spots	Twin spots	Total spots		Observed	Control Corrected		
			(1-2 cells) ^e <i>m</i> = 2	(>2 cells) ^e <i>m</i> = 5	<i>m</i> = 5	<i>m</i> = 2					
<i>mwh/flr³</i>											
0	0	55	0.58 (32)	0.11 (6)	0.05 (3)	0.75 (41)	41	1.53			
0	5.0	55	0.53 (29) -	0.18 (10) ns	0.05 (3) ns	0.76 (42) ns	42	1.56	0.04		
0	10.0	60	0.92 (55) +	0.08 (5) ns	0.07 (4) ns	1.07 (64) ns	64	2.19	0.66		
0	20.0	55	0.84 (46) ns	0.15 (8) ns	0.02 (1) ns	1.00 (55) ns	55	2.05	0.52		
0	40.0	60	0.83 (50) ns	0.13 (8) ns	0.07 (4) ns	1.03 (62) ns	60	2.05	0.52		
0	0	40	0.85 (34)	0.10 (4)	0.00 (0)	0.95 (38)	37	1.90			
0.125	0	36	3.42 (123) +	9.14 (329) +	11.94 (430) +	24.50 (882) +	803	45.71	43.81	95.33	
0.125	5.0	40	4.08 (163) ns	4.43 (177) *	7.25 (290) *	15.75 (630) *	606	31.05	29.15	93.53	
0.125	10.0	40	4.63 (185) *	5.60 (224) *	8.00 (320) *	18.23 (729) *	693	35.50	33.61	94.05	
0.125	20.0	40	2.60 (104) *	2.17 (87) *	3.50 (140) *	8.28 (331) *	313	16.03	14.14	88.49	
0.125	40.0	40	3.15 (126) ns	2.18 (87) *	3.53 (141) *	8.85 (354) *	339	17.37	15.74	89.84	
<i>mwh/TM3</i>											
0	0	38	0.55 (21)	0.00 (0)	f	0.55 (21)	21	1.13			
0.125	0	25	0.72 (18) ns	0.32 (8) +		1.04 (26) +	26	2.13	1.00		
0.125	5.0	40	0.85 (34) ns	0.13 (5) ns		0.98 (39) ns	39	2.00	0.87		
0.125	10.0	40	0.83 (33) ns	0.20 (8) ns		1.03 (41) ns	41	2.10	0.97		
0.125	20.0	39	0.82 (32) ns	0.08 (3) +		0.90 (35) ns	35	1.84	0.71		
0.125	40.0	37	0.65 (24) ns	0.22 (8) ns		0.86 (32) ns	32	1.77	0.64		

Marker-trans-heterozygous (MH) flies (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous (BH) flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würigler (1995). *U*-test, two-sided, probability levels: +, $P \leq 0.05$ vs. untreated control; *, $P \leq 0.05$ vs. DXR only; ns, not significant.

^bConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^cFrequency of clone formation: clones/flies/48,800 cells (without size correction).

^dCalculated as [DXR alone – (DXR + *Am*) / DXR alone] X 100, according to Abraham (1994).

^eIncluding rare *flr³* single spots.

^fOnly *mwh* single spot can be observed in balancer-heterozygous individuals.

TABLE 3. Summary of Results Obtained with the Drosophila Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny in Pretreatment of Larvae with *Annona muricata* (*Am*) and Treatment Chronic with Doxorubicin (DXR)

Genotypes and treatments		Number of flies	Spot for fly (number of spots) statistical diagnosis ^a				Spots with <i>mwh</i> clone ^b (<i>n</i>)	Frequency of clone formation/10 ⁵ cells ^c		Recombination (%)	Inhibition ^d (↓) or induction ^d (↑) (%)
			Small single spots (1-2 cells) ^e <i>m</i> =2	Large single spots (>2 cells) ^e <i>m</i> =5	Twin spots <i>m</i> =5	Total spots <i>m</i> =2		Observed	Control corrected		
ST cross <i>mwh/flr</i> ³											
0	0	60	0.63 (38)	0.08 (5)	0.05 (3)	0.77 (46)	46	1.57			
0.125	0	60	1.32 (79) +	1.47 (88) +	2.42 (145) +	5.20 (312) +	293	10.01	8.44	84.43	
0.125	10.0	55	0.69 (38) *	0.44 (24) *	0.51 (28) *	1.64 (90) *	88	3.28	1.71	78.13	79.74 ↓
0.125	20.0	57	0.65 (37) *	0.21 (12) *	0.21 (12) *	1.07 (61) *	60	2.16	0.59	71.97	93.00 ↓
0.125	40.0	60	1.18 (71) ns	0.57 (34) *	0.97 (58) *	2.72 (163) *	160	5.46	3.97	90.23	52.96 ↓
<i>mwhTM3</i>											
0	0	50	0.22 (11)	0.00 (0)	F	0.22 (11)	11	0.45			
0.125	0	50	0.52 (26) +	0.24 (12) +		0.76 (38) +	38	1.56	1.11		
0.125	10.0	49	0.35 (17) ns	0.00 (0) *		0.35 (17) *	17	0.71	0.26		76.57 ↓
0.125	20.0	50	0.30 (15) ns	0.00 (0) *		0.30 (15) *	15	0.61	0.16		85.58 ↓
0.125	40.0	50	0.24 (12) *	0.02 (1) *		0.26 (13) *	13	0.53	0.08		92.79 ↓
HB cross <i>mwh/flr</i> ³											
0	0	57	0.91 (52)	0.11 (6)	0.04 (2)	1.05 (60)	59	2.12			
0.125	0	60	2.82 (169) +	1.90 (114) +	2.82 (169) +	7.53 (452) +	440	15.03	12.91	84.18	
0.125	10.0	60	1.40 (84) *	0.47 (28) *	0.78 (47) *	2.65 (159) *	157	5.36	3.24	73.18	74.90 ↓
0.125	20.0	60	1.92 (115) *	0.97 (58) *	1.82 (109) *	4.70 (282) *	274	9.36	7.24	86.41	43.92 ↓
0.125	40.0	60	1.33 (80) *	0.38 (23) *	0.52 (31) *	2.23 (134) *	133	4.54	2.42	71.04	81.25 ↓
<i>mwhTM3</i> ³											
0	0	50	0.48 (24)	0.02 (1)	f	0.50 (25)	25	1.02			
0.125	0	50	1.10 (55) +	0.06 (3) ns		1.6 (58) +	58	2.38	1.35		
0.125	10.0	50	0.70 (35) *	0.00 (0) ns		0.70 (35) *	35	1.43	0.41		69.63 ↓
0.125	20.0	50	0.56 (28) *	0.06 (3) ns		0.62 (31) *	31	1.27	0.25		81.48 ↓
0.125	40.0	50	0.60 (30) *	0.04 (2) ns		0.64 (32) *	32	1.31	0.29		78.52 ↓

Marker-trans-heterozygous (MH) flies (*mwh/flr*³) and balancer-heterozygous (BH) flies (*mwhTM3*) were evaluated.

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würzler (1995). *U*-test, two-sided, probability levels: +, $P \leq 0.05$ vs. untreated control; *, $P \leq 0.05$ vs. DXR only; ns, not significant.

^bConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^cFrequency of clone formation: clones/flies/48,800 cells (without size correction).

^dCalculated as $[(DXR \text{ alone} - (DXR + Am)) / DXR \text{ alone}] \times 100$, according to Abraham (1994).

^eIncluding rare *flr*³ single spots.

^fOnly *mwh* single spot can be observed in balancer-heterozygous individuals.

TABLE 4. Summary of Results Obtained with the *Drosophila* Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) Progeny in Acute Treatment (5-hr) with doxorubicin (DXR) and Chronic Posttreatment of Larvae with *Annona muricata*

Genotypes and treatments		Number of flies	Spot for fly (number of spots) statistical diagnosis ^a				Spots with <i>mwh</i> clone ^b (<i>n</i>)	Frequency of clone formation/10 ⁵ cells ^c		Recombination (%)	Inhibition ^d (↓) or induction ^d (↑) (%)
			Small single spots (1-2 cells) ^e <i>m</i> = 2	Large single spots (>2 cells) ^e <i>m</i> = 5	Twin spots <i>m</i> = 5	Total spots <i>m</i> = 2		Observed	Control corrected		
DXR (mg/mL)	<i>Am</i> (%)										
ST cross											
<i>mwh/flr³</i>											
0	0	52	0.71 (37)	0.12 (06)	0.02 (01)	0.85 (44)	44	1.73			
0.125	0	52	2.19 (114) +	2.31 (120) +	4.67 (243) +	9.17 (477) +	441	17.38	15.64	90.95	
0.125	10.0	52	1.46 (76) *	2.38 (124) ns	4.04(210) ns	7.88 (410) *	380	14.97	13.24	92.01	15.34 ↓
0.125	20.0	52	1.4 (73) *	2.63 (137) ns	4.44(231) ns	8.48 (441) ns	408	16.08	14.34	-	-
0.125	40.0	52	1.69 (88) *	1.98 (103) ns	3.87(201)*	7.54 (392) *	379	14.94	13.20	92.31	15.60 ↓
<i>mwh/TM3</i>											
0	0	40	0.33 (13)	0.00 (0)	f	0.33 (13)	13	0.67			
0.125	0	40	0.68 (27) +	0.15 (6) +		0.83 (33) +	33	1.69	1.02		
0.125	10.0	40	0.53 (21) ns	1.10 (4) ns		0.63 (25) ns	25	1.28	0.61		
0.125	40.0	40	0.45 (18) ns	0.13 (5) ns		0.58 (23) ns	23	1.18	0.98		
HB cross											
<i>mwh/flr³</i>											
	0	52	0.48 (25)	0.12 (6)	0.06 (3)	0.65 (34)	34	2.03			
0.125	0	52	1.13 (59) +	2.31 (120) +	3.98 (207) +	7.42 (386) +	367	14.46	13.12	92.86	
0.125	10.0	52	1.90 (99) *	2.56 (133) ns	2.87 (149) *	6.56 (381) ns	363	14.30	12.97	-	-
0.125	20.0	52	1.08 (56) ns	2.02 (105) ns	2.87 (149) *	5.96 (310) *	289	11.39	10.05	88.00	23.40 ↓
0.125	40.0	52	1.21 (63) ns	1.98 (103) ns	3.21 (167) *	6.40 (333) *	309	12.18	10.84	93.00	17.37 ↓
<i>mwh/TM3³</i>											
0	0	40	0.15 (6)	0.00 (0)	f	0.15 (6)	6	0.31			
0.125	0	40	0.35 (14) ns	0.18 (7) +		0.53 (21) +	21	1.08	0.77		
0.125	20.0	40	0.63 (25) ns	0.18 (7) ns		0.80 (32) ns	32	1.64	1.33		
0.125	40.0	40	0.30 (12) ns	0.15 (6) ns		0.45 (18) ns	18	0.92	0.61		

Marker-trans-heterozygous (MH) flies (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous (BH) flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würigler (1995). *U*-test, two-sided, probability levels: +, $P \leq 0.05$ vs. untreated control; *, $P \leq 0.05$ vs. DXR only; ns, not significant.

^bConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^cFrequency of clone formation: clones/flies/48,800 cells (without size correction).

^dCalculated as [DXR alone – (DXR + *Am*) / DXR alone] X 100, according to Abraham (1994).

^eIncluding rare *flr³* single spots. ^f Only *mwh* single spot can be observed in balancer-heterozygous individuals.

CAPÍTULO 3

**MANUSCRIPT FOR
GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY**

Manuscript for Genetics and Molecular Biology

Modulatory effects of the *Tabebuia impetiginosa* (Martius ex DC) Standley on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*

Neila Coelho de Sousa^{1,2}, Alexandre Azenha Alves de Rezende²; Bruno Lassmar Bueno Valadares²; Zaira da Rosa Guterres², Ulrich Graf³, Mário Antônio Spanó^{2*}

¹*Universidade Federal de Goiás, Campus Catalão, Catalão (GO), Brazil*

²*Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia (MG), Brazil*

³*Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Sciences, ETH Zurich, CH-8603 Schwerzenbach, Switzerland*

Running title: Modulatory effects of *Tabebuia impetiginosa*

*Send correspondence to Mário Antônio Spanó. Laboratório de Mutagênese, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Bloco D – Sala 2D52, Campus Umuarama, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil.

E-mail: maspano@ufu.br

Key words: Genotoxicity; synergistic effect; Somatic Mutation And Recombination Test - SMART; toxicity; wing spot test

ABSTRACT

The wing Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) in *D. melanogaster* was used to study the genotoxicity of the medicinal plant *Tabebuia impetiginosa*. Lapachol (naphthoquinone) and β -lapachone (quinone) are the two main chemical constituents of *T. impetiginosa*. These compounds have several biological properties, induce apoptosis by generating oxygen-reactive species, inhibiting topoisomerases (I and II) or inducing other enzymes dependent on NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, and affecting the cell cycle checkpoints. The SMART was used in the standard (ST) version, which has normal levels of cytochrome P450 (CYP) enzymes, to check the compound direct action; and in the high bioactivation (HB) version, which has high constitutive level of CYP enzymes, to check indirect action, in three different *T. impetiginosa* concentrations (10.0, 20.0 or 40% w/w). It was observed that *T. impetiginosa* alone did not modify the spontaneous frequencies of mutant spots in both crosses. The negative results observed prompt us to study this phytotherapeuticum in association with the reference mutagen doxorubicin (DXR). In cotreated series, *T. impetiginosa* was toxic in both crosses at the higher concentration and in the HB cross induced a considerable potentiating effect (from ~24.0 to ~95.0%) on the genotoxicity of DXR, suggesting that it may possess an anticarcinogenic potential. Therefore, further research is needed to determine the possible risks that could be associated with the exposure of living organisms to this complex mixture.

INTRODUCTION

Tabebuia impetiginosa (Martius ex DC) Standley (Bignoniaceae), popularly known as Ipê, pau d'arco, pink trumpet tree, taheebo and lapacho rosado is a medicinal plant native to tropical rain forests and cerrado (savannah) throughout Central and South America. *T. impetiginosa* is used in construction works for external structures, stairs and parquets (Algranti *et al.*, 2005). This plant has also been used in folk medicine as a diuretic, astringent, for treating ulcers, syphilis, gastrointestinal problems, candidiasis, cancer, diabetes, prostatitis, constipation and allergies (Almeida, 1993; Park *et al.*, 2003).

The bark of the *Tabebuia spp* stem is a source of furanonaphthoquinones, quinines, naphthoquinones, benzoic acid, benzaldehyde derivatives, cyclopentene dialdehyde and flavonoids (Zani *et al.*, 1991; Koyama *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2003). Further constituents from the bark of *T. impetiginosa* are iridoid glycosides, lignan glycosides, isocoumarin glycosides, phenylethanoid glycosides and phenolic glycosides (Warashina *et al.*, 2004; 2005; 2006). Lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthalene-dione], naphthoquinone and its derivative β -Lapachone (2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2,4-benzo[h]chromene-5,6-dione), can be isolated from *T. impetiginosa* and possess biologically active properties (Park *et al.*, 2003). The *T. impetiginosa* inner bark extract potently inhibited cell proliferation and DNA synthesis (Son *et al.*, 2006). The stereoselective synthesis of biologically active naphthoquinones from *Tabebuia avellanedae*, which displayed potent cytotoxicity against several human tumor cell lines, whereas it showed lower cytotoxicity against some human normal cell lines compared with that of mitomycin, was described by Yamashita *et al.* (2007). A synthetic version of the natural product β -lapachone has been isolated from the *T. impetiginosa* and has also demonstrated promising anticancer activity (Savage *et al.*, 2008).

The *T. impetiginosa* bark compounds lapachol and β -lapachone are reportedly antipsoriatic, antifungal, antimicrobial, antioxidant, antiviral, antiinflammatory, antiulcerogenic, anticarcinogenic, antibacterial, antimalarial, possessing antitrypanosomal activity and acting as a chemoprophylactic against infection by *Schistosoma mansoni* cercariae (Anesini & Perez, 1993; Müller *et al.*,

1999; Fonseca *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003, 2005, 2006; Menna-Barreto *et al.*, 2005). An overview on Lapachol is presented by Hussain *et al.* (2007).

The anthracycline antibiotic doxorubicin is a topoisomerase II inhibitor (Swift *et al.*, 2008) and generator of oxygen-free radicals (Doroshov, 1983). Previous studies have shown that DXR induce preferentially homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *D. melanogaster* (Lehmann *et al.*, 2003; Fragiorge *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; Valadares *et al.*, 2008).

The wing spot test in *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation and Recombination Test - SMART) is a versatile, efficient and inexpensive short-term *in vivo* genotoxicity assay for the detection of genotoxicity induced by single pure compounds and complex mixtures. For this reason, it is ideally suited also for antigenotoxicity studies as well as for investigations into modulation of genotoxicity (Graf *et al.*, 1998). It was developed to detect the loss of heterozygosity of the marker genes expressed phenotypically in the trichomes of the fly's wings. It provides rapid access to the ability of genotoxic agents to induce (or of antigenotoxic agents to inhibit) point mutations, chromosome breaks or losses during cell division, or rearrangement related to mitotic recombination (Graf *et al.*, 1984; 1989; Guzmán-Rincón & Graf, 1995; Vogel *et al.*, 1999). Previous studies have shown that SMARTs are most suited to the detection of recombinogenic activity of genotoxic chemicals (Spanó *et al.*, 2001). The standard version present basal levels of cytochrome P450 (CYP) enzymes (Graf *et al.*, 1989) and the high bioactivation version present a high level of CYP (Graf & van Schaik, 1992) with capacity of enzymatically activate promutagens and procarcinogens (Frölich & Würigler, 1990; Graf & Singer, 1992; Graf & van Schaik, 1992).

For antigenotoxicity or modulatory studies, the SMART assays offer a wide variety of flexible protocols for the application of test compounds (Graf *et al.*, 1998). Owing to these advantages, the SMART has been adopted for the genotoxicity / antigenotoxicity / modulatory testing of natural products (Sousa *et al.*, 2003; Fragiorge *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008; Valadares *et al.*, 2008).

Due to the wide distribution of the genus *Tabebuia*, consisting of about 20 species of trees, its use in folk medicine, and the lack of information related to the

genetic toxicology, is important to evaluate: i) genotoxicity of its leaves, stem bark, pods, and seed extracts, as these may have mutagenic, clastogenic, recombinagenic, and/or carcinogenic potential for man; ii) its modulatory effects, which enable it uses as a chemotherapeutic coadjuvant.

The aim of this study was to evaluate the genotoxic potential of a commercial product of *T. impetiginosa* bark and stem, since this is a natural product widely used in folk medicine in Brazil. The negative results observed with *T. impetiginosa* in the somatic cells of *D. melanogaster* prompt us to study this phytotherapeuticum in association with the reference mutagen DXR.

MATERIAL AND METHODS

Chemical compounds and media

A commercial preparation of the powdered bark and trunk of *T. impetiginosa* – Ipê Roxo Max[®] – was obtained from Saúde na Rede (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Doxorubicin (DXR) – Korea United Pharm Inc Co., Ltd. (Seoul, Korea) - was obtained from Meizler Comércio Internacional S.A. (Barueri, SP) and dissolved in ultrapure water in the absence of light. Ultrapure water, used as a negative control, was obtained from a MilliQ system (Millipore, Vimodrone, Milan, Italy). All solutions were always freshly prepared in ultrapure water immediately before use.

Drosophila strains

Three strains were used for the crossbreedings: (i) multiple wing hairs (mwh): *mwh/mwh*; (ii) flare-3 (*flr³/In (3LR)TM3, rip^p sep I(3)89Aabx^{34e} e Bd^S*); (iii) ORR; flare-3 (*ORR/ORR; flr³/In (3LR)TM3, rip^p sep I(3)89Aabx^{34e} e Bd^S*). More details about the genetic markers are given by Lindsley & Zimm (1992).

Crossbreedings for the SMART assay

Two crosses were carried out: (1) the Standard (ST) cross, where flare-3 females were mated with mwh males (Graf *et al.*, 1989); and (2) the High Bioactivation (HB) cross, where ORR; flare-3 females were mated with mwh males (Graf & van Schaik, 1992). The latter cross is highly sensitive to promutagens and procarcinogens due to the increased level of CYP. The ORR; flare-3 strain has chromosomes 1 and 2 substituted in the wild DDT-resistant Oregon R (R) strain, and the gene (R) of chromosome 2 is responsible for the high constitutive level of CYP enzymes (Dapkus & Merell, 1977; Frölich & Würgler, 1989).

Two types of individuals emerge from both ST and HB crossbreeding: marker trans-heterozygotes (MH) flies (*mwh +/+ flr³*) and balancer-heterozygotes (BH) flies (*mwh +/+ TM3, Bd^S*). The latter type can be distinguished phenotypically by its serrated wings.

Experimental procedure

After one or two days of crossbreeding, the couples were transferred to the oviposition medium (an agar-agar base (3% w/v) and a layer of fermenting live baker's yeast supplemented with sucrose) where they remained for 8 hours, after which they were discarded. Third instar larvae ($72\text{h} \pm 4$) were transferred to glass vials containing different quantities (10.0, 20.0 or 40.0% w/w) of powdered bark and stem of *T. impetiginosa* mixed to mashed potato flakes (Yoki Alimentos S. A. – São Bernardo do Campo, SP, Brazil) lightly ground in a mortar and pestle, and rehydrated with 5 mL ultrapure water (to evaluate the *T. impetiginosa* genotoxic effects) or DXR (0.125 mg/mL) (to evaluate the *T. impetiginosa* modulatory effects). Negative (ultrapure water) and positive (DXRX 0.125 mg/mL) controls were included in both experiments.

The larvae were kept in the culture media at a temperature of 25°C and relative humidity of 65% until the adult stage. After the adult flies emerged, they were stored in 70% ethanol. The wings were mounted on glass slides and analyzed by optical microscopy with 400 x magnification, revealing single spots (mwh or flr) or twin spots (mwh and flr). For further details of this procedure, see Graf *et al.* (1984).

Evaluation of the data and statistical analysis

The frequency of spots per fly in each series was compared with the negative control to evaluate the genotoxic effects. To assess the antigenotoxic effects, the frequency of spots per fly in each treated series was compared with the positive control. Statistical comparisons were made using the SMART computer program, which uses the chi-square test for proportions and allows for a multi-decision procedure (Frei & Würigler, 1988). The positive diagnoses obtained (for the total number of spots) were confirmed by Wilcoxon and Mann & Whitney nonparametric *U* tests (Frei & Würigler, 1995). Based on clone induction frequencies per 10^5 cells, the recombinogenic activity was calculated as: mutation frequencies (F_M) = frequencies clones BH flies/frequencies clones MH flies; recombination frequencies (F_R) = $1 - F_M$. Frequencies of total spots (F_T) = total spots in MH flies (considering *mwh* and *flr*³ spots)/N^o of flies; mutation = $F_T \times F_M$; recombination = $F_T \times F_R$ (Santos *et al.*, 1999; Sinigaglia *et al.*, 2006). Based on the control-corrected spot frequencies per 10^5 cells the percentages of *T. impetiginosa*

inhibition were calculated as: $(\text{DXR alone} - T. \textit{impetiginosa} \text{ plus DXR} / \text{DXR alone}) \times 100$ (Abraham, 1994).

RESULTS

The commercial preparation of the powdered bark and stem of the *T. impetiginosa* (10.0, 20.0 or 40.0% w/w) alone, the reference mutagen (DXR 0.125 mg/mL) alone, and the *T. impetiginosa* (10.0, 20.0 or 40.0% w/w) in association (cotreatment) with (DXR 0.125 mg/mL) were assayed two times in ST and HB crossbreeds. Concurrent negative and positive controls were also included. Since no statistical differences were found between the results of individuals experiments the data were pooled. Tables 1 and 2 present, respectively, the results observed with MH and BH flies of the ST and HB crossbreeds. To assess the statistical significance of the frequency of mutant spots observed between flies treated with *T. impetiginosa* the results were compared with the data from the corresponding negative controls. No significant differences in the frequency of mutant spots were observed between flies treated with all *T. impetiginosa* concentrations and the negative control in ST and HB crossbreeds MH flies.

To evaluate the statistical significance of cotreatment series, the results of the different *T. impetiginosa* concentrations in association with DXR were compared with the positive control.

In the MH flies of the ST crossbreed, the frequency of mutant spots observed between cotreated with *T. impetiginosa* 10.0 or 20.0% and DXR showed no statistical significance, but *T. impetiginosa* 40.0% in association with DXR presented a weak positive diagnosis, displaying 36.63% inhibition of DXR genotoxicity. The wings of BH flies were mounted and analyzed whenever a positive response was obtained in the MH offspring. In this case, as no significant differences in the frequency of mutant spots were observed between flies cotreated with *T. impetiginosa* 10.0 or 20.0% and DXR compared to flies treated with DOX alone, the BH flies from these treated series were not analysed. When the BH flies cotreated with *T. impetiginosa* 40.0% w/w and DXR were checked, an inhibitory effect against the frequency of total spots (26.08%) was observed. Comparisons between the clone induction frequencies per 10^5 cells observed in the MH and BH flies of the cotreated series with DXR and *T. impetiginosa* 40.0% were done to quantify the mutagenic and recombinogenic potential of *T.*

impetiginosa. The results showed that the genotoxicity in MH flies was due mainly to mitotic recombination (~90%) (Table 1).

In the MH flies of the HB crossbreed, the frequency of mutant spots observed between cotreated with *T. impetiginosa* 10.0, 20.0 or 40.0% and DXR showed a positive increase (respectively, 94.61; 76.25 and 23.75%) in the total of spots when compared with DXR alone. When the BH flies treated with *T. impetiginosa* 10.0% w/w in association with DXR were checked, a positive increase (119.33%) in the total spots was observed. When comparisons between the clone induction frequencies per 10^5 cells observed in the MH and BH flies of the co-treated series with DXR and all concentrations of *T. impetiginosa* were done, the results showed that the genotoxicity in MH flies was due mainly to mitotic recombination (87 - 90%) (Table 2).

DISCUSSION

Our study shows that a commercial preparation of the powdered bark and stem of *T. impetiginosa* was toxic, but it did not induce somatic mutation and recombination in *D. melanogaster* from the ST and HB crossbreedings. This means that *T. impetiginosa* alone neither acts as a genotoxin nor exerts any antigenotoxic effects on spontaneous DNA lesions. Nevertheless, this toxicity is revealed by the decreased number of treated survivors.

DXR produced a statistically significant induction of all categories of spots in both the ST and HB crossbreeds. These results are in line with those reported by Lehmann *et al.* (2003); Fragiorgio *et al.* (2007); Pereira *et al.* (2008) and Valadares *et al.* (2008) who also demonstrated that DXR is a preferential inducer of homologous recombination when compared with mutational events in *D. melanogaster* somatic cells.

As can be seen from the data in Table 1, in the MH flies of the ST crossbreed, no differences were observed among the frequencies of total spots induced by cotreatments with *T. impetiginosa* 10.0 or 20.0% and DXR compared to those from positive control (DXR alone). However, *T. impetiginosa* 40.0% in association with DXR displayed 36.63% inhibition of DXR genotoxicity. Nevertheless, this is not interpreted as an antigenotoxic or protective effect of *T. impetiginosa*, once the number of survivor flies was reduced indicating *T. impetiginosa* toxicity, what can be responsible for cell death or mitotic inhibition. According to Zeiger (2006), if the test concentrations used are near the stationary or toxic level on a plate test, a slight increase in toxicity could lead to a decreased survival, with a parallel decrease in mutant colonies. So, such an apparent antimutagenic effect would be the result of the toxicity rather than antimutagenicity. The same must be true for the results found in the present study.

Herbal/dietary constituents may be metabolized by CYP to nontoxic metabolites and excreted, but the formation of toxic metabolites is possible. In addition, the inhibition of CYPs by herbal constituents may decrease the formation of toxic metabolites and thus inhibit carcinogenesis, as CYPs play an important role in procarcinogen activation. Bioactivation of herbal constituents appears a critical step for the toxicity induction of some herbs. The resultant reactive

intermediates bind covalently to DNA and proteins, leading to organ toxicity and even carcinogenicity. On the other hand, some herbal/dietary constituents were shown to form reactive intermediates capable of irreversibly inhibiting various CYPs (Zhou *et al.*, 2004).

The results shown in Table 2 indicate a significant potentiating action of *T. impetiginosa* when administered simultaneously with DXR, which was inversely proportional to the concentrations applied, indicating, once more, a dose-response correlation with toxicity. *T. impetiginosa* 10.0 or 20.0% significantly increase DXR-induced genotoxicity, which affected all categories of spots. Nevertheless, in the case of *T. impetiginosa* 40.0% the synergistic activity was not so pronounced, with significant increase in DXR genotoxicity limited to the frequencies of total spots. The magnitude of the comutagenicity was quite considerable, leading to enhancements as high as 23.75 until 94.61%. These results suggest that *T. impetiginosa* may possess an anticarcinogenic potential.

Previous studies have shown that lapachol, isolapachol and their potassium salts induced toxicity in dogs, monkeys, *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina*, *Tilapia nilótica* and Wistar rats (Morrison *et al.*, 1970; Lima *et al.*, 2002; Maganha *et al.*, 2006; Sá & Guerra, 2007). In addition, the *T. impetiginosa* inner bark extract potently inhibited cell proliferation and DNA synthesis (Son *et al.*, 2006).

Lapachol is rapidly metabolized and partially transformed into β -lapachone (Fonseca *et al.*, 2003). Lapachol, α -lapachone and dichloroallyl lawsone do not activate topoisomerase I. They inhibit NAD(P)H-dependent microsomal lipid peroxidation, prevent the destruction of NAD(P)H-dependent CYP, inhibit reactions catalyzed by NAD(P)H-dependent CYP, generate superoxide radicals, and stimulate microsomal oxidation via NAD(P)H (Boothman *et al.*, 1989; Dubin *et al.*, 1990; Fonseca *et al.*, 2003).

β -lapachone, which has been shown to be a novel inhibitor of DNA topoisomerase I, induces protein-linked DNA breaks in the presence of purified human DNA topoisomerase II (Li *et al.*, 1995; Frydman *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2003). It has also been found to induce apoptosis in various human cancer cells (Chau *et al.*, 1998). Its mechanism of action has been linked to reactive oxygen species generated by redox cycling (Docampo *et al.*, 1979; Portela *et al.*, 1996;

Park *et al.*, 2003). By inducing apoptosis, β -lapachone inhibits the growth of A549 human lung carcinoma cells, of the hepatoma (HepG2) cell line, and of human prostate carcinoma cells (Lee *et al.*, 2005; Woo & Choi, 2005; Woo *et al.*, 2006) and may also be expected to inhibit the progression and metastasis of hepatoma cells (Kim *et al.*, 2007). Further, β -lapachone kills cells in a tumor-selective manner via NAD(H)P: quinone oxidoreductase 1, indicate for use against non-small-cell lung cancers (Bey *et al.*, 2007).

Medicinal herbs contain complex mixtures of thousands of components that can exert their action separately or in synergistic ways (Cai *et al.*, 2004; Romero-Jiménez *et al.*, 2005). It has been well established that formation of reactive metabolites of drugs is associated with drug toxicity. Similarly, there are accumulating data suggesting the role of the formation of reactive metabolites/intermediates through bioactivation in herbal toxicity and carcinogenicity. It has been hypothesized that the resultant reactive metabolites following herbal bioactivation covalently bind to cellular proteins and DNA, leading to toxicity via multiple mechanisms such as direct cytotoxicity, oncogene activation, and hypersensitivity reactions (Zhou *et al.*, 2004).

The mechanisms used by *T. impetiginosa* to interact with genotoxicity of DXR were not analysed directly. The results observed in the present study allow us to hypothesize that: i) *T. impetiginosa* constituents may interact with the enzyme systems catalyzing the metabolic detoxification of DXR, leading to enhance of DXR mutagenicity; ii) *T. impetiginosa* constituents generate superoxide radicals and stimulate microsomal oxidation via NAD(P)H; iii) *T. impetiginosa* exerts its synergistic effect by direct interaction of its constituents with DXR. Similar results and conclusions was described by Lehmann *et al.* (2000) with tannic acid in association with mitomycin C, methylmethanesulfonate and nitrogen mustard in somatic cells of *D. melanogaster*.

Our current findings demonstrated that the powder bark and stem of *T. impetiginosa* was toxic, non-genotoxic and possess a considerable potentiating effect on the genotoxicity of DXR, suggesting that *T. impetiginosa* may possess an anticarcinogenic potential. Therefore, further experiments are required on dose response, appropriate combinations, and potential toxicities of *T. impetiginosa* associations with chemotherapeutic drugs to determine the possible risks or

protection that could be associated with the exposure of living organisms to this complex mixture.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

REFERENCES

- Abraham SK (1994) Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis* 9:383-386.
- Algranti E, Mendonça EM, Ali AA, Kokron CM, and Raile V (2005). Occupational asthma caused by Ipê (*Tabebuia spp*) dust. *J Invest Allergol Clin Immunol* 15: 81-83.
- Almeida ER (1993) Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus, p. 284-287.
- Anesini C and Perez C (1993) Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 39:119-128.
- Bey EA, Bentle MS, Reinicke KE, Dong Y, Yang C-R, Girard L, Minna JD, Bornmann WG, Gao J and Boothman DA (2007) An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by β -lapachone. *PNAS* 104:11832-11837.
- Boothman DA, Trask DK and Pardee A B (1989) Inhibition of potentially lethal DNA damage repair in human tumor cells by β -Lapachone, an activator of topoisomerase I. *Cancer Res* 49:605-612.
- Cai Y, Luo Q, Sun M and Corke H (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74:2157-2184.
- Chau Y, Shiah S, Don M and Kuo M (1998) Involvement of hydrogen peroxide in topoisomerase inhibitor β -Lapachone-induced apoptosis and differentiation in human leukemia cells. *Free Rad Biol Med* 24:660-670.
- Dapkus J. and Merrell DJ (1977) Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 87:685-697.
- Docampo R, Cruz FS, Boveris A, Muniz RPA and Esquivel DMS (1979) β -Lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by Sarcoma 180 ascites tumor cells. *Biochem Pharmacol* 28:723-728.
- Doroshov JH (1983) Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res* 43:460-472.

- Dubin M, Villamil SHF and Stoppani AOM (1990) Inhibition of microsomal lipid peroxidation and cytochrome P-450-catalyzed reactions by β -Lapachone and related naphthoquinones. *Biochem Pharmacol* 39:1151-1160.
- Fonseca SGC, Braga RMC and Santana DP (2003) Lapachol – chemistry, pharmacology and assay methods. *Rev Bras Farm* 84:9-16.
- Fragiorge EJ, Spanó MA and Antunes LMG (2007) Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Gen Mol Biol* 30:449-455.
- Frei H and Würgler FE (1988) Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat Res* 203:297-308.
- Frei H and Würgler FE (1995) Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat Res* 334:247-258.
- Frölich A and Würgler FE (1989) New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat Res* 216:179-187.
- Frölich A and Würgler FE (1990) Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat Res* 244:201-208.
- Frydman B, Marton LJ, Sun JS, Neder K, Witiak DT, Liu AA, Wang H, Mao Y, Wu H, Sanders MM and Liu LF (1997) Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by β -Lapachone and related naphthoquinones. *Cancer Res* 57:620-627.
- Graf U and Singer D (1992) Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev Int Contam Ambient* 8:15-27.
- Graf U, Abraham SK, Guzmán-Rincón J and Würgler FE (1998) Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 402:203-209.
- Graf U, Frei H, Kägi A, Katz AJ and Würgler FE (1989) Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res* 222:359-373.
- Graf U, van Schaik N (1992) Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 271:59-67.

- Graf U, Würigler FE, Katz AJ, Frei J, Juon H, Hall CB and Kale PG (1984) Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 6:153-188.
- Guzmán-Rincón J and Graf U (1995) *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth FM, Corkun LD and Guzmán-Rincón J (eds) *Biomonitoring and Biomarkers of Environment Change*. Plenum Press, New York, pp. 169-181.
- Hussain H, Krohn K, Ahmad VU, Miana GA, Green IR (2007) Lapachol: an overview. *Arkivoc*:145-171.
- Kim SO, Kwon JI, Jeong YK, Kim GY, Kim ND and Choi YH (2007) Induction of Egr-1 is associated with anti-metastatic and anti-invasive ability of β -Lapachone in human hepatocarcinoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:2169-2176.
- Koyama J, Morita I, Tagahara K and Hirai K (2000) Cyclopentene dialdehydes from *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry* 53:869-872.
- Lee JH, Cheong J, Park YM and Choi YH (2005) Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by β -Lapachone in human prostate carcinoma cells. *Pharmacol Res* 51:553-560.
- Lehmann M, Franco A, Vilar KSP, Reguly ML and Andrade HHR (2003) Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 539:167-175.
- Lehmann M, Graf U, Reguly ML and Andrade HHR (2000) Interference of tannic acid on the genotoxicity of mitomycin C, methylmethanesulfonate, and nitrogen mustard in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen* 36:195-200.
- Li C, Wang C and Pardee AB (1995) Induction of apoptosis by β -Lapachone in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 55:3712-3715.
- Lima NMF, dos Santos AF, Porfirio Z, Goulart MOF, Sant'Ana AEG (2002) Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. *Acta Trop (Basel)* 83:43-47.

- Lindsley DL and Zimm GG (1992) The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York.
- Maganha J, Rocha ED, Brandao MAF, Peters VM, Guerra MD (2006) Embryo development alteration in rats treated with lapachol. *Braz Arch Biol Technol* 49:927-934.
- Menna-Barreto RFS, Henriques-Pons A, Pinto AV, Morgado-Diaz JA, Soares MJ and De Castro SL (2005) Effect of a β -Lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. *J Antimicrob Chemoter* 56:1034-1041.
- Morrison RK, Brown DE, Oleson JJ and Cooney DA (1970) Oral toxicology studies with lapachol. *Toxicol Appl Pharmacol* 17:1-11.
- Müller K, Sellmer A and Wiegrebe W (1999) Potential antipsoriatic agents: lapacho compounds as potent inhibitors of HaCaT cell growth. *J Nat Prod* 62:1134-1136.
- Park BS, Kim JR, Lee SE, Kim KS, Takeoka GR, Ahn YJ and Kim JH (2005) Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. *J Agricult Food Chem* 53:1152-1157.
- Park BS, Lee KG, Shibamoto T, Lee SE and Takeoka GR (2003) Antioxidant activity and characterization of volatile constituents of Taheebo (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC). *J Agricult Food Chem* 51:295-300.
- Park HJ, Lee H, Lee S, Piao X, Takeoka GR, Wong RY, Ahn Y and Kim J (2006) Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *J Ethnopharmacol* 105:255-262.
- Pereira DG, Antunes LMG, Graf U and Spanó MA (2008) Protective effects of Panax ginseng C.A. Meyer on the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Biol* (in press).
- Portela MP, Stoppani AOM (1996) Redox cycling β -Lapachone and related o-naphthoquinones in the presence of dihydrolipoamide and oxygen. *Biochem Pharmacol* 51:275-283.
- Romero-Jiménez M, Campos-Sánchez J, Analla M, Muñoz-Serrano A and Alonso-Moraga A (2005) Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutat Res* 585:147-155.

- Sá RCS and Guerra MO (2007) Reproductive toxicity of lapachol in adult male Wistar rats submitted to short-term treatment. *Phytotherapy Res* 21:658-662.
- Santos JH, Graf U, Reguly ML and Andrade HHR (1999) The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 444:355-365.
- Savage RE, Tyler AN, Miao XS, Chan TC. (2008) Identification of a novel glucosylsulfate conjugate as a metabolite of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho[1,2-b]pyran-5,6-dione (ARQ 501, beta-lapachone) in mammals. *Drug Metab Dispos* 36:753-758.
- Silva MN, Ferreira VF and Souza MCBV (2003) An overview of a chemistry and pharmacology of naphthoquinones with emphasis on β -Lapachone and derivatives. *Química Nova* 26:407-416.
- Silva RMG, Sousa NC, Graf U and Spanó MA (2008) Antigenotoxic effects of crude extract from *Mandevilla velutina* (Mart. ex Stadelm.) Woodson (Apocinaceae) on cyclophosphamide-induced micronuclei in mice and urethane-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Biol* (*in press*).
- Sinigaglia M, Lehmann M, Baumgardt P, Amaral VS, Dihl RR, Reguly ML and Andrade HHR (2006) Vanillin as a modulator agent in SMART test: Inhibition in the steps that precede *N*-methyl-*N*-nitrosourea-, *N*-ethyl-*N*-nitrosourea-, ethylmethanesulphonate- and bleomycin-genotoxicity. *Mutat Res* 607:225-230.
- Son DJ, Lim Y, Park YH, Chang SK, Yun YP, Hong JT, Takeoka GR, Lee KG, Lee SE, Kim MR, Kim JH, Park BS (2006) Inhibitory effects of *Tabebuia impetiginosa* inner bark extract on platelet aggregation and vascular smooth muscle cell proliferation through suppressions of arachidonic acid liberation and ERK1/2 MAPK activation. *J Ethnopharmacol* 108:48-151.
- 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 MA, Frei H, Würzler FE and Graf U (2001) Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis* 16: 385-394.
- Swift LP, Cutts SM, Nudelman A, Levovich I, Rephaeli A, Phillips DR (2008) The cardio-protecting agent and topoisomerase II catalytic inhibitor sobuzoxane enhances doxorubicin-DNA adduct mediated cytotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 61:739-749.
- Valadares BLB, Graf U and Spanó MA (2008) Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol* 46:1103-1110.
- Vogel EW, Graf U, Frei HJ and Nivard MM (1999) The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci Publ* 146:427-470.
- Warashina T, Nagatani Y and Noro T (2004) Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry* 65:2003-2011.
- Warashina T, Nagatani Y and Noro T (2005) Further constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Phytochemistry* 66:589-597.
- Warashina T, Nagatani Y and Noro T (2006) Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 54:14-20.
- Woo HJ and Choi YH (2005) Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by β -Lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity. *Int J Oncol* 26:1017-1023.
- Woo HJ, Park K, Rhu C, Lee WH, Choi BT, Kim GY, Park Y and Choi YH (2006) β -Lapachone, a quinone isolated from *Tabebuia avellanedae* induces apoptosis in HepG2 hepatoma cell line through induction of Bax and activation of caspase. *J Med Food* 9:161-168.
- Yamashita M, Kaneko M, Lida A, Tokuda H, Nishimura K (2007) Stereoselective synthesis and cytotoxicity of a cancer chemopreventive naphthoquinone from *Tabebuia avellanedae*. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 6417-6420.
- Zani CL, Oliveira AB and Oliveira GG (1991) Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea*. *Phytochemistry* 30:2379-2381.
- Zeiger E (2006) What is needed for an acceptable antimutagenicity manuscript? *Mutat Res* 626:1-3.

Zhou S, Koh H-L, Gao Y, Gong Z and Lee EJD (2004) Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sci* 74:935-968.

TABLE 1. Summary of results obtained with the *Drosophila* Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) progeny of the Standard (ST) cross after chronic treatment of larvae with *Tabebuia impetiginosa* (*Ti*) and doxorubicin (DXR)

Genotypes and treatment		Number of flies	Spot for fly (number of spots) statistical diagnosis ^a				Spots with <i>mwh</i> clone ^b (<i>n</i>)	Frequency of clone formation/10 ⁵ cells ^c		Recombination (%)	Inhibition ^d (↓) or induction ^d (↑) (%)
DXR (mg/mL)	<i>Ti</i> (m%)		Small single spots (1-2 cells) ^e <i>m</i> =2	Large single spots (>2 cells) ^e <i>m</i> =5	Twin spots <i>m</i> =5	Total spots <i>m</i> =2		Observed	Control corrected		
<i>mwh/flr³</i>											
0	0	55	0.44 (24)	0.04 (02)	0.04 (02)	0.51 (28)	27	1.01			
0	10.0	40	0.51 (28) ns	0.13 (07) ns	0.00 (00) ns	0.64 (35) ns	34	1.27	0.26		
0	20.0	55	0.38 (21) ns	0.07 (04) ns	0.02 (01) ns	0.47 (26) ns	26	0.97	-0.04		
0	40.0	54	0.57 (31) ns	0.04 (02) ns	0.02 (01) ns	0.63 (34) ns	34	1.29	0.28		
0.125	0	40	2.40 (96) +	2.33 (93) +	2.60 (104) +	7.33 (293) +	276	14.14	13.22	88.70	
0.125	10.0	40	2.08 (83) ns	2.13 (85) ns	3.78 (151) *	7.98(319) ns	306	15.68	14.75		
0.125	20.0	40	2.13 (85) ns	2.20 (88) ns	3.10(124) ns	7.43(297) ns	288	14.75	13.83		
0.125	40.0	38	1.71 (65) *	1.39 (53) *	1.79 (68) *	4.89(186) *	174	9.38	8.41	89.80	
<i>mwh/TM3³</i>											
0	0	40	0.15 (06)	0.00 (00)	f	0.15 (06)	6	0.31			
0.125	0	40	0.75 (30) +	0.08 (03) ns		0.83 (33) +	33	1.69	1.38		
0.125	40.0	40	0.40 (16) *	0.10 (4) ns		0.50 (20) *	20	1.02	1.02	26.08 ↓	

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr³*) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würgler (1995). *U*-test, two-sided, probability levels: +, $P \leq 0.05$ vs. untreated control; *, $P \leq 0.05$ vs. DXR only; ns, not significant.

^bConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^cFrequency of clone formation: clones/flies/48,800 cells (without size correction).

^dCalculated as [DXR alone – (DXR + *Ti*) / DXR alone] X 100, according to Abraham (1994).

^eIncluding rare *flr³* single spots.

^fOnly *mwh* single spot can be observed in balancer-heterozygous individuals.

TABLE 2. Summary of results obtained with the *Drosophila* Wing Spot Test (SMART) in the Marker-Heterozygous (MH) and Balancer-Heterozygous (BH) progeny of the High Bioactivation (HB) cross after chronic treatment of larvae with *Tabebuia impetiginosa* (*Ti*) and doxorubicin (DXR)

Genotypes and treatment		Number of flies	Spot for fly (number of spots) statistical diagnosis ^a				Spots with <i>mwh</i> clone ^b (n)	Frequency of clone formation/10 ⁵ cells ^c		Recombination (%)	Inhibition ^d (↓) or induction ^d (↑) (%)
DXR (mg/mL)	<i>Ti</i> (%)		Small single spots (1-2 cells) ^e m=2	Large single spots (>2 cells) ^e m=5	Twin spots m=5	Total spots m=2		Observed	Control corrected		
<i>mwh/flr</i> ³											
0	0	40	0.85 (34)	0.00 (00)	0.01 (04)	0.95 (38)	38	1.95			
0	10.0	38	0.97 (37) ns	0.08 (03) ns	0.13 (05) ns	1.18 (45) ns	45	2.43	0.48		
0	20.0	40	0.85 (34) ns	0.08 (03) ns	0.00 (00) ns	0.93 (37) ns	37	1.90	-0.05		
0	40.0	32	0.63 (20) ns	0.03 (01) ns	0.06 (02) ns	0.72 (23) ns	23	1.47	-0.47		
0.125	0	40	2.10 (84) +	1.55 (62) +	2.58(103) +	6.23 (249) +	241	12.35	10.40	87.50	
0.125	10.0	40	3.35 (134) *	3.20 (128) *	4.65 (186) *	11.20 (448) *	433	22.17	20.24	94.61 ↑	
0.125	20.0	38	3.45 (131) *	3.26 (124) *	3.84 (146) *	10.55(401) *	376	20.28	18.33	76.25 ↑	
0.125	40.0	35	2.71 (95) ns	1.77 (62) ns	3.06 (107) ns	7.54 (264) *	256	14.99	12.87	23.75 ↑	
<i>mwhTM3</i> ³											
0	0	40	0.20 (08)	0.00 (00)	f	0.20 (08)	8	0.41			
0.125	0	41	0.68 (28) +	0.10 (04) ns		0.78 (32) +	32	1.60	1.19		
0.125	10.0	40	1.20 (48) *	0.28 (11) ns		1.48 (59) *	59	3.02	2.61	119.33 ↑	
0.125	20.0	40	1.00 (40) ns	0.03 (01) ns		1.03 (41) ns	41	2.10	1.69		
0.125	40.0	31	0.74 (23) ns	0.03 (01) ns		0.77 (24) ns	24	1.59	1.06		

Marker-trans-heterozygous flies (*mwh/flr*³) and balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) were evaluated.

^aStatistical diagnoses according to Frei and Würzler (1995). *U*-test, two-sided, probability levels: +, $P \leq 0.05$ vs. untreated control; *, $P \leq 0.05$ vs. DXR only; ns, not significant.

^bConsidering *mwh* clones from *mwh* single and twin spots.

^cFrequency of clone formation: clones/fly/48,800 cells (without size correction).

^dCalculated as [DXR alone – (DXR + *Ti*) / DXR alone] X 100, according to Abraham (1994).

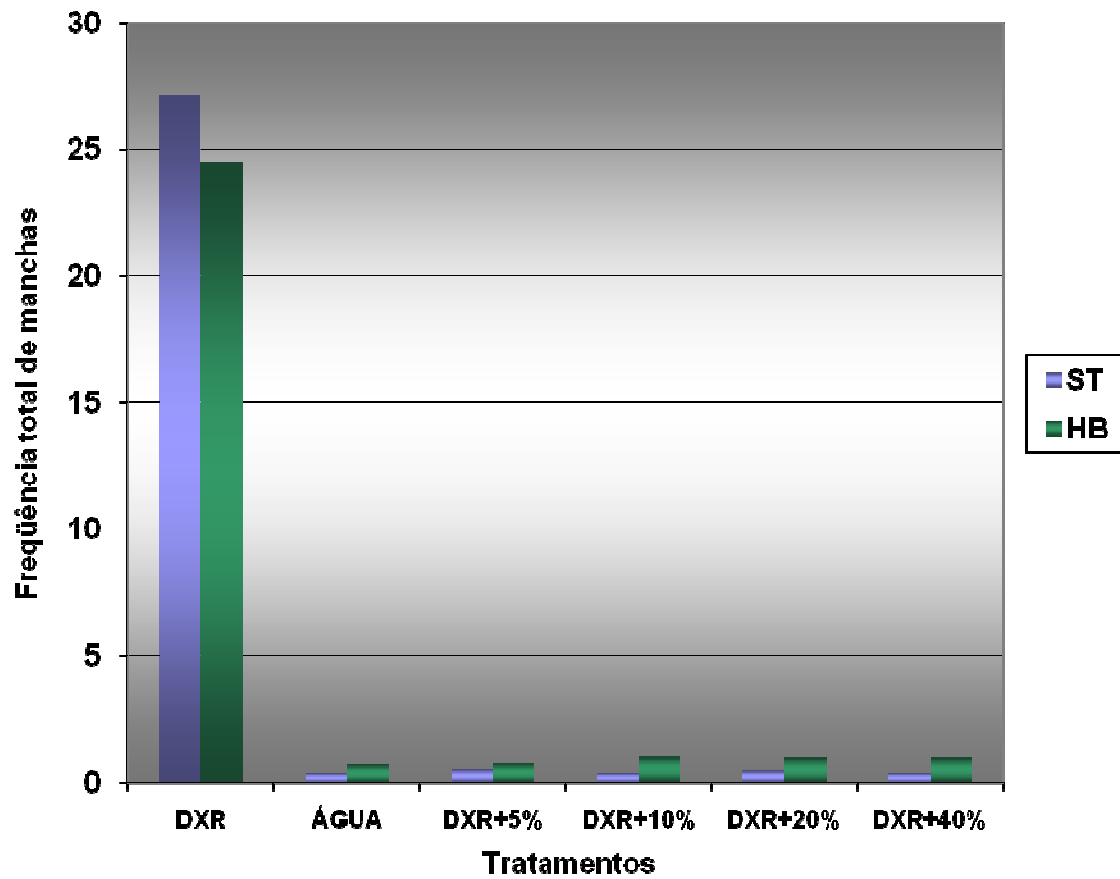
^eIncluding rare *flr*³ single spots.

^fOnly *mwh* single spot can be observed in balancer-heterozygous individuals.

APÊNDICES

APÊNDICE - A

Gráfico 1 - Frequência total de manchas do tratamento crônico com *Am* nos cruzamentos ST e HB



APÊNDICE - B

Gráfico 2 - Contribuição de mutação e recombinação (em porcentagem) em relação à frequência total de manchas em indivíduos MH do cruzamento ST (Co-tratamento)

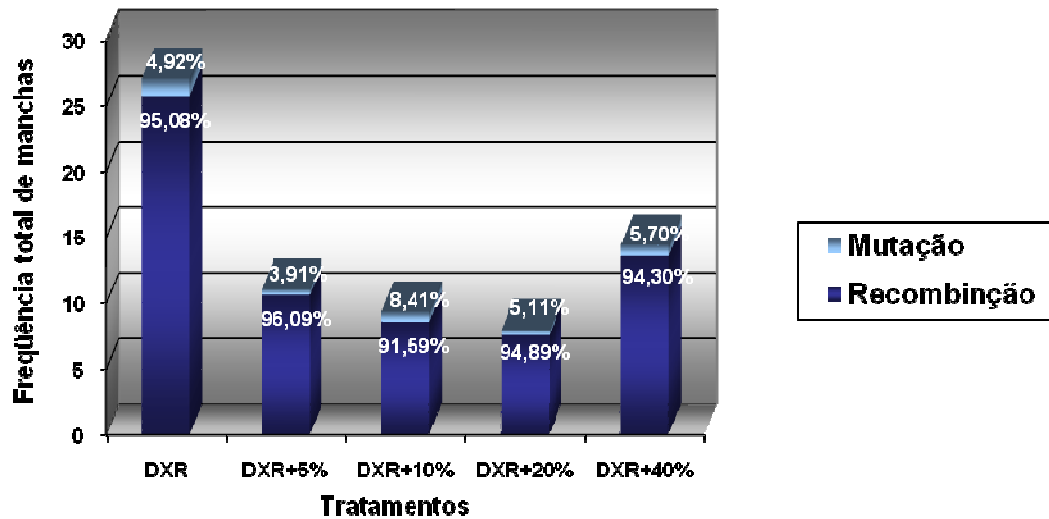
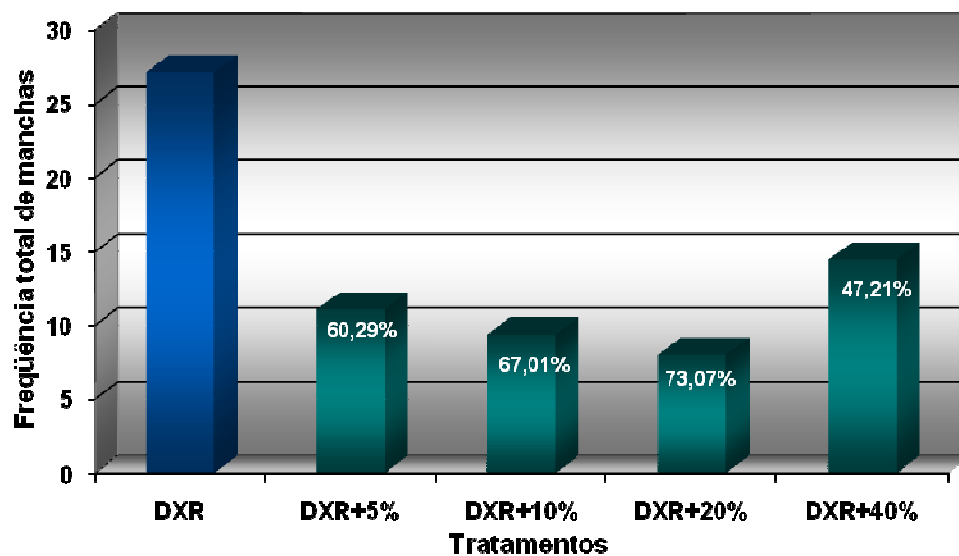


Gráfico 3 - Porcentagem de inibição de *Am* em indivíduos MH do cruzamento ST tratados com DXR (co-tratamento)



APÊNDICE - C

Gráfico 4 - Contribuição de mutação e recombinação (em porcentagem) em relação à frequência total de manchas em indivíduos MH do cruzamento HB (co-tratamento)

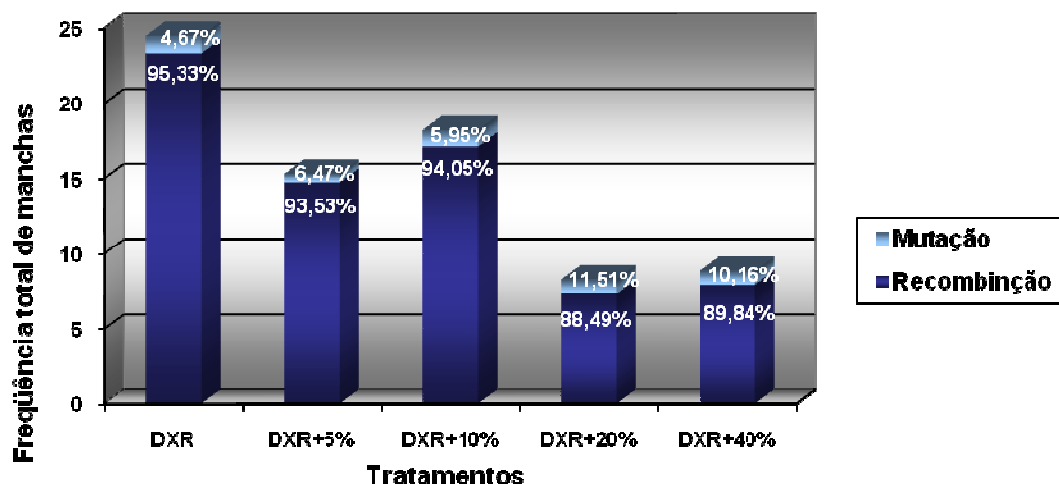
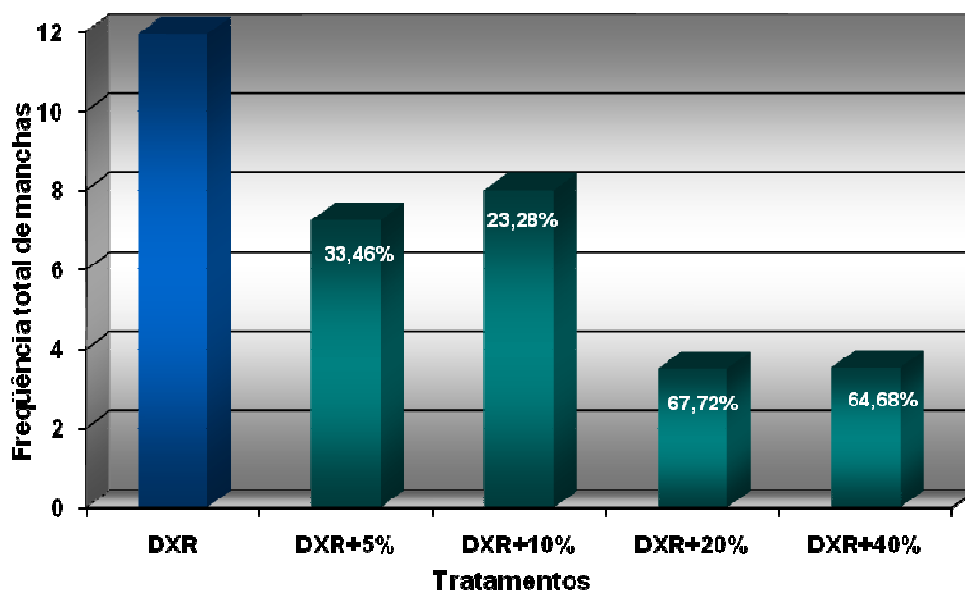


Gráfico 5 - Porcentagem de inibição de *Am* em indivíduos MH do cruzamento HB tratados com DXR (co-tratamento)



APÊNDICE - D

Gráfico 6 - Contribuição de mutação e recombinação (em porcentagem) em relação à frequência total de manchas em indivíduos MH do cruzamento ST (pré-tratamento)

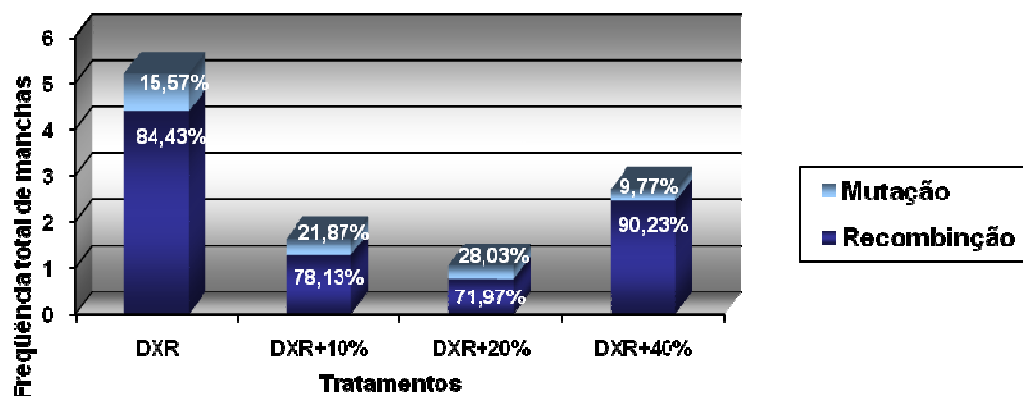
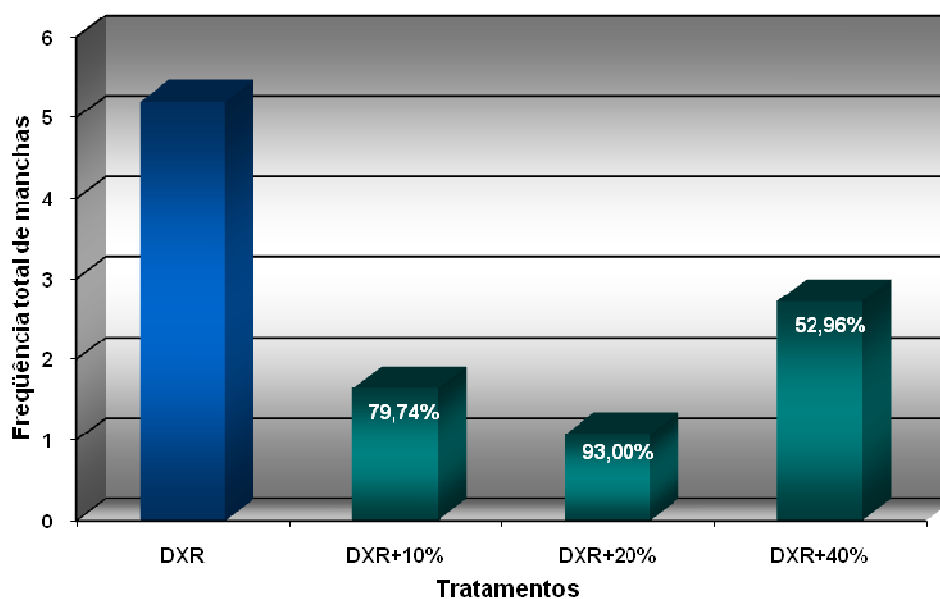


Gráfico 7 - Porcentagem de inibição de *Am* em indivíduos MH do cruzamento ST tratados com DXR (pré-tratamento)



APÊNDICE – E

Gráfico 8 - Contribuição de mutação e recombinação (em porcentagem) em relação à frequência total de manchas em indivíduos MH do cruzamento HB (pré-tratamento)

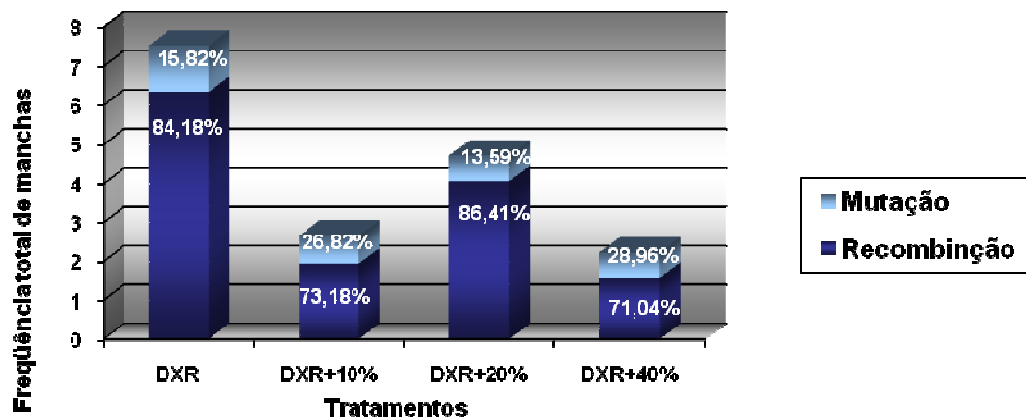
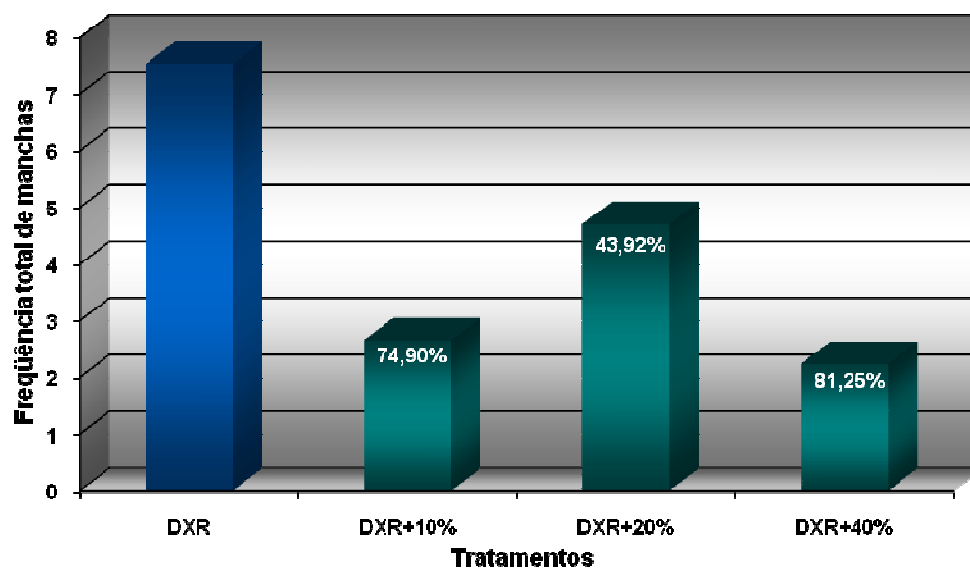


Gráfico 9 - Porcentagem de inibição de *Am* em indivíduos MH do cruzamento HB tratados com DXR (pré-tratamento)



APÊNDICE – F

Gráfico 10 - Contribuição de mutação e recombinação (em porcentagem) em relação à frequência total de manchas em indivíduos MH do cruzamento ST (pós-tratamento)

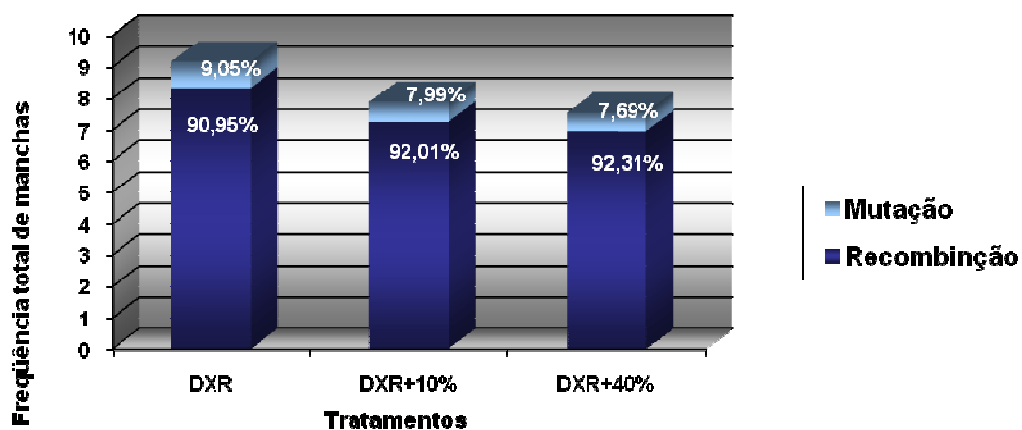
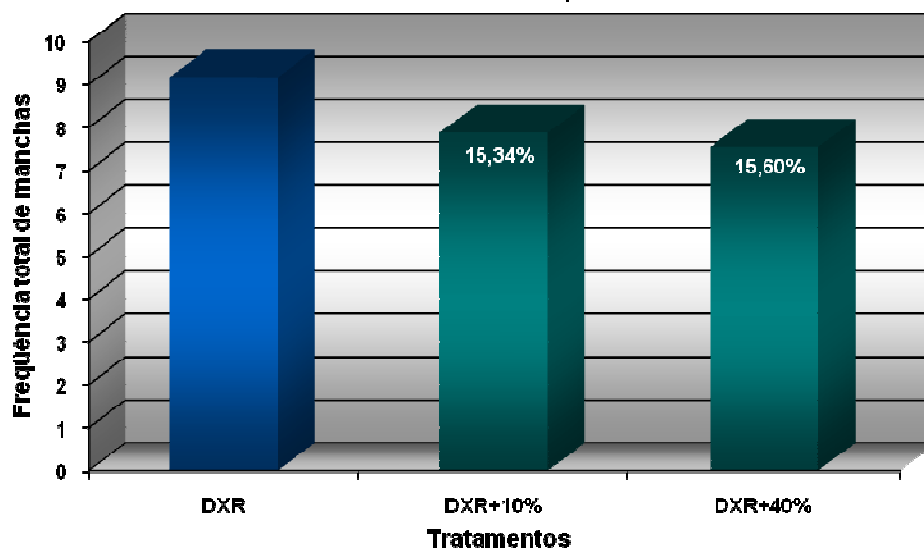


Gráfico 11 - Porcentagem de inibição de *Am* em indivíduos MH do cruzamento ST tratados com DXR (pós-tratamento)



APÊNDICE - G

Gráfico 12 - Contribuição de mutação e recombinação (em porcentagem) em relação à frequência total de manchas em indivíduos MH do cruzamento HB (pós-tratamento)

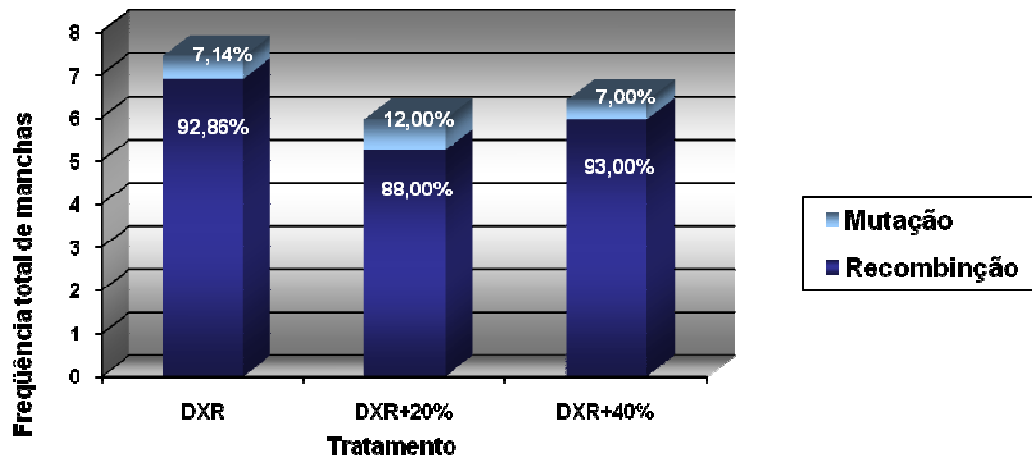
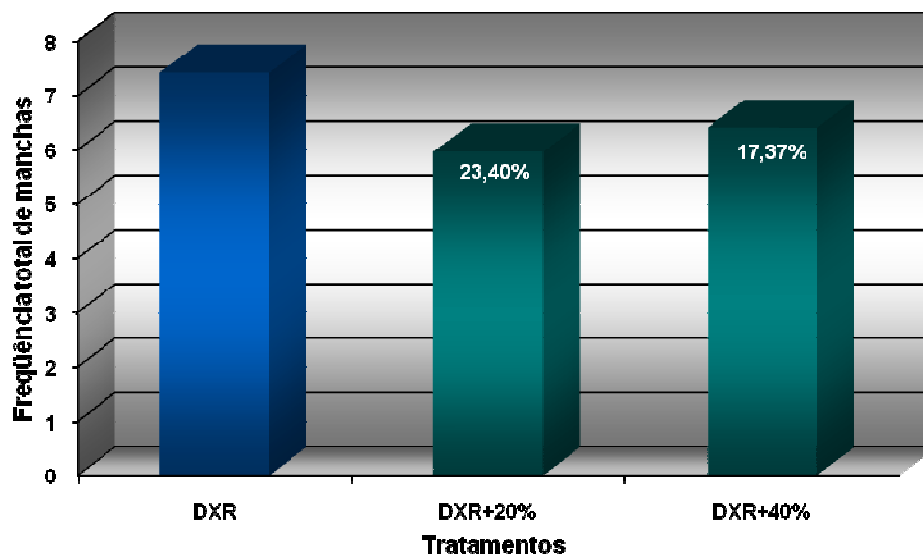
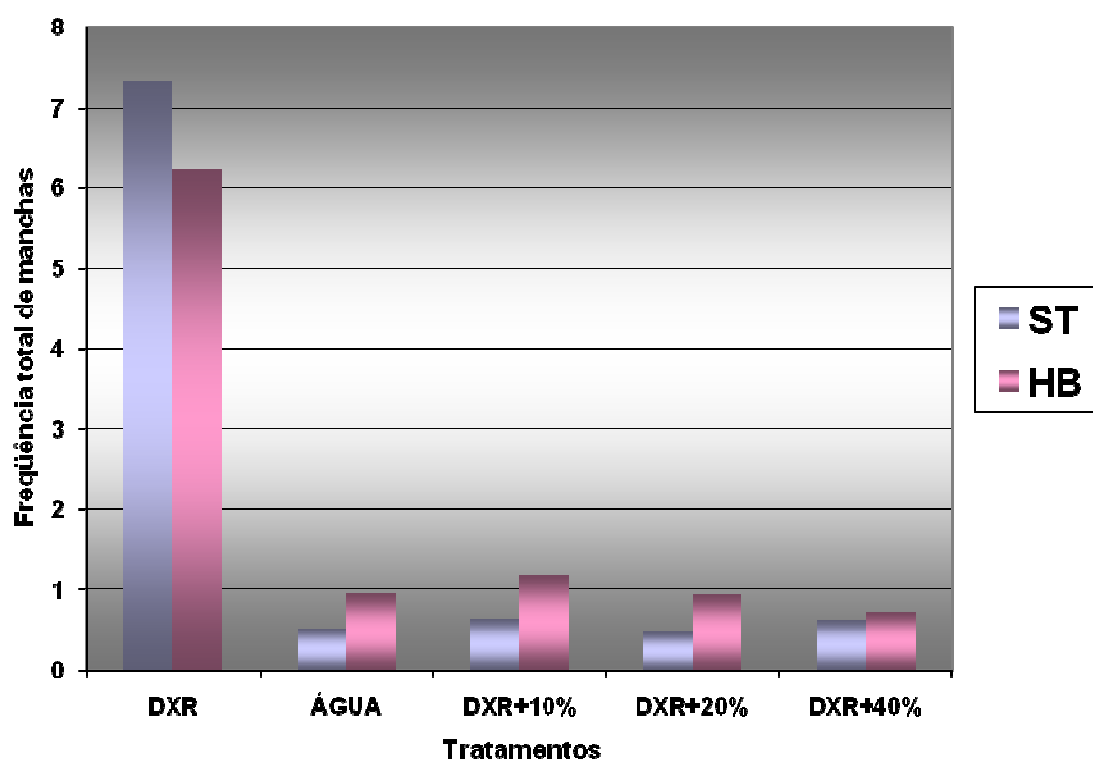


Gráfico 13 - Porcentagem de inibição de *Am* em indivíduos MH do cruzamento HB tratados com DXR (pós-tratamento)



APÊNDICE – H

Gráfico 14 - Frequência total de manchas do tratamento crônico com *Ti* nos cruzamentos ST e HB



APÊNDICE – I

Gráfico 15 - Contribuição de mutação e recombinação (em porcentagem) em relação à frequência total de manchas em indivíduos MH do cruzamento ST (co-tratamento)

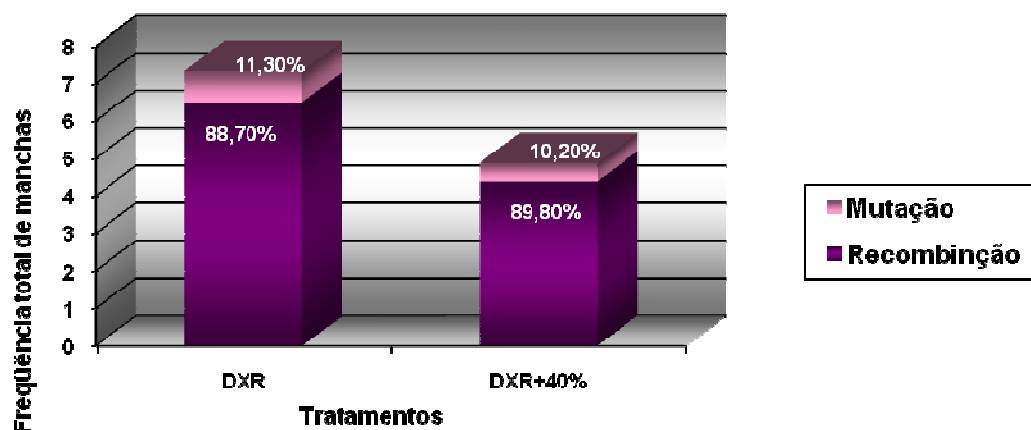
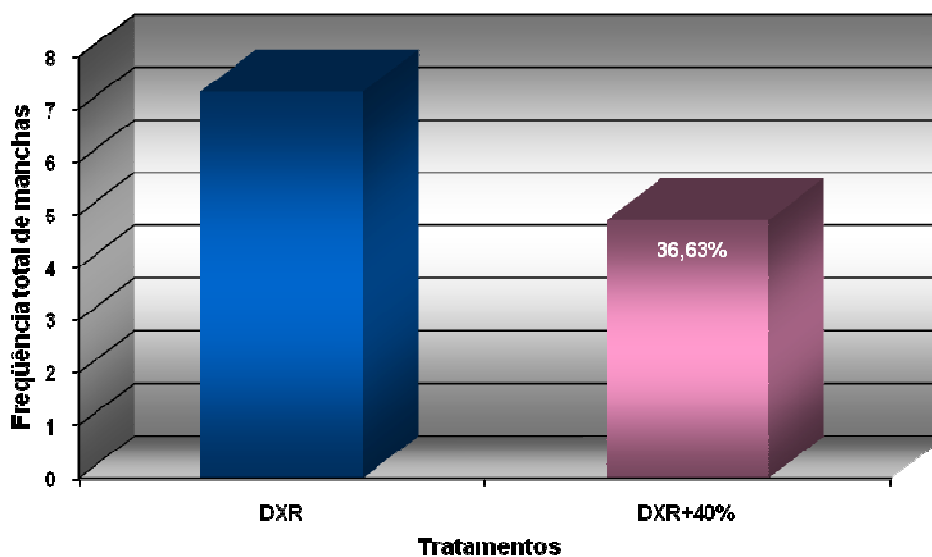


Gráfico 16 - Porcentagem de inibição de *Ti* em indivíduos MH do cruzamento ST tratados com DXR (co-tratamento)



APÊNDICE - J

Gráfico 17 - Contribuição de mutação e recombinação (em porcentagem) em relação à frequência total de manchas em indivíduos MH do cruzamento HB (co-tratamento)

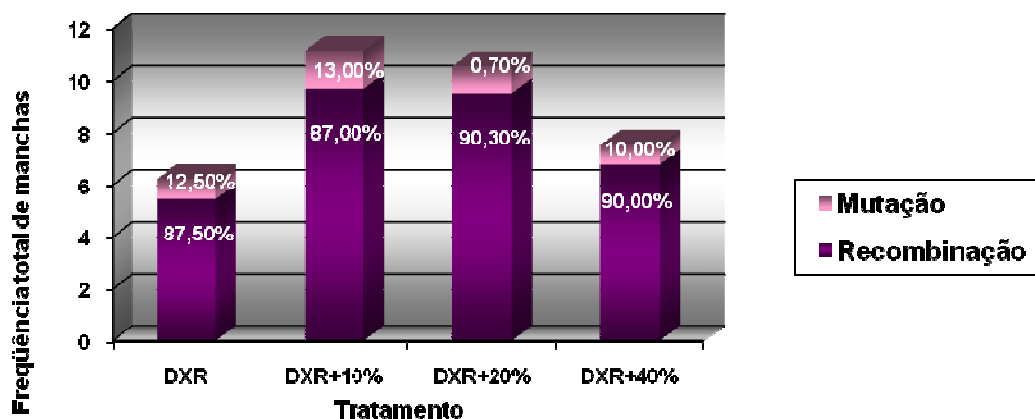


Gráfico 18 - Porcentagem de indução da T_i em indivíduos MH do cruzamento HB tratados com DXR (co-tratamento)

