



**UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL**

**ULBRA**

**ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E  
MUTAGÊNICA/ANTIMUTAGÊNICA INDUZIDAS PELO EXTRATO VEGETAL  
DA *Costus spicatus***

**SUSANA GASPARRI**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Diagnóstico Genético e Molecular da Universidade Luterana do Brasil,  
para a obtenção do Grau de Mestre em Diagnóstico Genético e Molecular.**

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> JENIFER SAFFI

Canoas  
2005

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Genética Toxicológica do prédio 19 da Universidade Luterana do Brasil-ULBRA e também no Laboratório de Radiologia Molecular do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, com apoio financeiro da ULBRA e CNPq- PIBIC.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos os que contribuíram para o êxito desta tese, especialmente:

A Deus por ter me iluminado para finalizar este trabalho.

Ao meu marido, Fernando Seelig, pela paciência, compreensão, companheirismo e amor, nos melhores e piores momentos dedicados a esta tese de mestrado, obrigada pela força para seguir em frente.

Aos meus pais pelo apoio moral e financeiro dedicados ao curso de mestrado, obrigada por terem apostado em mim.

Agradeço a Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Jenifer Saffi, pela orientação segura, paciência e amizade em mais uma etapa de minha vida.

Ao Prof. Dr. João A. P. Henriques do Laboratório de Genotoxicidade (GENOTOX) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por aceitar-me em seu laboratório para a realização de grande parte dos experimentos deste trabalho.

Ao Laboratório Indusfarma, pelo apoio, a empresa Santosflora, por ceder-me amostra da planta pesquisada.

Ao Rafael Roehrs, Cristina Simoni e Dinara Moura pela paciência em ensinar-me as técnicas laboratoriais necessárias para a pesquisa realizada neste trabalho.

Aos amigos e bolsistas Giovanni Cignachi e Samuel Saito, pela dedicação em ajudar-me a finalizar este trabalho, obrigada pelo carinho.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 A planta <i>Costus spicatus</i>	15
2.2 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	18
2.2.1 Estresse oxidativo	22
2.2.2 Sistemas de defesa oxidantes	23
2.2.2.1 Sistemas de defesas enzimáticos	23
2.2.2.2 Sistemas de defesa não-enzimáticos	25
3 ENSAIOS PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA EM EUCARIOTOS	31
4 A LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COMO MODELO DE ESTUDO EUCARIOTO	32
4.1 Defesas antioxidantes da levedura <i>S. cerevisiae</i>	33
4.2 Avaliação genotóxica: testes de mutações reversas	35
4.3 O estudo de substâncias com atividades pró-e/ou antioxidantes	36
5 OBJETIVOS	39
6 MATERIAIS E MÉTODOS	40
6.1 Amostra vegetal	40
6.2 Preparação dos extratos	40
6.2.1 Extrato hidroalcoólico	40
6.2.2 Extratos orgânicos	40
6.3 Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
6.4 Meios de cultura e soluções	41
6.5 Condições de crescimento	41
6.6 Detecção da atividade mutagênica e antimutagênica	42
6.7 Detecção da atividade antioxidante em <i>S. cerevisiae</i> , pelo ensaio de inibição de crescimento	44
6.8 Análise estatística	45

7 RESULTADOS	46
7.1 Ensaio de mutagênese e antimutagênese	46
7.2 Ensaio de atividade antioxidante	50
7.2.1 Tratamento com extrato hidroalcoólico	50
7.2.2 Tratamento com a fração metanólica	53
8 DISCUSSÃO	56
9 CONCLUSÕES	62
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

## ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1. Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste estudo. 42
- Tabela 2. Indução de mutação pontual (*his1-7* e *lys1-1*) e mutação por deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift* (*hom3-10*) na linhagem haplóide XV 185-14c de *S. cerevisiae*, após o tratamento com o extrato hidroalcoólico da *Costus spicatus* em fase estacionária de crescimento. 47
- Tabela 3. Indução de mutação pontual (*his1-7* e *lys1-1*) e mutação por deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift* (*hom3-10*) na linhagem haplóide XV 185-14c de *S. cerevisiae*, após incubação prévia com o extrato da *Costus spicatus* (pré-tratamento) e posterior tratamento por uma hora com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 16mM em fase estacionária de crescimento. 48
- Tabela 4. Indução de mutação pontual (*his1-7* e *lys1-1*) e mutação por deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift* (*hom3-10*) na linhagem haplóide XV 185-14c de *S. cerevisiae*, após o tratamento simultâneo durante 4 horas com o extrato hidroalcoólico de *Costus spicatus* e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (16mM), em fase estacionária de crescimento. 49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Flor da <i>Costus spicatus</i>	16
Figura 2	<i>Costus spicatus</i>	16
Figura 3	Partes aéreas da <i>Costus spicatus</i>	17
Figura 4	Detoxificação enzimática realizada por Sod, Cat e GPx	25
Figura 5	Exemplos de estruturas químicas dos flavonóides	28
Figura 6	Fases de crescimento de uma levedura selvagem quando iniciada em meio completo	33
Figura 7	Representação esquemática do teste de mutagênese e antimutagênese em <i>S. Cerevisiae</i>	44
Figura 8	Representação do ensaio do disco central	45
Figura 9	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> tratadas com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em fase estacionária, após a incubação prévia com diferentes doses do extrato hidroalcoólico	50
Figura 10	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> tratadas com paraquat, em fase estacionária, após incubação prévia com diferentes doses do extrato hidroalcoólico	51
Figura 11	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> tratadas com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em fase exponencial, após incubação prévia com diferentes doses do extrato hidroalcoólico	52
Figura 12	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> tratadas com paraquat em fase exponencial, após incubação prévia com diferentes doses do extrato hidroalcoólico	53
Figura 13	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> tratadas com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em fase estacionária, após incubação prévia com diferentes doses da fração metanólica	54
Figura 14	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> tratadas com paraquat em fase estacionária, após incubação prévia com diferentes doses da fração metanólica	55

## ABREVIATURAS

CAT	Catalase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleotídeo
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HIS	Histidina
HO•	Radical hidroxil
HOM	Homoserina
LIS	Lisina
MM	Meio mínimo
MMS	Metilmetanosulfonato
NaCl	Cloreto de sódio
NADP	Fosfato dinucleotídeo adenina-nicotinamida
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido
pH	Concentração de íons H <sup>+</sup> (Hidrogênio)
RL	Radical livre
SC	Meio sintético completo
SC-his	Meio sintético sem histidina
SC-lys	Meio sintético sem lisina
SC-hom	Meio sintético sem homoserina
SOD	Superóxido dismutase
Sod1 (SodCuZn)	Superóxido dismutase-cobre e zinco
Sod2 (SodMn)	Superóxido dismutase-manganês
YEPD	Meio completo para leveduras
WT	Linhagem selvagem

## RESUMO

A *Costus spicatus* Swartz, popularmente chamada no Brasil de 'cana-do-brejo', é uma espécie nativa encontrada em locais úmidos da América Latina. É utilizada na medicina popular como diurético, no alívio de infecções urinárias e para expelir pedras renais. Recentemente, esta planta tem atraído a atenção de pesquisadores, pois se verificou nos rizomas da mesma uma nova fonte de diosgenina, precursor de hormônios esteroidais. Também, por estudos fitoquímicos feitos com as partes aéreas da planta, foram descritos, recentemente, dois novos diglicosídeos flavônicos: a tamarixetina 3-O-neohesperidosídeo e o canferídeo 3-O-neohesperidosídeo. Outros compostos bastantes conhecidos como a quercetina 3-O-neohesperidosídeo e mais seis flavonóides foram identificados. Estes diglicosídeos flavônicos apresentaram comprovada atividade antiinflamatória.

Entretanto, não existem ainda estudos que comprovem a eficácia e a segurança do uso desta planta para fins terapêuticos. Em função disso, o objetivo desse trabalho foi verificar as atividades mutagênica e antimutagênica do extrato hidroalcoólico da cana-do-brejo, bem como a sua atividade antioxidante, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo.

Para os estudos de mutagênese e antimutagênese, empregou-se a linhagem XV185-14c, a qual detecta mutação reversa, mutação do tipo *forward* e por deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*). A linhagem, em fase estacionária, foi incubada em salina com quantidades crescentes do extrato hidroalcoólico da planta, durante 20 horas e posteriormente semeada em meios de seleção específicos. Após 3 a 5 dias de incubação à 30°C, as colônias foram contadas. Para o ensaio de antimutagênese, a mesma linhagem foi incubada com concentrações crescentes do extrato vegetal e posteriormente exposta por 1 hora a peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou então tratada simultaneamente com o extrato e com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 4 horas, sendo posteriormente semeada como no experimento anterior. No pré-tratamento, o extrato não protegeu a linhagem das lesões

induzidas por peróxido de hidrogênio. Quando tratadas simultaneamente, os resultados sugerem uma atividade antimutagênica apenas no locus da histidina.

Para os ensaios de atividade antioxidante, utilizaram-se linhagens proficientes e deficientes em sistema de defesa antioxidante (*SOD*, *sod1*, *sod2*, *sod1sod2*) no teste chamado disco central ou “central disc”, e neste caso foram testados os extratos hidroalcoólico e metanólico. As linhagens em fase exponencial ou estacionária foram pré-incubadas em solução salina com doses crescentes do extrato por 16 horas e, no dia seguinte, estriadas em placa de meio rico completo (YEPD) contendo no centro um disco de papel filtro com os agentes oxidantes paraquat ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após 2 ou 3 dias de incubação à 30°C, mediu-se a inibição de crescimento.

Com extrato hidroalcoólico, pôde-se perceber um baixo efeito antioxidante em linhagens tratadas com doses mais baixas (25-50µL/mL suspensão celular); também se verificou um efeito pró-oxidante nas linhagens tratadas com a dose mais alta (250µL/mL suspensão celular), tanto em fase exponencial, quanto em fase estacionária. Por outro lado, com o extrato metanólico observou-se um efeito antioxidante bastante significativo para todas as doses testadas.

Como a maior concentração dos flavonóides deve estar representada na fração metanólica, pode-se inferir que esses sejam responsáveis, pelo menos em parte, pela atividade encontrada. Da mesma forma, pode-se sugerir que o efeito pró-oxidante observado com extrato hidroalcoólico é devido à presença de compostos de menor polaridade, as quais não devem estar presentes na fração metanólica e sim, na hidroalcoólica.

## ABSTRACT

The *Costus spicatus* Swartz, commonly called 'cana-do-brejo' in Brazil, is a native specie found in wet coastal forests from Latin America. It is utilized in folk medicine as a diuretic, to relieve in urinary affections and to expel kidney stones. Recently, this plant has attracted attention of researchers, because it has been verified in the rhizome of this plant a new source of diosgenin, a precursor of steroidal hormones. Also by phytochemical studies done with the aerial parts two new flavonol diglycosides were described recently: tamarixetin 3-O-neohesperidoside and kaempferide 3-O-neohesperidoside. Other compounds such as quercetin 3-O-neohesperidoside and six more flavonoids were also identified. These flavonol diglycosides showed to exhibit anti-inflammatory activity.

However there are no studies that confirm the efficacy and safety of this plant for therapeutics purposes. For this reason, the aim of this study was to verified the mutagenic and antimutagenic activities of hidroalcoholic extract, as well as its antioxidant activity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism.

For the mutagenic and antimutagenic experiments the strain XV185-14c was used, which permits the detection of reverse, forward and frameshift mutations. The strain in stationary phase was incubated in saline with increased amounts of the hidroalcoholic extract for 20 hours, following plating on appropriate media. After 3 to 5 days of incubation, the colonies were counted. For the antimutagenic assay, the same strain was either incubated for 16 hours with various concentrations of the same extract following by 1 hour exposure to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) or treated simultaneously with the extract and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 4 hours, being plated as in the previous experiment. In the pretreatment assay the extract did not protect the strain significantly for the lesions induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. However, when treated simultaneously, the results suggested antimutagenic activity only in the locus of histidine.

In the antioxidant assay, *Saccharomyces cerevisiae* strains proficient and deficient in the superoxide dismutase antioxidant defense (*SOD*, *sod1*, *sod2*, *sod1sod2*) were used in the central disc assay. In this case the hidroalcoholic and methanolic extracts were tested. The strains either in exponential or stationary

phase of growth were preincubated in saline solution with increased doses of the extract for 16 hours. An inoculation loop of cells from a suspension was streaked from the center to the border of a Petri dish in one continuous strike, to both sides of the plate. A filter-paper disk was placed in the center of the plate and the oxidizing agent paraquat or  $H_2O_2$  was applied onto the disk. After 2 or 3 days of incubation at  $30^{\circ}C$ , the impairment growth was measured.

A weak antioxidant effect was observed for the lower doses of the hidroalcoholic extract (between 25-50 $\mu$ L/mL cell suspension). Besides, a prooxidant effect was seen in the strains treated with the highest dose (250 $\mu$ L/mL cell suspension), either in exponential or stationary phase of growth. On the other hand, the methanolic extract showed a significant antioxidant effect for all doses and strains.

As a major concentration of flavonoids should be represented in the methanolic fraction, one might suggest that these are responsible, at least in part for the antioxidant activity observed. In the same way, it can be suggested that the prooxidant effect observed for the hidroalcoholic extract is due to the presence of compounds of minor polarity, which are not present in methanolic, but in the hidroalcoholic fraction.

## 1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utilize plantas medicinais como principal recurso no atendimento básico de saúde. Incluem-se aí populações que as usam *in natura* (por opção ou por ser a única alternativa disponível) e os sistemas de medicina que empregam plantas processadas em formulações medicamentosas, como a medicina chinesa e ayurvédica (tradicional indiana). Além disso, os medicamentos fitoterápicos são reconhecidos oficialmente pela OMS como recurso terapêutico, desde 1978 e amplamente consumidos mundialmente.

Estima-se que o comércio mundial de fitoterápicos movimentava cifras de 22 bilhões de dólares anuais (Yunes, 2001). Este quadro tem sido denominado “a revolução dos medicamentos fitoterápicos” (Rates, 2001). Em nosso País, acredita-se que ¼ dos oito bilhões de faturamento da indústria farmacêutica nacional em 1996 foram advindos de medicamentos derivados de plantas medicinais. Entretanto, poucas informações estão disponíveis a respeito do risco potencial de certas plantas medicinais para a saúde humana, ainda que muitas contenham substâncias químicas conhecidas por serem mutagênicas e/ou carcinogênicas (Bjeldanes e Chang, 1977; Weisburger, 1979; Goggelmann e Schimmer, 1986).

Como a maior parte da flora ainda é desconhecida do ponto de vista farmacobotânico, são imprescindíveis ações para a legalização das normas de uso e registro de fitoterápicos a fim de evitar o uso indiscriminado pela medicina popular, que vem promovendo uma redução drástica das populações naturais de algumas espécies como: *Maytenus spp.*, *Bauhinia spp.*, *Mikania spp.*, *Cordia spp.*, *Tabebuia spp.*, *Pilocarpus spp.*, *Erythroxylum spp.* (De Stasi, 1996).

O Brasil é considerado um dos países com uma enorme biodiversidade vegetal, abrigando 55 mil espécies catalogadas. Estima-se que quatro mil espécies vegetais sejam usadas para fins medicinais, resultado da observação e manejo da flora por povos tradicionais. Uma investigação nessa área influenciaria diretamente a sociedade em vários níveis, possibilitando a descoberta de novas drogas, a identificação de fontes de substâncias químicas locais capazes de

substituir as importadas, assim como o desenvolvimento das indústrias de fitomedicamentos nacionais.

Para alcançar qualquer dessas metas é indispensável à fundamentação científica, pois é o que possibilita a transformação segura e eficaz de uma planta em um medicamento fitoterápico de qualidade, diferente do uso baseado somente na prática popular (Elisabetsky, 2002).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A planta *Costus spicatus*

A planta *Costus spicatus* Swartz (sin.: *C. cylindricus* Jacq. Família: Zinziberaceae/Costaceae), popularmente chamada no Brasil de 'cana-do-brejo', é uma espécie nativa encontrada em locais úmidos do Sul do México, Yucatan, Costa Rica, norte da Colômbia e Brasil (Silva *et al.*, 1999). A denominação cana-do-brejo é utilizada para designar duas espécies de *Costus*: *Costus spiralis* Rosc. e *Costus spicatus* Swartz, pois ambas possuem a mesma utilização na medicina tradicional.

É uma planta perene, rizomatosa, ereta, não ramificada, de 1-2m de altura, nativa em quase todo o Brasil, principalmente na mata Atlântica e região Amazônica. Apresenta folhas alternas, membranáceas, dotadas de bainhas papiráceas, velutina em ambas as faces, de 25-40cm de comprimento por 6-10cm de largura. Possui inflorescências em espigas terminais estrobiliformes, com grandes brácteas vistosas de cor vermelha, que protegem as flores de cor amarelada. Multiplica-se tanto por sementes como por rizomas. É cultivada como ornamental, tanto para jardins como para produção de flor de corte. Suas folhas, hastes e rizomas são empregados na medicina tradicional de longa data, principalmente na região Amazônica (Lorenzi e Matos, 2002). É utilizada popularmente pela sua ação depurativa e diurética, para alívio de infecções urinárias e para expelir pedras renais. Esta planta tem atraído a atenção de pesquisadores, pois se verificou nos rizomas da mesma uma nova fonte de diosgenina, um precursor de hormônios esteroidais (Silva *et al.*, 1999).

A família Zingiberaceae (Costaceae) é largamente distribuída entre os trópicos, particularmente no sudeste da Ásia (Holttum, 1950). Estas espécies crescem naturalmente em locais úmidos e em regiões sombrias de planícies ou colinas com declives, na forma de plantas espalhadas ou matas. Vários membros desta família são facilmente reconhecidos pelas características das folhas aromáticas e rizomas carnudos quando são espremidos, e também pelas suas formas elípticas e elípticas-alongadas. Nessa região, várias espécies são usadas como especiarias, temperos, medicamentos, agentes flavorizantes e como fonte

de certos corantes (Burkill,1966). Muitas espécies do gênero *Alpinia*, *Amomum*, *Curcuma*, *Costus*, *Caempferia* e *Zingiber* estão presentes em ingredientes de tônicos tradicionalmente preparados e chamados de 'Jamu', que estão comercialmente disponíveis.



Figura 1. Flor da *Costus spicatus* (<http://toptropicals.com>)



Figura 2. *Costus spicatus* (<http://toptropicals.com>)



Figura 3. Partes aéreas da *Costus spp.* em seu habitat (www.hear.org).

Informações etnofarmacológicas registram o uso das raízes e rizomas como diurético, tônico, emenagogo e diaforético, enquanto o suco da haste fresco diluído em água tem uso contra gonorréia, sífilis, nefrite, picadas de insetos, problemas da bexiga e diabetes (Albuquerque, 1989; Van den Berg, 1993; Corrêa *et al.*, 1998; Vieira e Albuquerque, 1998; Mors *et al.*, 2000). Externamente, sua decocção é empregada para aliviar irritações vaginais, leucorréia e no tratamento de úlceras (Boorhem, 1999), enquanto que na forma de cataplasma é empregada para amadurecer tumores (Mors *et al.*, 2000). Nas Guianas, o decocto da planta inteira é utilizado para disenteria, cólicas, como carminativa e laxante (Grenand *et al.*, 1987). Na sua composição química é registrada a presença, além de inulina, de ácido oxálico, taninos, sistosterol, saponinas, sapogeninas, mucilagens e pectinas (Albuquerque, 1989; Corrêa *et al.*, 1998; Vieira e Albuquerque, 1998).

Há muitos relatos de que os constituintes das plantas Zinziberaceas da Malásia não apresentam atividades biológicas dos compostos isolados ou

extratos brutos (Sirat, 1994; Sirat *et al.*, 1994; Sirat e Nordin, 1994; Sirat e Liamen, 1995; Sirat e Nordin, 1995; Sirat *et al.*, 1996). Mas sabe-se que, muitas espécies das Zinziberaceae apresentam atividade antioxidante e antimicrobiana (Iwu e Anyanwu, 1982; Yamada *et al.*, 1982; Bandara *et al.*, 1989; Jitoe *et al.*, 1992; Haraguchi *et al.*, 1996).

Por meio de estudos fitoquímicos e da combinação de espectroscopia e métodos químicos realizados com as partes aéreas da *Costus spp*, foi descrita a estrutura e o isolamento de dois novos diglicosídeos flavônicos, principalmente nas folhas da cana-do-brejo, como a tamarixetina 3-O-neohesperidosídeo e o canferídio 3-O-neohesperidosídeo. Estes glicosídeos flavônicos das folhas da planta demonstraram apresentar atividade inibidora da produção de óxido nítrico pelos macrófagos ativados, onde apresentaram atividades antiinflamatórias. Além destes, foram identificados outros compostos muito conhecidos como quercetina 3-O-neohesperidosídeo, juntos com mais seis outros flavonóides (Silva *et al.*, 2000).

De acordo com algumas literaturas, muitos polissacarídeos do tipo glicano, encontrados em vegetais, mostraram possuir atividade antiinflamatória (Czarnecki e Grzybek, 1995) e imunomoduladora (Tomoda *et al.*, 1994). Muitos estudos sugerem que os mecanismos de ação desses polissacarídeos podem ser devido a sua ação no sistema retículo-endotelial, com a estimulação fagocitária.

## **2.2 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)**

O oxigênio é uma molécula altamente reativa e pode ser parcialmente reduzido para formar um número de agentes quimicamente reativos. O processo de transferência de elétrons, ou a absorção de energia pode levar o oxigênio a gerar as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (Oga, 2003), as quais abrangem moléculas com um elétron desemparelhado no último orbital, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho, também conhecidas como Radical Livre (RL), tornando-o muito instável, extraordinariamente reativo, e com uma enorme capacidade para combinar-se com diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivados de cada uma delas. ERO é um termo freqüentemente usado

para incluir também espécies que não são radicais livres, mas algumas moléculas derivadas de  $O_2$  (Oxigênio), capazes de gerar radical livre, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Halliwell e Gutteridge, 2000). O  $O_2$  envolvido no processo respiratório, em certas condições no organismo, pode ser transformado em ânion superóxido, radical hidroxil, oxigênio singlet e peróxido de hidrogênio, e todas essas variações estão muitas vezes associadas a circunstâncias patológicas, incluindo reações inflamatórias. Entretanto, também estão relacionadas a processos fisiológicos, como por exemplo a resposta imune.

Estas formas de oxigênio são altamente prejudiciais para os constituintes celulares, incluindo o DNA, os lipídios, ácidos graxos e as proteínas (Storz *et al.*, 1987; Wolff *et al.*, 1986). O oxigênio atmosférico é o principal agente responsável pela deterioração de materiais orgânicos e alimentos expostos ao ar. Diversas classes de moléculas são susceptíveis ao ataque de  $O_2$  e acabam formando hidroperóxidos. Tais hidroperóxidos contribuem para a deterioração e disfunção em células e membranas celulares (Larson, 1988).

As ERO podem direcionar a produção de mais espécies reativas, particularmente através de processos endógenos, acontecendo em muitas células como consequência dos processos metabólicos. Também podem ser formadas pela exposição de células à radiação ionizante, pelo ciclo-redox químico presente no ambiente ou pela exposição a metais pesados (Ames, 1983; Brennan e Schiest, 1996). Apesar destes mecanismos, todos os organismos aeróbios estão continuamente expostos a oxidantes reativos, ocorrendo estresse oxidativo, onde a concentração destes oxidantes aumenta a capacidade de tamponamento antioxidante da célula. Dadas as obliquidades naturais das ERO, a maioria, se não todos os organismos, têm seus meios desenvolvidos para proteção dos seus constituintes celulares contra os oxidantes reativos.

### **Radical Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )**

Este radical é o mais comum e abundante na célula (Boveris, 1998), pode ser gerado em eventos de transporte de elétrons que ocorrem em cloroplastos e microsomas do retículo endoplasmático, ou por reações de autooxidação do oxigênio molecular (Santoro e Thiele, 1997). O radical superóxido é formado no

organismo principalmente através da cadeia de transporte de elétrons ou por ação de células fagocitárias (neutrófilos, monócitos e macrófagos) para defesa bactericida (Diaz *et al.*, 1998). Essas células fagocitárias produzem quantidades significativas do radical superóxido durante a fagocitose, devido à ativação da enzima NADPH oxidase que está presente na membrana dessas células. Entre as substâncias de interesse biológico que se autoxidam gerando o radical superóxido incluem-se a hemoglobina, a mioglobina e catecolaminas. Essas autooxidações são, geralmente, reações em cadeia nas quais o radical superóxido pode atuar como iniciador e propagador das cadeias radicalares. Apesar de o nome sugerir que esse radical tem alto poder oxidante, o superóxido atua na maioria das reações como um agente redutor (Oga, 2003).

### **Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

O peróxido de hidrogênio não é um radical livre por definição, porém é um intermediário reativo do oxigênio que se torna perigoso pelo alcance que tem, e por não reagir imediatamente, pois o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode migrar pela célula e atingir alvos distantes do local de sua formação. É uma ERO importante por sua capacidade de gerar o radical hidroxil (HO•) em presença de metais como ferro. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é formado principalmente na matriz mitocondrial, durante o processo de redução do oxigênio, ou pela dismutação do radical superóxido pela enzima Sod (Fridovich, 1998). Além de ser formado na reação de dismutação do superóxido e por fagócitos, também é um subproduto da assimilação oxidativa de várias fontes de carbono e nitrogênio, por peroxissomos e glioxissomos (Forman e Thomas, 1986). Algumas bactérias e micoplasmas também liberam peróxido de hidrogênio, que pode lesar células do hospedeiro, visto que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode atravessar membranas biológicas (Oga, 2003).

### Radical Hidroxil (HO•)

Na presença de íons ferro reduzido, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode originar um dos intermediários mais reativos de oxigênio, o radical hidroxil (HO•) através da reação de Fenton (Halliwell e Gutteridge, 2000) apresentada abaixo:



O radical hidroxil é extremamente reativo, ou seja, uma vez formado, tem uma meia vida extremamente curta, reagindo rápida e inespecificamente com os alvos celulares mais próximos, podendo lesar DNA, proteínas, carboidratos e lipídios. A capacidade desse radical em lesar as células é superior às demais ERO, já que o organismo não dispõe de um sistema enzimático de defesa contra o radical hidroxil (Halliwell e Gutteridge, 2000). Por isso, a melhor defesa que a célula tem contra este radical é preventiva, ou seja, evitar que o mesmo seja gerado. Na ausência da catálise pelos íons metálicos, a reação de Fenton ocorreria de forma muito lenta, caso realmente acontecesse (Gralla e Kosman, 1992). Por esta razão, a célula mantém um rígido controle da homeostase metálica. O transporte de metais é altamente regulado (Eide, 1998) e os íons de metais de transição são mantidos em sua valência mais alta, ou estão de alguma forma complexados a proteínas e enzimas, onde são armazenados ou fazem parte funcional das mesmas. A compartimentalização de compostos metálicos nos vacúolos e a ferritina podem ser considerados parte das defesas antioxidantes da célula (Halliwell e Gutteridge, 2000).

Em decorrência do alto teor de água nas células, a exposição destas às radiações ionizantes, como raios X e raios gama, resulta na formação do radical hidroxil pelo processo de radiólise da água. A reação do radical superóxido com o peróxido de hidrogênio forma o radical hidroxil através da reação de Haber-Weiss, seguida abaixo:



Apesar disso, a formação de HO<sup>•</sup> a partir do peróxido de hidrogênio pode ser catalisada pela presença de íons de metais de transição como mostrado na reação de Fenton anteriormente.

A presença de íons de metais de transição funciona como um fator que promove a formação de radicais livres. À medida que, mudam de um estado de valência para outro, esses íons podem perder ou ganhar um elétron. Os metais de transição presentes no organismo em maior abundância são o ferro e o cobre.

### **Oxigênio Singlet (O<sub>2</sub><sup>1</sup>)**

Outra espécie reativa do oxigênio capaz de modificar o DNA diretamente, é o oxigênio singlet excitado (Cadenas, 1989), cuja meia vida em tecidos é menor que 0,5 micro segundos (Patterson *et al.*, 1990). Esta espécie reativa pode ser gerada pelos fagócitos por indução luminosa, por reações catalisadas por peroxidases, etc (Cadenas, 1989; Epe, 1991). O O<sub>2</sub><sup>1</sup> difere do oxigênio molecular por não apresentar restrição na transferência de elétrons, o que o torna altamente reativo (Beckman e Ames, 1998), causando danos às proteínas devido à oxidação de grupos essenciais de aminoácidos, principalmente do triptofano, metionina, histidina e resíduos de cisteína (Halliwell e Gutteridge, 2000).

#### **2.2.1 Estresse oxidativo**

Os radicais livres formam-se em condições fisiológicas em proporções controladas pelos mecanismos defensivos celulares. O estresse oxidativo ocorre quando há uma falta de equilíbrio dinâmico entre a produção de oxidantes e a concentração de defesas antioxidantes, levando a danos celulares. Este estresse pode resultar de uma situação em que há uma diminuição nos níveis das enzimas antioxidantes, pela elevada produção de radicais livres, ou por ambos os processos simultaneamente. Os agentes oxidantes são formados no processo normal do metabolismo, mas em algumas condições patológicas, eles podem ser produzidos em excesso, levando ao estresse oxidativo e à possível morte celular.

Distúrbio do equilíbrio entre a formação e a remoção de ERO são associadas a uma série de processos patológicos, por exemplo câncer, isquemia, arteriosclerose, diabetes, mal de Alzheimer entre outras desordens neurológicas e não-patológicas, como por exemplo o envelhecimento (Hermes-Lima e Storey, 1998) (Pawlak *et al.*, 1998; Beckman e Ames, 1998, revisado por Salvador e Henriques, 2004).

## 2.2.2 Sistemas de defesa oxidantes

As células possuem sistemas de defesa enzimáticos e não-enzimáticos para proteger seus constituintes celulares e manter o estado redox celular. O sistema de defesa enzimático consiste tipicamente de pequenas moléculas que são solúveis em qualquer meio aquoso ou como em alguns exemplos, em meios lipídicos. Eles agem em geral como varredores de radicais, substância oxidada pelas ERO e assim removem os oxidantes da solução (Halliwell e Gutteridge, 2000).

### 2.2.2.1 Sistemas de defesas enzimáticas

As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a atividade da superóxido dismutase (Sod), catalase (Cat), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione S-transferase (GST). Para minimizar os efeitos tóxicos dos radicais livres formados, é necessário um adequado equilíbrio das enzimas antioxidantes citadas acima (Sies, 1993, Inoue, 1994, Bonnefoy *et al.*, 2002).

Os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) se dismutam por ação da atividade da superóxido dismutase, produzindo peróxido de hidrogênio e oxigênio simples ( $O_2$ ) como mostra a reação:



As células da levedura, em comum com outros eucariotos, possuem duas formas de Sod intracelular, o homodímero que contém cobre e zinco (CuZnSod - codificada pelo gene da *SOD1*), que se encontra no citosol e na matriz nuclear, e um homotetrâmero que contém manganês (MnSod - codificada pelo gene da *SOD2*), que se encontra predominantemente na matriz mitocondrial (Bermingham-McDonogh *et al.*, 1988, Deby e Goutier, 1990).

A Cu/ZnSod é a maior enzima envolvida na remoção dos ânions superóxido do citoplasma e possivelmente também do peroxissoma (Gralla e Kosman, 1991; Jamieson *et al.*, 1994), enquanto a função fisiológica da MnSod, parece ser para proteger a mitocôndria dos superóxidos gerados durante a respiração e exposição ao etanol, e parece ter uma função contrária à toxicidade aumentada aos componentes do ciclo-redox durante o crescimento fermentativo (Costa *et al.*, 1997; Guidot *et al.*, 1993; Jamieson *et al.*, 1994). Há também evidências funcionais da Cu/ZnSod em células protetoras contra a respiração derivada dos ânions superóxidos (Ayub *et al.*, 1992). Por exemplo, as mutantes nulas *sod1* deixam de crescer em meios contendo lactato como única fonte de carbono (um típico fenótipo de células respiratórias deficientes) (Gralla e Kosman, 1991). Atualmente, fica evidente que a Cu/ZnSod pode ter uma função no tamponamento da concentração de cobre intracelular, além disso, esta função não aparece relatada como função de proteção contra o estresse oxidativo (Culotta *et al.*, 1995).

A enzima catalase é uma ferrihemoenzima cuja função principal é dismutar peróxido de hidrogênio formando água e oxigênio molecular (Fridovich, 1998). Na reação da catalase, que inativa a  $H_2O_2$ , uma das duas moléculas de peróxido de hidrogênio é oxidada a oxigênio-molecular e a segunda é reduzida à água, mostrada na seguinte reação:



A glutathiona peroxidase, por sua vez, reduz o peróxido de hidrogênio, os peróxidos alifáticos e os aromáticos à água e seu correspondente álcool inerte,

em uma reação que precisa da presença de glutathiona reduzida (GSH) como fonte de equivalentes redutores.



A figura 4 apresenta um resumo da detoxificação enzimática realizada por Sod, Cat, GPx e GR:

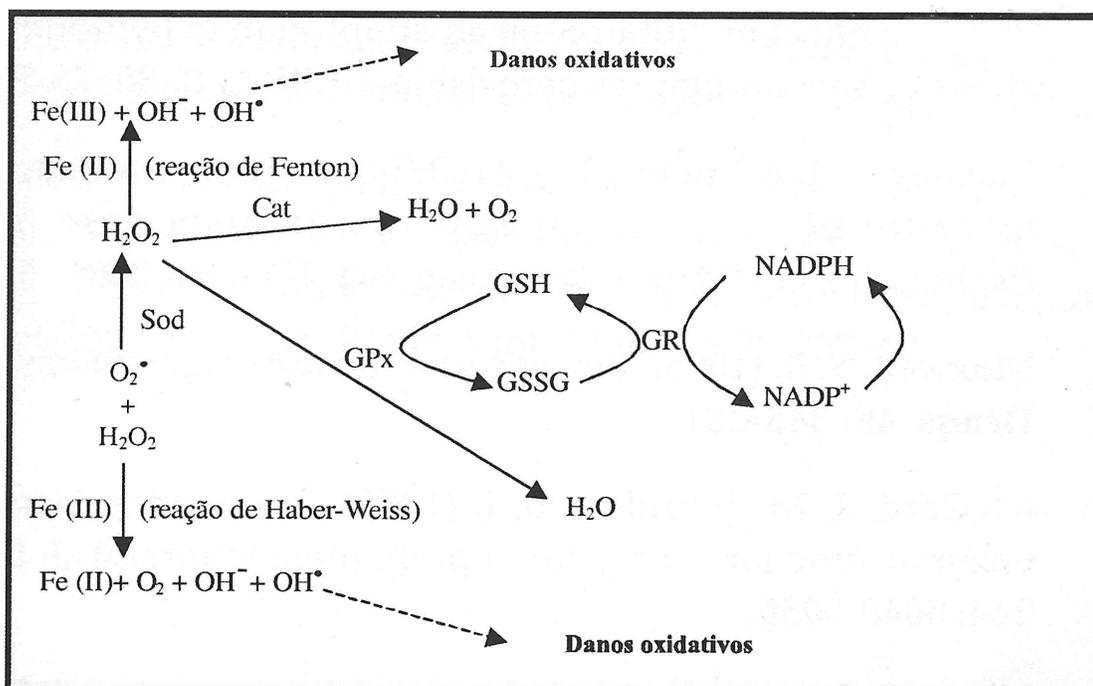


Figura. 4. Detoxificação enzimática realizada por Sod, Cat e GPx (Salvador e Henriques, 2004).

### 2.2.2.2 Sistemas de defesa não-enzimáticos

O mais conhecido exemplo de sistema de defesa não-enzimático é a glutathiona, um tripeptídeo  $\gamma$ -L-glutamil-L-cistinilglicina. A glutathiona reduzida (GSH) age como um varredor de radical com grupo sulfidril com ação redox, reagindo com oxidantes para produção de glutathiona oxidada (GSSG). A glutathiona é possivelmente a mais abundante molécula limpadora-redox nas células (Marchler *et al.*, 1993), e conseqüentemente esta função é a mais importante na manutenção do estado redox celular.

Os genes envolvidos na biossíntese da GSH são identificados em *S. cerevisiae* (*GSH1* e *GSH2*, codificando a sintetase  $\gamma$  - glutamilsteína e sintetase glutationa, respectivamente) (Kistler *et al.*, 1986; Ohtake *et al.*, 1990, Ohtake e Yabuuchi, 1991).

Entre os antioxidantes não enzimáticos também pode-se citar a vitamina C, a vitamina E, ubiquinol, os carotenóides e os flavonóides (Machlin e Bendich, 1987). A vitamina C elimina os radicais livres do plasma, citosol e outros compartimentos aquosos. A vitamina E e outros antioxidantes hidrofóbicos atuam fundamentalmente nas membranas e nas bicamadas lipídicas (Halliwell e Gutteridge, 2000). Os flavonóides são potentes antioxidantes capazes de atuar como aceptores de radicais livres (Husain *et al.*, 1987; Yuting *et al.*, 1990) ou de íons metálicos (Afanas'av *et al.*, 1989).

Os fitoquímicos fenólicos constituem a maior categoria de fitoquímicos de espécies vegetais. Os três grupos mais importantes para a alimentação humana são os flavonóides, ácidos fenólicos e polifenóis (Angelis, 2001).

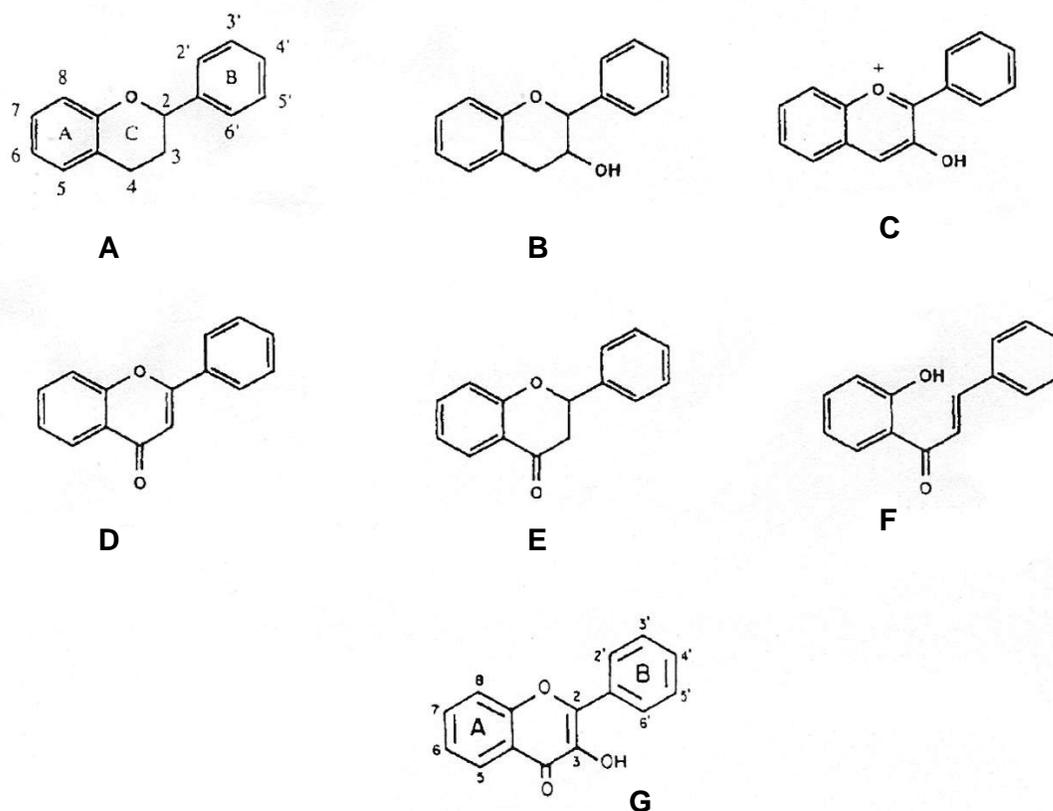
### **Propriedades farmacológicas dos flavonóides**

Os flavonóides constituem um grupo de substâncias naturais, que possuem atividades biológicas diversificadas e estudando sua ação como antioxidante, foram desenvolvidas muitas pesquisas, envolvendo não só os compostos flavonoídicos, como também os seus precursores biossintéticos (Richardson *et al.*, 1974; Pratt e Birac, 1979; Rios *et al.*, 1992). Os compostos polifenólicos estão presentes em frutas e vegetais (Angelis, 2001) como nozes, sementes, ervas, especiarias, flores, em diversos chás e vinho tinto. Eles são importantes compostos de frutas cítricas (Kefford e Chandler, 1970), aparecem em diversas fontes de alimentos e são consumidos regularmente na dieta humana (Herrmann, 1976). O consumo destes compostos tem sido associado a efeitos protetores contra doenças cardiovasculares e cânceres (Angelis, 2001).

Mais de 4000 estruturas exclusivas dos flavonóides foram identificadas de plantas (Harborne *et al.*, 1975; Harborne, 1986; 1988 a,b). Primeiramente, eram reconhecidos como pigmento responsável pelas cores amarelo, laranja e vermelho, em flores e alimentos (Timberlake e Henry, 1986; Brouillard e

Cheminant, 1988). Os flavonóides são metabólitos secundários de plantas e estas os usam para atrair polinizadores e repelir predadores, para colorir flores e para a proteção de raios ultravioletas, quando expostas ao sol (Angelis, 2001).

Essas substâncias de baixo peso molecular, encontradas em todas as plantas vasculares, são fenilbenzo-pironas (fenilcromonas) com variedades de estruturas baseadas em núcleos comuns de três anéis. Eles são geralmente subdivididos de acordo com seus substituintes dentro dos flavonóides, antocianidinas e flavonas, flavononas e chalconas (Figura 5). Esta estrutura básica é composta de dois anéis benzeno (A e B) ligadas a um anel pirano heterocíclico (C) ou pirona (com uma ligação dupla) no centro, mostrados na figura 5. Esta subdivisão está baseada primeiramente na presença (ou ausência) de ligação dupla na posição 4 do anel C (no centro), e a presença (ou ausência) da ligação dupla dos átomos de carbono 2 e 3 do anel C, e a presença dos grupos hidroxil no anel B (Figura 5). Na estrutura do flavonóide, um grupo fenil é geralmente substituído na posição-2 do anel pirona (anel C). Nos isoflavonóides, as substituições acontecem na posição-3 deste anel (Bilyk e Sapers, 1985; Hertog *et al.*, 1992; Rice-Evans e Packer, 1998).



	5	7	2'	3'	4'	5'
QUERCETINA	OH	OH	-	OH	OH	-
CANFEROL	OH	OH	-	-	OH	-
MIRICETINA	OH	OH	-	OH	OH	OH

Figura 5. Estrutura genérica dos flavonóides, também chamada de núcleo fundamental (letra A). A estrutura do Flavon-3-ol (letra 'G') também mostra a estrutura genérica dos flavonóides, mostrando o grupo hidroxil do anel 'C', juntamente com os outros compostos representativos (adaptado de Middleton *et al.*, 2000). Os flavonóis mais encontrados são a quercetina, canferol e miricetina. Abaixo da figura 5 são mostrados os substituintes radical hidroxil, os quais formam os compostos citados acima. Os nomes das 7 estruturas químicas representadas e suas respectivas nomenclaturas são: **A**= flavonóide; **B**= flavan-3-ol; **C**= antocianidina; **D**= flavona; **E**= flavonona; **F**= chalcona; **G**= flavon-3-ol.

Os flavonóides apresentam efeitos importantes na fisiologia e bioquímica da planta, como ação antioxidante, inibidores enzimáticos, precursores de substâncias tóxicas e exibindo pigmentos coloridos. Estes compostos estão envolvidos na fotossensibilização e na transferência de energia, em ações de hormônios regulatórios do crescimento da planta, no controle respiratório, na fotossíntese, em morfogêneses, na determinação do sexo e bem como na defesa contra infecções (Smith e Banks, 1986).

Pratt e Birac (1979) estudaram os efeitos antioxidantes da quercetina, quercitrina, miricetina, quercetina 3-monoglicosídeo, quercetina 3-triglicosídeo, extraídos de sementes de diversas plantas. Rios *et al.* (1992) testaram os efeitos de cinco flavonóides glicosilados de *Sideritis javalambrensis* como inibidores da peroxidação de lipídeos nos microsomas. Richardson *et al.* (1974) testaram o efeito de flavonas e derivados de flavonas como antioxidantes em amostras de leite e comprovaram a eficácia de suas ações. Vários antioxidantes naturais, principalmente os compostos fenólicos, também foram encontrados em muitos vegetais, conforme trabalhos realizados por Harel e Kanner (1984), Farr *et al.* (1988), Sheabar e Neeman (1988), Namiki (1990), Pratt e Hudson (1990), Loliger (1991) e Kanner *et al.* (1994).

Os processos de lipoperoxidação podem ocorrer atacando as membranas celulares. Os flavonóides quercetina e canferol têm-se mostrado ativos como agentes antiinflamatórios, atuando na inibição da biossíntese de eicosanóides envolvidos em processos inflamatórios via atividade antiradicalar e antiperoxidante (Larson, 1988). Os seus efeitos antioxidantes se devem à capacidade de diminuir os radicais livres e dentre eles, a quercetina parece ser o mais potente antioxidante (Angelis, 2001). Propõe-se então, que os flavonóides exerçam efeitos benéficos em diversos estados patológicos, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e em desordens neurovegetativas. Muitas ações biológicas destes compostos são atribuídas às suas propriedades antioxidantes, e à sua possível influência do estado redox intracelular. O mecanismo preciso exercido pelos flavonóides destas ações benéficas e tóxicas ainda permanece pouco conhecido. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que sua atividade antioxidante clássica de doação de hidrogênio (Rice-Evans, 1995; Rice-Evans *et*

*al.*, 1996, 1997; Rice-Evans, 2001) é pouco provável ser a única explicação para os efeitos celulares benéficos sugeridos (Spencer *et al.*, 2001c).

Primeiramente, os flavonóides eram metabolizados *in vivo*, resultando em uma significativa alteração no seu potencial redox. Isto tornou claro que a forma bioativa dos flavonóides *in vivo* não era aquela encontrada nas plantas, como por exemplo, os glicosídeos e aglicona. Em vez de conjugado e metabolizado, originando glicosídeos e aglicona durante a absorção intestinal (Spencer *et al.*, 2003), há uma forte evidência do metabolismo na fase I e II de deglicosilação, que resulta a aglicona como quercetina, hesperetina, naringenina e epicatequina para glicuronides, sulfatos e formas O-metiladas, durante a passagem através do intestino delgado (Spencer *et al.*, 1999; Spencer *et al.*, 2001b,c) e novamente para o fígado. Além disso, a transformação tem sido relatada ocorrer no cólon, onde as enzimas da microflora intestinal degradam os flavonóides a simples ácidos fenólicos (Scheline, 1999), que podem ser também absorvidos e, subseqüentemente, metabolizados pelo fígado.

Após pesquisas na área da farmacologia de alimentos fitoquímicos, um grande número de relatos tem estabelecido que os compostos fenólicos de plantas, incluindo os flavonóides, são potentes antioxidantes e também há relatos de possíveis efeitos antimutagênicos e anticarcinogênicos dos mesmos (Middleton e kandaswami, 1994; Rice-Evans *et al.*, 1997). Também têm sido mostrados relatos sugerindo que uma dieta rica em compostos fenólicos exibem propriedades pró-oxidantes e citotóxicas, sob certas condições (Summers e Felton, 1994; Yamanaka *et al.*, 1997; Sugihara *et al.*, 1999). Esta atividade antioxidante/pró-oxidante dos compostos fenólicos pode depender de determinados fatores, tais como o potencial de redução de metal, pH e das características de solubilidade (Decker, 1997). Muitos extratos de plantas, particularmente os que contêm flavonóides, parecem apresentar uma significativa atividade antioxidante, capaz de diminuir os efeitos nocivos gerados pelos radicais livres (RL), e conseqüentemente o surgimento de doenças associadas à ação destes RL.

### 3 ENSAIOS PARA DETECÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA EM EUCARIOTOS

Vários ensaios para identificação de agentes mutagênicos e/ou genotóxicos vem sendo desenvolvidos (Mac Gregor *et al.*, 2000). As mutações são detectadas freqüentemente através da expressão fenotípica, causada por uma mudança súbita e hereditária no genótipo de um organismo, alterando suas características. A ocorrência de mutações, no entanto, depende da natureza da lesão e das respostas celulares aos danos no DNA. Basicamente, as mutações são divididas em duas grandes categorias: mutações gênicas e cromossômicas. As mutações gênicas são alterações que ocorrem na seqüência de nucleotídeos do DNA e as cromossômicas são as que produzem alterações no número ou na estrutura dos cromossomos e são detectadas através de análises citogenéticas (Friedberg *et al.*, 1995). Dependendo do tipo de lesão que se quer detectar são necessários, portanto, diferentes testes.

Bactérias como *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* são utilizadas nos métodos mais amplamente empregados para detecção de mutações gênicas. Mas, como estas bactérias são organismos simples, os resultados obtidos nem sempre são válidos para células animais ou outros eucariontes. Portanto, para se obter dados sobre mutação gênica em eucariotos há testes em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), em *Drosophila* ou mesmo mutações somáticas em mamíferos, pelo teste de HGPRT (gene de hipoxantina-guanina fosforibosil-transferase, ligado ao cromossomo X dos mamíferos). Para detectar mutações cromossômicas os testes mais utilizados incluem as aberrações cromossômicas e micronúcleos, sendo que estes testes exigem que as células estejam em estado proliferativo (Le Curieux *et al.*, 1993; Tice *et al.*, 1998, MacGregor *et al.*, 2000).

Estes testes têm um sistema de validação internacional e podem ser desenvolvidos tanto *in vitro* como *in vivo*, desde que se conheça adequadamente a biologia do organismo-teste. Recentemente, o teste alcalino eletroforético de célula única ou Ensaio Cometa (EC), que detecta quebras no DNA, também tem sido recomendado (Fairbairn *et al.*, 1995; Tice, 1995; Singh e Stephens, 1996; Singh, 2000), sendo este realizado em células individuais não proliferativas.

#### 4 A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* COMO MODELO DE ESTUDO EUCARIOTO

A levedura *S. cerevisiae* é um organismo eucarioto amplamente estudado e notavelmente semelhante às células de mamíferos no que se refere às macromoléculas, organelas e proteínas com homologia a proteínas humanas, tornando-a uma ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese, reparo do DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo (Costa e Ferreira, 2001).

As leveduras podem crescer tanto em condições anaeróbias quanto aeróbias e, portanto, são expostas continuamente às ERO geradas como bioprodutos do metabolismo (Costa e Ferreira, 2001). A *S. cerevisiae* pertence ao grupo das leveduras anaeróbias facultativas. Isto significa que ela fermenta hexoses, como a glicose e a frutose, independente da concentração de oxigênio. A glicose é a principal fonte de carbono da *S. cerevisiae*, uma preferência que é mediada por um complexo processo de repressão e ativação de genes e de proteínas, usualmente conhecida como repressão da glicose ou repressão catabólica (revisado em De Winde *et al.*, 1997; Gancedo, 1998). Quando a concentração de glicose cai para menos de 0,2% no meio, há a desrepressão das enzimas que participam da biossíntese na mitocôndria e de outros genes necessários para o crescimento respiratório (De Winde *et al.*, 1997; Gancedo, 1998). Este crescimento apresenta fases distintas do ponto de vista metabólico e cinético (figura 6). Após um breve período de adaptação em meio rico (YEPD – 2% glicose), chamado de fase lag, as células iniciam uma divisão celular a cada hora e meia (fase exponencial), com energia proveniente da fermentação da glicose. Ao diminuir a disponibilidade de glicose no meio, ocorre a desrepressão catabólica (transição diáuxica), na qual há uma parada transiente na divisão celular, enquanto as células são preparadas para o metabolismo respiratório. Após, ela reassume a divisão celular em um ritmo mais lento (uma divisão a cada três ou quatro horas), utilizando o etanol como fonte de carbono produzido durante a fermentação (fase pós-diáuxica). Quando todas as fontes de carbono

forem exauridas, as células entram na fase estacionária na qual podem sobreviver por muito tempo na ausência de nutrientes (Pringle e Hartwell, 1982; Fuge e Werner, 1997).

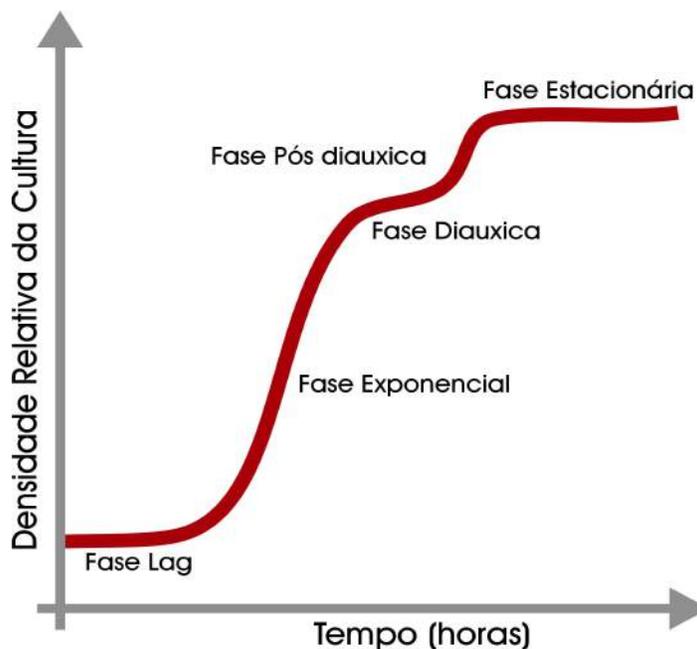


Figura 6. Fases de crescimento de uma levedura selvagem quando iniciada em meio completo (Adaptado de Fuge e Werner, 1997).

#### 4.1 Defesas antioxidantes da levedura *S. cerevisiae*

Como todos os aeróbios, a *S. cerevisiae* apresenta uma variedade de mecanismos de defesa contra danos oxidativos, como atividades enzimáticas, presença de antioxidantes, seqüestradores de metais e diversos mecanismos de reparação (Maris *et al.*, 2001; Brozmanová *et al.*, 2001; Henriques *et al.*, 2001). As superóxido dismutase (Sod) são enzimas que fazem a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio. A levedura *S. cerevisiae* contém a Mn-Sod (produto do gene *SOD2*) localizada na matriz da mitocôndria e CuZn-Sod (produto do gene *SOD1*) presente no citoplasma, núcleo e lisossomos (Gralla e Valentine, 1991; Gralla e Kosman, 1992; Longo *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1998; Longo *et al.*,

1999). As linhagens mutantes *sod1Δ*, que são deficientes nesta enzima, apresentam problemas de crescimento em condições aeróbias, são muito sensíveis a hiperóxia (Bilinski *et al.*, 1985), a substâncias envolvidas em reações tipo ciclo-redox, tais como paraquat ou menadiona, perdem a viabilidade em fase estacionária e são auxotróficas para metionina e lisina em presença de oxigênio (Srinivasan *et al.*, 2000). Acredita-se que estas auxotrofias se devem a enzimas relacionadas à síntese destes aminoácidos, que seriam extremamente sensíveis à desativação por  $O_2^{\bullet-}$  (Liu *et al.*, 1992, Slekar *et al.*, 1996). As mutantes *sod2Δ* são hipersensíveis ao oxigênio e crescem mal ou não crescem em fontes de carbono não-fermentáveis. A sensibilidade a hiperóxia é revertida pela mutação *rho<sup>0</sup>* (leveduras sem mitocôndrias), confirmando o papel decisivo da mitocôndria na geração de  $O_2^{\bullet-}$  (Guidot *et al.*, 1993; Fernández-Checa *et al.*, 1998).

Mutantes *sod1Δ* e *sod2Δ* mostram níveis de ferro, detectado por Ressonância Paramagnética de Elétron (EPR), de até cinco vezes maiores em relação aos níveis basais da linhagem selvagem isogênica, enquanto a duplo mutante *sod1Δsod2Δ* apresenta níveis de ferro superiores a nove vezes o encontrado para a selvagem, em condições aeróbias de crescimento. O tratamento da linhagem selvagem com um gerador de superóxido - paraquat, também aumentou o ferro detectável por EPR, indicando que o excesso de ferro livre pode ser devido aos efeitos deletérios do radical superóxido (Srinivasan *et al.*, 2000).

O peróxido de hidrogênio pode ser catabolizado pelas catalases e peroxidases. Em levedura, a resistência a peróxido tem sido associada a níveis intracelulares de glutathiona (Izawa *et al.*, 1995; Kobayashi *et al.*, 1996). O gene *GSH1* é necessário para a síntese de  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase, a enzima responsável pelo primeiro passo, e é ponto limitante da biossíntese de glutathiona (GSH); e o gene *GSH2* codifica a glutathiona sintetase, a segunda enzima da síntese de glutathiona. Ambos foram clonados e as mutantes correspondentes analisadas (Ohtake e Yabuuchi, 1991; Lisowsky, 1993; Grant *et al.*, 1997; Brendel *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1998). As mutantes *gsh1Δ* induzem apoptose (Madeo *et al.*, 1999) e morrem rapidamente quando nenhuma GSH exógena é fornecida. A GSH endógena é importante para a manutenção da integridade mitocondrial.

Mesmo em meio suplementado com GSH, as mutantes *gsh1Δ* têm uma alta tendência de perder a função mitocondrial (Schmidt e Mcentee, 1996; Brendel *et al.*, 1998). Além disso, as leveduras mutantes *gsh1Δ* não adquirem resistência intrínseca sob condições não-fermentáveis, e na fase estacionária contra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Maris *et al.*, 2000) e não mostraram respostas adaptativas ao estresse por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante a fase exponencial em meio YEPD-glicose (Izawa *et al.*, 1995).

Duas catalases, uma citosólica e uma peroxissomal, codificadas pelos genes *CTT1* e *CTA1*, respectivamente, também foram identificadas (Spevak *et al.*, 1983; Hartig e Ruis, 1986; Cohen *et al.*, 1988). Ambas são importantes para a resposta adaptativa ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Izawa *et al.*, 1996). A regulação do gene *CTT1* pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é mediada pelo elemento de resposta ao estresse ('Stress Responsive Elements – STRE'). As leveduras *ctt1Δ* e *cta1Δ* mutantes são bastante sensíveis a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Izawa *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 1998).

A simplicidade do cultivo e caracterização genética, as fases de crescimento características e controláveis, e sua marcante semelhança aos sistemas de estudo em eucariotos superiores, fazem da levedura um sistema modelo ideal para estudo de danos oxidativos e funções mitocondriais (Longo *et al.*, 1999).

#### **4.2 Avaliação genotóxica: testes de mutações reversas**

Os ensaios com leveduras têm sido de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos, servindo para complementar os ensaios de mutagenicidade realizados em bactérias (Henriques *et al.*, 1987; Poli *et al.*, 1999; Terziyska *et al.*, 2000). Estes ensaios são rápidos, sensíveis, econômicos e reprodutíveis, apresentando resultados confiáveis na identificação biológica. Além disto, a levedura possui um sistema endógeno de ativação metabólica constituído por um complexo enzimático (citocromo P-450) e detoxificação, sem a necessidade da adição de um sistema exógeno, sendo desta forma, uma vantagem sobre os ensaios bacterianos (Paula-Ramos *et al.*, 1991; Moreno *et al.*, 1991; Poli *et al.*, 1999).

Experimentos de mutações reversas são os mais comumente utilizados. Estes se baseiam na restauração ou compensação de um defeito gênico responsável por um requerimento nutricional (Zimmermann, 1975). A restauração se deve a uma reversão exata do defeito original, enquanto que a compensação pode ser devido a uma mutação secundária dentro do gene (mutação supressora interna) ou por uma mutação externa, como no caso dos alelos sem sentido (*nonsense* – mutação que resulta na alteração de um códon que determina um aminoácido para um códon de terminação da síntese protéica) (Hawthorne e Leopold, 1974; Atkin *et al.*, 1993). A reversão de auxotrofia para prototrofia pode ser causada por uma substituição, inserção ou deleção de pares de bases, ou ainda uma mutação induzida por supressor do gene mutante original (Henriques *et al.*, 1987). Para que seja identificada a mutação reversa é necessária à utilização de uma linhagem com alterações genéticas adequadas, como por exemplo, a linhagem haplóide de *S. cerevisiae* XV185-14c, isolada por Von Borstel (Parry e Parry, 1984). Esta linhagem permite a detecção de dois tipos de mutações locus específico: reversões do alelo ocre *lys1-1* (alteração no códon UAA de término de cadeia) ou do alelo *missense his1-7* (códon alterado codifica um aminoácido diferente), e reversões por deslocamento do quadro de leitura do DNA (*frameshift*) verificadas no locus *hom3-10*. As células revertentes podem ser detectadas pela semeadura em placas contendo meio seletivo no qual o fator de crescimento inicialmente requerido não está presente, ou está em quantidades muito pequenas, permitindo um “background” de crescimento.

#### **4.3 O estudo de substâncias com atividades pró-e/ou antioxidantes**

A levedura *S. cerevisiae* vem sendo utilizada como modelo de estudo experimental de proteção antioxidante em estudos de reparo do DNA. Linhagens isogênicas deficientes em defesas antioxidantes têm sido utilizadas para o estudo do mecanismo de ação de agentes físicos e químicos que interferem com o estado redox celular (Brennan e Schiestl, 1998; Lee *et al.*, 2001). Um método utilizado consiste em comparar a sensibilidade ao tratamento com um agente físico (por exemplo, radiação) ou químico (por exemplo pró/antioxidante), de

diversas mutantes deficientes em enzimas antioxidantes ou em um fator de transcrição sensível ao estado redox, como o Yap1p, ou ainda deficiente na síntese de GSH, a fim de avaliar a importância de cada defesa antioxidante celular na desintoxicação do agente testado. Também é possível combinar um oxidante conhecido, como  $H_2O_2$ , t-BOOH (peróxido de terc-butil) e paraquat, com uma substância antioxidante ou com outro composto de mecanismo desconhecido, e avaliar o efeito do tratamento da substância na modulação do estresse oxidativo. O aumento da viabilidade celular ao tratamento estará sugerindo atividade protetora (antioxidante) e a diminuição da viabilidade a um efeito deletério (pró-oxidante) (Maris *et al.*, 2000).

Respostas adaptativas ao estresse oxidativo também podem ser encontradas em levedura. Células pré-tratadas com concentração subletal de um oxidante ( $H_2O_2$ , t-BOOH, paraquat) apresentam indução de uma resposta protetora que permite que as mesmas sobrevivam a um tratamento com concentrações mais altas ou letais do oxidante (Kuge e Jones, 1994; Izawa *et al.*, 1995; 1996; Grant *et al.*, 1998). Esta resposta adaptativa não é restrita ao estresse oxidativo, sendo que em levedura a resposta adaptativa mais conhecida é a do choque térmico. Respostas similares também ocorrem para o estresse osmótico, para agentes que provocam danos ao DNA e para outros tipos de estresse. O pré-tratamento com um tipo de agente estressor pode também induzir resistência cruzada contra outro tipo de agente estressor (Park *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Sugiyama *et al.*, 2000). Esses estudos demonstram a complexidade de sistemas altamente regulados que evitam os danos celulares. A regulação desses sistemas em leveduras pode ser mais complexa do que daqueles de organismos aeróbios, pois a levedura é um aeróbio facultativo (Maris *et al.*, 2001).

Maris *et al.* (2000) demonstraram que a capacidade antioxidante das leveduras em crescimento fermentativo está bastante diminuída em relação a leveduras que não fermentam e que esta diferença não depende da função mitocondrial, ou seja, que o sistema antioxidante da levedura está sujeito à repressão por glicose, também conhecida por repressão catabólica.

Em *S. cerevisiae* foi demonstrado que uma exposição prévia ao dióxido de hidrogênio -  $H_2O_2$  e menadiona (gerador de superóxido) aumenta a resistência

a níveis anteriormente tóxicos destes compostos, através da indução de genes e proteínas. Recentemente, foi proposta a existência de dois regulons paralelos de resposta a estresse por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que seriam controlados pelos fatores de transcrição Yap1 e Skn7, envolvendo a indução de mais de 30 proteínas (Lee *et al.*, 1999). Os genes controlados por Yap1 codificam produtos essenciais na manutenção do estado redox da célula.

Desta forma, testes em células eucarióticas da levedura *S. cerevisiae*, tanto proficientes como deficientes em sistemas de reparação de danos causados por estresse oxidativo, assumem um importante papel na verificação da capacidade oxidante e antioxidante, e na determinação do possível mecanismo de ação dos produtos testados.

## 5 OBJETIVOS

- Preparar um extrato hidroalcoólico das partes aéreas da planta *Costus spicatus*, nas mesmas condições em que ele é vendido e consumido pela população;
- Avaliar os possíveis efeitos citotóxico, mutagênico e antimutagênico do extrato hidroalcoólico, utilizando a levedura *S. cerevisiae* como modelo *in vivo* de estudo;
- Realizar o fracionamento químico das partes aéreas de *Costus spicatus*, utilizando solventes em uma seqüência crescente de polaridade (hexano, clorofórmio e metanol);
- Testar a atividade antioxidante *in vivo* do extrato hidroalcoólico e da fração metanólica (mais polar) obtida de *Costus spicatus*, utilizando linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e deficientes em proteção antioxidante.

## **6 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **6.1 Amostra vegetal**

Partes aéreas secas da planta *Costus spicatus* foram gentilmente cedidas pela empresa Santos-Flora (São Paulo – SP, Brasil). O laudo botânico foi também realizado e fornecido pela referida empresa.

### **6.2 Preparação dos extratos**

#### **6.2.1 Extrato hidroalcoólico**

Para preparação do extrato hidroalcoólico as partes aéreas secas da planta foram colocadas em maceração com álcool 50% em proporção de 1:5, ou seja, uma parte da planta para cada cinco partes do solvente, durante 21 dias, à temperatura ambiente, acondicionada em frasco âmbar.

#### **6.2.2 Extratos orgânicos**

A partir das partes aéreas de *Costus spicatus* iniciou-se o processo de fracionamento, no qual o material vegetal (1:2) foi submetido à extração por maceração, utilizando solventes em polaridade crescente (hexano, clorofórmio e metanol). Este processo foi repetido com cada solvente até o esgotamento da planta. Após, os extratos foram concentrados à secura em aparelho de evaporação rotatória, obtendo-se as frações hexânica, clorofórmica e metanólica das partes aéreas da planta. Todas as frações foram estocadas em frasco âmbar e deixadas evaporar completamente em capela de exaustão à temperatura ambiente.

### **6.3 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae***

Na tabela 1 estão apresentadas as linhagens de *S. cerevisiae* com seus genótipos relevantes. A linhagem XV185-14c foi utilizada nos experimentos de mutagênese e antimutagênese e as demais foram empregadas no ensaio de atividade antioxidante. A linhagem EG118 é defectiva no sistema enzimático que

envolve a enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD - produto do gene *SOD1*), enquanto a EG110 o é na *SOD* mitocondrial (MnSOD - produto do gene *SOD2*); EG133 é o duplo mutante, defectivo para *SOD1* e *SOD2* EG103 corresponde à linhagem selvagem, portanto proficiente nestas enzimas.

Tabela 1. Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste estudo.

<b>Linhagens</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Origem</b>
XV 185-14c	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-2 arg4-17 his1-7 lys1-1 trp5-48 hom3-10</i>	<b>Van Borstel, Canada</b>
<i>EG103 (WT)</i>	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3, 112 his3-1, trp1-289 ura3-52</i>	<b>Edith Gralla, L Angeles</b>
<i>EG118 (sod1)</i>	mesmo que <i>EG103</i> , exceto <i>sod1::URA3</i>	<b>Edith Gralla, L Angeles</b>
<i>EG110 (sod2)</i>	mesmo que <i>EG103</i> ; exceto <i>sod2::TRP1</i>	<b>Edith Gralla, L Angeles</b>
<i>EG133 (sod1sod2)</i>	mesmo que <i>EG103</i> , exceto <i>sod1::URA3 sod2::TRP1</i>	<b>Edith Gralla, L Angeles</b>

#### 6.4 Meios de cultura e soluções

O crescimento das células foi feito em meio líquido completo (YEL) contendo 1% de extrato de levedura, 2% de bactopectona e 2% de glicose obtidos da marca Difco, Oxoid ou Vetec. Para determinação do número de células viáveis, ou seja, unidades formadoras de colônias, foram feitas sementeiras em meio YEPD solidificado com 2% de bacto-ágar, marca Vetec (Ausubel *et al.*, 1989).

Para todos os tratamentos, as células foram ressuspensas e diluídas em solução salina (NaCl 0,9%).

Nos testes de mutagênese e antimutagênese foi empregado o Meio Sintético (SC) suplementado (SC-histidina, SC-lisina e SC-homoserina), nos quais os aminoácidos foram omitidos, conforme descrito por Ausubel *et al.* (1989).

#### 6.5 Condições de crescimento

Células em fase estacionária de crescimento foram obtidas a partir de uma colônia isolada, retirada da placa e colocada para crescer em meio líquido YEL, por 48 horas, a 30°C, até atingir a concentração de  $2-4 \times 10^8$  células/mL.

As linhagens EG103, EG118, EG110 e EG133 não eram crescidas com agitação, a fim de evitar o acúmulo de supressores.

Culturas em fase exponencial foram obtidas por incubação de  $2 \times 10^6$  células/mL de uma pré-cultura em fase estacionária, também em meio YEL. Após cerca de 4 horas de incubação, nas mesmas condições acima descritas, a cultura alcançava a fase exponencial de crescimento ( $1-2 \times 10^7$  células/mL), com uma percentagem de 50-70% brotos.

### **6.6 Detecção da atividade mutagênica e antimutagênica**

Para os ensaios de mutagenicidade e antimutagenicidade (figura 7) utilizou-se a linhagem XV185-14c de *S. cerevisiae*. Em frasco de Erlenmeyer contendo 30 mL de YEL foi inoculada uma colônia isolada dessa linhagem e colocada para crescer em 'shaker' (incubadora com agitação orbital – LABLINE), a 180 rpm e 30°C, durante 48 horas, para atingir a fase estacionária. As culturas assim mantidas atingiam uma concentração de 2 a  $4 \times 10^8$  céls/mL. Posteriormente, esta suspensão foi passada para um tubo Falcon de 50 mL e centrifugada por 5 minutos a 5000 rpm. Após esta primeira centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 20mL de solução salina, seguido de centrifugação para lavagem das células. Este procedimento foi repetido duas vezes. As células foram então contadas em câmara de Neubauer no microscópio óptico e foram feitas as diluições necessárias para se obter a concentração celular desejada para o tratamento. Uma suspensão celular de  $2 \times 10^8$  células/mL em fase estacionária foi incubada durante 20 horas a 30°C, sob agitação a 180 rpm, com doses crescentes (50-500µL/mL de suspensão celular) do extrato hidroalcoólico da *Costus*. Determinou-se a sobrevivência através de semeadura em meio rico YEPD, após 3-5 dias de crescimento em estufa a 30°C. Para a detecção de mutação induzida (revertentes das marcas LIS, HIS ou HOM) as células foram incubadas em meio mínimo seletivo, durante 3-5 dias a 30°C. A mutação *his1-7* é um alelo de sentido incorreto ou *missense*, do tipo não supressivo, e, portanto, as reversões são a consequência de mutações no próprio locus. Entretanto, o alelo *lys1-1* corresponde a uma mutação do tipo ocre sem sentido (*nonsense*), a qual pode ser revertida de forma locus específico ou

através de mutação para frente (mutação forward) em um gene supressor. A diferença entre as reversões verdadeiras e mutações supressoras (*forward*) no locus *lys1-1* está bem descrita por Schüller e Von Borstel (1974), onde o conteúdo de adenina reduzido no meio SC-lys mostra reversão no locus quando as colônias são vermelhas e mutações supressoras quando as colônias ficam brancas. Acredita-se que *hom3-10* contenha mutação do tipo deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift*, devido a sua resposta a uma série de agentes sabidamente mutagênicos.

Para os experimentos de antimutagenese, dois tipos de tratamento foram realizados:

1. Pré-tratamento: a linhagem foi incubada por 16 horas (a 30°C com agitação a 180 rpm), com diferentes doses do extrato hidroalcoólico da planta, sendo posteriormente adicionado o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 16mM por mais uma hora, sendo então semeada a sobrevivência e a mutagenese em meios específicos (SC-lys, SC-hom e SC-his);
2. Tratamento simultâneo: a mesma linhagem foi incubada por 4 horas com diferentes doses do extrato hidroalcoólico e com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 16mM concomitantemente (a 30°C com agitação), seguido por plaqueamento nos mesmos meios descritos acima.

Nos dois casos, as placas foram incubadas no escuro a 30°C, em estufa, durante 3-5 dias e após fez-se à contagem do número de colônias revertentes. Todos estes experimentos foram feitos em triplicata para cada dose testada.

Como controle positivo foi utilizado o composto nitroquinoleína-1-óxido, (4-NQO 5µM), da marca Sigma, em todos os experimentos de mutagenese e antimutagenese.

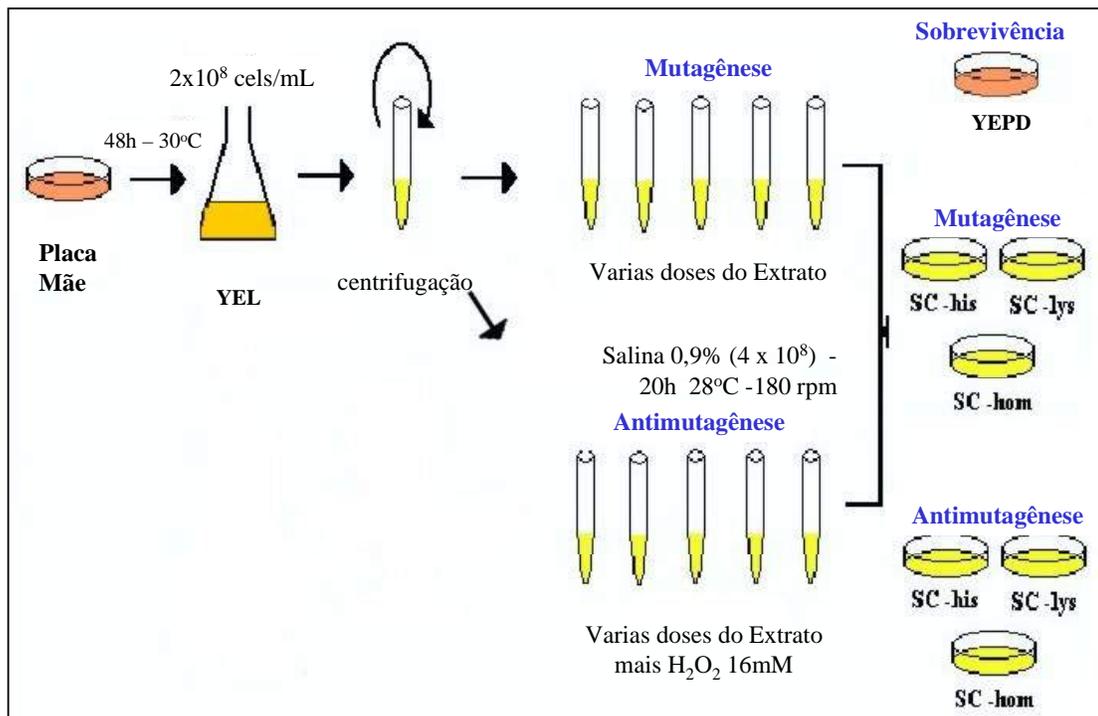


Figura 7. Representação esquemática do teste de mutagênese e antimutagênese em *S. cerevisiae*.

### 6.7 Detecção da atividade antioxidante em *S. cerevisiae*, pelo ensaio de inibição de crescimento

Para os ensaios de análise da atividade antioxidante, foram utilizadas linhagens de *S. cerevisiae* proficientes e deficientes em sistema de defesa antioxidante (*SOD*, *sod1*, *sod2*, *sod1sod2*) no teste do disco central ou 'central disc'. As linhagens em fase exponencial e estacionária foram pré-incubadas em solução salina com doses crescentes do extrato, durante a noite e no dia seguinte, estriadas em placa de YEPD contendo no centro um disco de papel filtro (Figura 8) com 8 $\mu$ L de paraquat 500mM ou 5 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10M, para tratamento em fase estacionária, e 6 $\mu$ L de paraquat 500mM ou 3 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10M para tratamento em fase exponencial de crescimento. Após 2 ou 3 dias de incubação a 30°C, mediu-se a inibição de crescimento, sendo estes resultados tabelados e submetidos a tratamento estatístico.

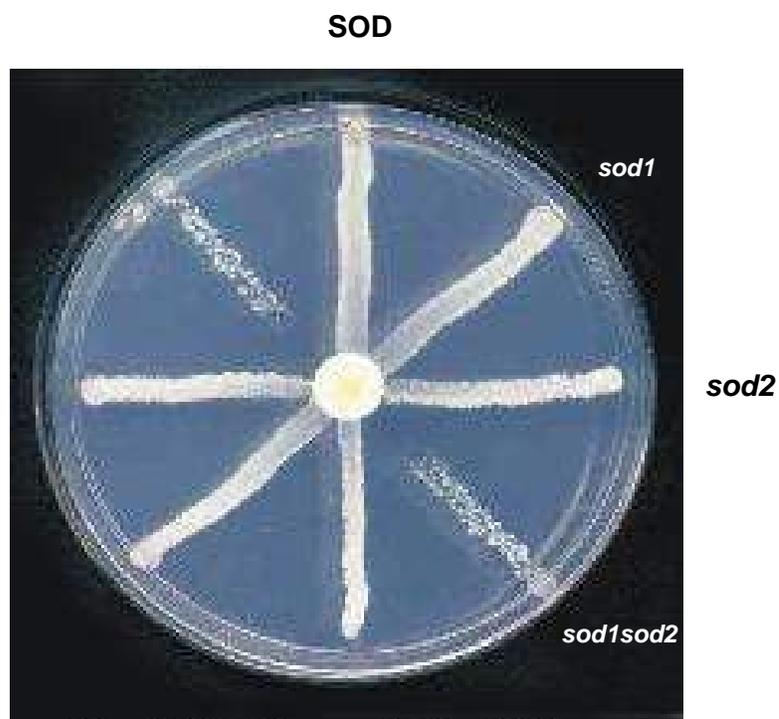


Figura 8. Representação do ensaio do disco central.

### 6.8 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o Teste ANOVA-Dunnett, comparando-se os tratamentos dos extratos com o controle (dose zero de extrato). Foi considerado estatisticamente significativo \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$ .

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Ensaio de mutagênese e antimutagênese

Na tabela 2 pode-se observar que o extrato hidroalcoólico da *Costus spicatus* não é capaz de induzir mutagenicidade na linhagem XV185-14c de *S. cerevisiae* em nenhuma das doses testadas. É importante ressaltar que na dose de 50 µL/mL suspensão celular o número de revertentes no locus de histidina é ainda menor que no controle (dose zero de extrato), mostrando que o extrato deve conter substâncias capazes de diminuir a própria mutagênese espontânea da linhagem.

Na tabela 3 estão apresentados os resultados da antimutagênese, com o pré-tratamento, ou seja, onde a linhagem foi pré-incubada por 16 horas com o extrato e posteriormente tratada com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Neste caso, não foi observada diferença estatisticamente significativa de proteção do extrato frente às mutações induzidas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A tabela 4 contém os resultados da antimutagênese com o tratamento simultâneo de extrato e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 4 horas. Neste tipo de ensaio, pôde-se perceber uma redução significativa da mutagenicidade induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no locus da histidina para as doses de 100, 250 e 500 µL/mL suspensão celular de extrato, indicando, portanto, atividade antimutagênica.

Tabela 2. Indução de mutação pontual (*his1-7* e *lys1-1*) e mutação por deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift* (*hom3-10*) na linhagem haplóide XV 185-14c de *S. cerevisiae*, após o tratamento com o extrato hidroalcoólico da *Costus spicatus* em fase estacionária de crescimento.

Dose do Extrato ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ de suspensão celular)	Sobrevivência (%)	Revertentes His1/10 <sup>8</sup> sobreviventes <sup>a</sup>		Revertentes Lys1/10 <sup>8</sup> sobreviventes <sup>b</sup>		Revertentes Hom3/10 <sup>8</sup> sobreviventes <sup>a</sup>	
0	100% (459) <sup>c</sup>	6,20	1,55 <sup>d</sup> (29) <sup>c</sup>	2,20	0,63 <sup>d</sup> (12) <sup>c</sup>	2,20	0,28 <sup>d</sup> (13) <sup>c</sup>
50	120% (552)	4,00	1,55 (27)**	3,10	0,63 (19)	2,60	0,28 (12)
100	117% (540)	4,40	1,27 (30)	2,10	0,07 (15)	1,80	0,28 (11)
250	104% (477)	4,20	1,41 (37)	2,40	0,14 (16)	2,20	0,00 (12)
500	102% (468)	3,30	2,05 (36)	2,50	0,21 (17)	2,80	0,42 (16)

<sup>a</sup> Revertentes de locus-específico; <sup>b</sup> Revertentes de locus-não específico;

<sup>c</sup> Número entre parênteses é o total de colônias contadas em três placas para cada dose;

<sup>d</sup> Significância e desvio-padrão de três experimentos independentes;

\*\* Dados significativos em relação ao grupo controle negativo (salina)  $P < 0.01$  no teste ANOVA ('Dunnett's Multiple Comparison Test').

Tabela 3. Indução de mutação pontual (*his1-7* e *lys1-1*) e mutação por deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift* (*hom3-10*) na linhagem haplóide XV 185-14c de *S. cerevisiae*, após incubação prévia com o extrato da *Costus spicatus* (pré-tratamento) e posterior tratamento por uma hora com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 16mM em fase estacionária de crescimento.

Dose do Extrato ( $\mu$ L/mL de suspensão celular) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (P)	Sobrevivência (%)	Revertentes His1/10 <sup>8</sup> sobreviventes <sup>a</sup>		Revertentes Lys1/10 <sup>8</sup> sobreviventes <sup>b</sup>		Revertentes Hom3/10 <sup>8</sup> sobreviventes <sup>a</sup>	
0P	100% (555) <sup>c</sup>	7,00	2,82 <sup>d</sup> (27) <sup>c</sup>	3,80	0,00 <sup>d</sup> (16) <sup>c</sup>	3,40	0,14 <sup>d</sup> (10) <sup>c</sup>
50P	83% (465)	11,0	2,82 (47)	3,80	0,00 (12)	3,20	0,14 (14)
100P	109% (606)	11,3	3,04 (49)	2,40	0,98 (15)	2,70	0,49 (16)
250P	59% (330)	14,4	5,23 (54)	3,30	0,35 (18)	2,50	0,63 (13)
500P	81% (453)	15,6	6,08 (56)	3,50	0,21 (16)	3,10	0,21 (14)

<sup>a</sup> Revertentes de locus-específico; <sup>b</sup> Revertentes de locus-não específico;

<sup>b</sup> Revertentes de Locus não-específico.

<sup>c</sup> Números entre parênteses é o total de colônias contadas em três placas para cada dose;

<sup>d</sup> Significância e desvio-padrão de três experimentos independentes.

Tabela 4. Indução de mutação pontual (*his1-7* e *lys1-1*) e mutação por deslocamento do quadro de leitura ou *frameshift* (*hom3-10*) na linhagem haplóide XV 185-14c de *S. cerevisiae*, após o tratamento simultâneo durante 4 horas com o extrato hidroalcoólico de *Costus spicatus* e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 16mM, em fase estacionária de crescimento.

Dose do Extrato ( $\mu$ L/mL de suspensão celular) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (P)	Sobrevivência (%)	Revertentes His1/10 <sup>8</sup> sobreviventes <sup>a</sup>	Revertentes Lys1/10 <sup>8</sup> sobreviventes <sup>b</sup>	Revertentes Hom3/10 <sup>8</sup> sobreviventes <sup>a</sup>
0P	100% (290) <sup>c</sup>	18,75 4,73 <sup>d</sup> (45) <sup>c</sup>	2,73 1,00 <sup>d</sup> (6) <sup>c</sup>	5,57 2,77 <sup>d</sup> (13) <sup>c</sup>
50P	87% (260)	19,55 10,97 (37)	2,88 2,43 (5)	6,30 0,52 (16)
100P	125% (326)	12,05 1,54* (39)	1,62 0,57 (5)	7,42 3,09 (22)
250P	173% (419)	9,80 2,71* (45)	1,45 0,80 (6)	4,15 3,91 (13)
500P	115% (308)	13,49 1,51* (37)	2,59 1,21 (7)	6,03 3,20 (15)

<sup>a</sup> Revertentes de Locus-específico.

<sup>b</sup> Revertentes de Locus não-específico (mutação *forward*).

<sup>c</sup> Números entre parênteses é total de colônias contadas em três placas para cada dose.

<sup>d</sup> Significância e desvio-padrão de três experimentos independentes.

\* Dados significativos em relação ao grupo controle negativo (solvente)  $P < 0.05$  no teste ANOVA ('Dunnett's Multiple Comparison Test').

## 7.2 Ensaio de atividade antioxidante

### 7.2.1 Tratamento com extrato hidroalcoólico

A figura 9 representa os resultados das linhagens proficientes e deficientes em superóxido dismutase, incubadas por 16 horas com diferentes doses do extrato hidroalcoólico, e posteriormente expostas a peróxido de hidrogênio em fase estacionária de crescimento. Pôde-se observar um pequeno efeito antioxidante, principalmente nos tratamentos com as doses mais baixas de extrato, sendo significativo apenas para dose de 100 $\mu$ L/mL de suspensão celular, na linhagem selvagem (*SOD*). Da mesma forma, verificou-se um efeito pró-oxidante nas linhagens tratadas com a dose mais elevada do extrato hidroalcoólico (250 $\mu$ L/mL de suspensão celular), o qual representa uma potencialização da citotoxicidade do agente oxidante ou um indicativo de que, os próprios compostos antioxidantes estão induzindo a formação de espécies reativas. Este efeito foi significativo na linhagem mutante *sod1*.

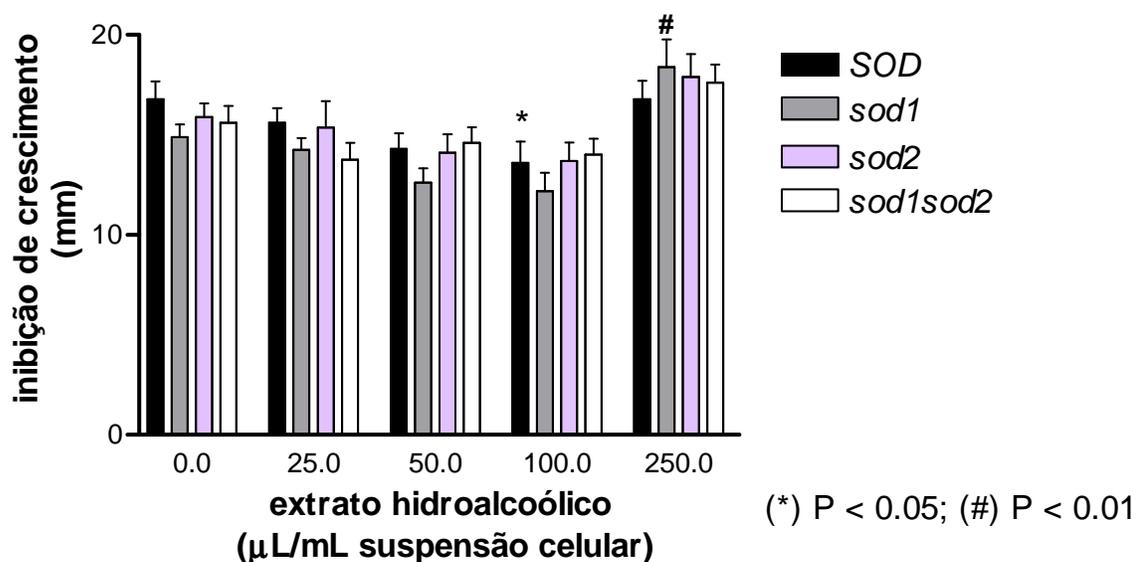


Figura 9. Linhagens de *S. cerevisiae* tratadas com  $H_2O_2$  em fase estacionária, após a incubação prévia com diferentes doses do extrato hidroalcoólico.

Quando a exposição posterior à incubação com extrato é feita com paraquat, não se observa efeito antioxidante significativo (Figura 10). Da mesma forma, como observado com o peróxido de hidrogênio, nas linhagens tratadas com a dose mais elevada do extrato, evidenciou-se o efeito pró-oxidante, sendo significativo apenas para *sod1sod2*.

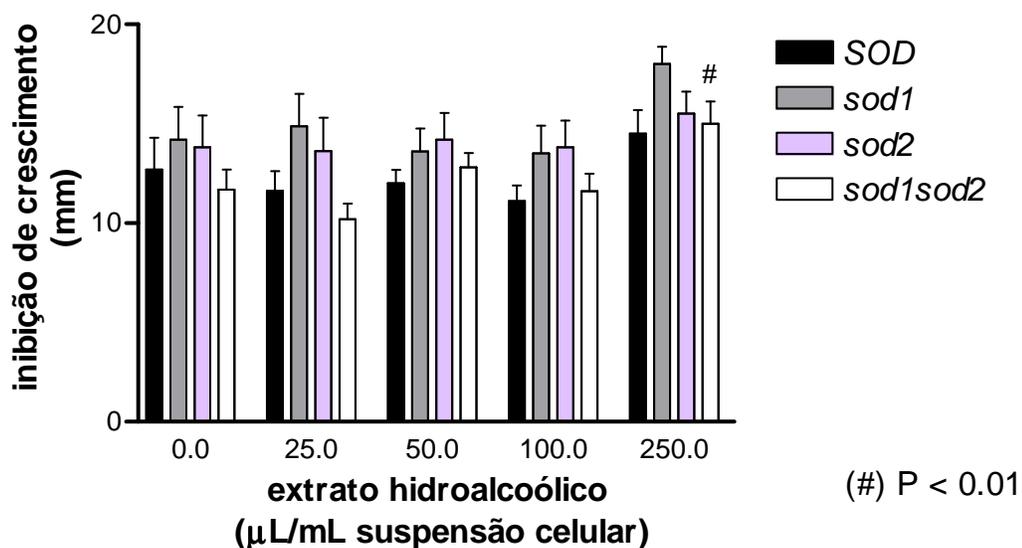


Figura 10. Linhagens de *S. cerevisiae* tratadas com paraquat, em fase estacionária, após incubação prévia com diferentes doses do extrato hidroalcoólico.

No tratamento com as células em fase exponencial de crescimento, quando expostas ao peróxido de hidrogênio (Figura 11), pôde-se observar uma tendência à diminuição na inibição do crescimento nas linhagens tratadas com as doses mais baixas do extrato, porém, não de forma estatisticamente significativa. Nas linhagens tratadas com a dose mais elevada do extrato (250μL/mL suspensão celular), observou-se novamente um efeito pró-oxidante, sendo que estes resultados foram significativos para todas as linhagens testadas.

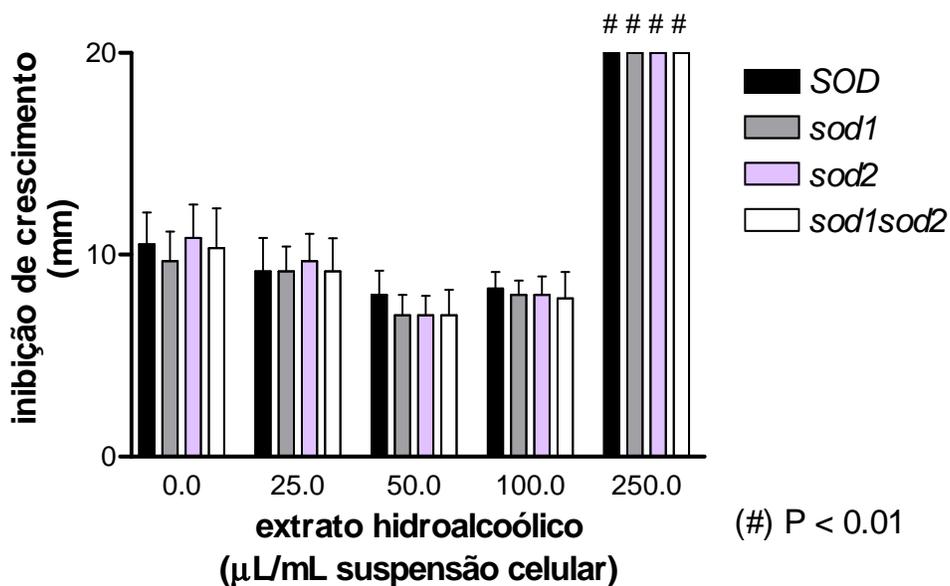


Figura 11. Linhagens de *S. cerevisiae* tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em fase exponencial, após incubação prévia com diferentes doses do extrato hidroalcoólico.

Na exposição com paraquat, também em fase exponencial (Figura 12), novamente, o efeito antioxidante encontrado foi baixo, sendo significativo apenas na dose de 50μL para *sod1*. Por outro lado, o efeito pró-oxidante foi significativo para todas linhagens na dose de 250μL/mL suspensão celular, tendo comportamento semelhante ao teste com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em fase exponencial (Figura 11).

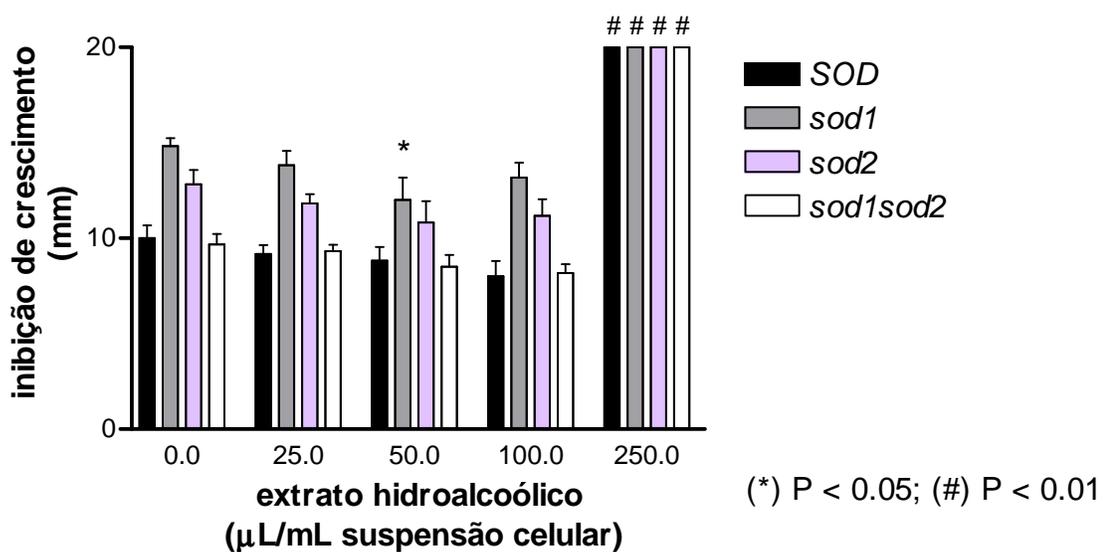


Figura 12. Linhagens de *S. cerevisiae* tratadas com paraquat em fase exponencial, após incubação prévia com diferentes doses do extrato hidroalcoólico.

### 7.2.2 Tratamento com a fração metanólica

A figura 13 representa os resultados das linhagens incubadas por 16 horas, com diferentes doses da fração metanólica, e submetidas posteriormente ao tratamento com peróxido de hidrogênio em fase estacionária de crescimento. Com a fração metanólica, obteve-se um efeito antioxidante nas doses de 50 a 500µL nas doses do extrato utilizado, sendo significativo para maioria deles.

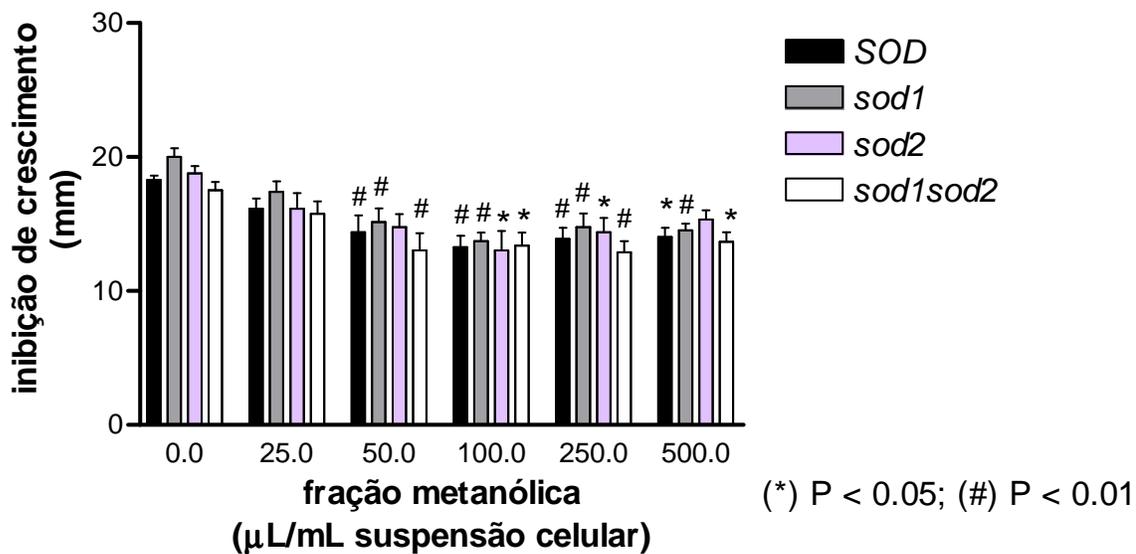


Figura 13. Linhagens de *S. cerevisiae* tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em fase estacionária, após incubação prévia com diferentes doses da fração metanólica.

Resultados semelhantes foram observados com a exposição ao paraquat (Figura 14), sendo que o efeito antioxidante foi significativo para todas as doses do extrato testadas.

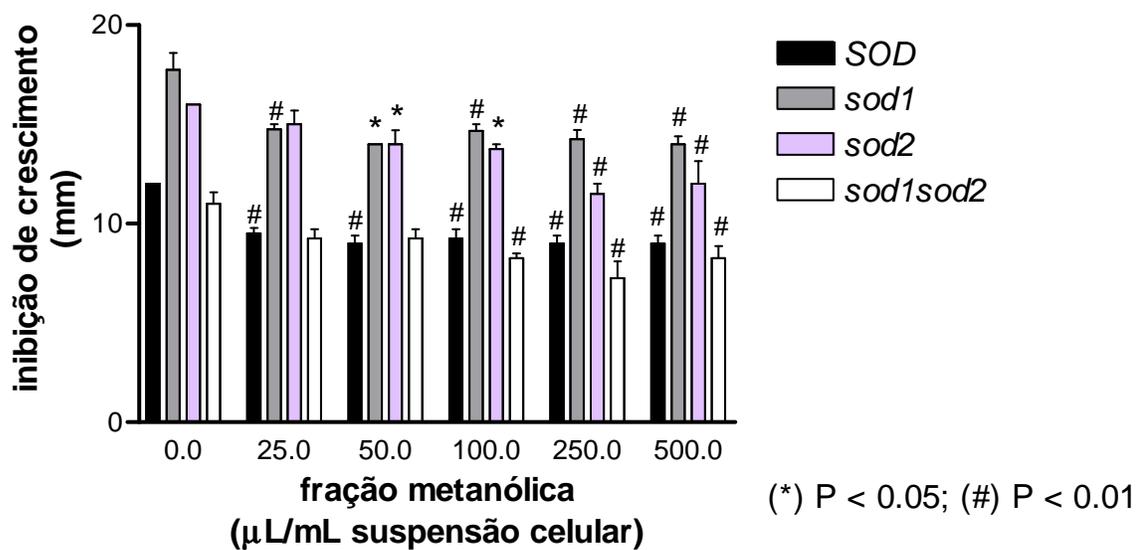


Figura 14. Linhagens de *S. cerevisiae* tratadas com paraquat em fase estacionária, após incubação prévia com diferentes doses da fração metanólica.

## 8 DISCUSSÃO

A família Zingiberaceae é largamente distribuída entre os trópicos, particularmente no sudeste da Ásia. Embora existam muitos relatos de que os constituintes das plantas dessa família encontradas na Malásia não apresentam atividades biológicas, seja através de extratos brutos ou compostos isolados, sabe-se que muitas espécies das Zinziberaceae apresentam atividade antioxidante e antimicrobiana (Iwu e Anyanwu, 1982; Sirat, 1994).

A planta *Costus spicatus* tem atraído a atenção de pesquisadores desde a descoberta de diosgenina, um precursor de hormônios esteroidais, em seus rizomas (Silva *et al.*, 1999).

Por meio de estudos fitoquímicos e da combinação de espectroscopia e métodos químicos realizados com as partes aéreas da *Costus spp.*, foi descrita a identificação e elucidação estrutural de dois novos diglicosídeos flavônicos com atividade antiinflamatória - a tamarixetina 3-O-neohesperidósídeo e o canferídio 3-O-neohesperidósídeo - principalmente nas folhas da cana-do-brejo. Além destes, foram identificados outros compostos bastante conhecidos tais como quercetina 3-O-neohesperidósídeo e seis outros flavonóides (Silva *et al.*, 2000).

Os flavonóides constituem um grupo de substâncias naturais que possuem atividades biológicas diversificadas e esta classe de compostos fenólicos, bem como seus precursores biossintéticos são conhecidos pela sua ação antioxidante (Richardson *et al.*, 1974; Rios *et al.*, 1992). Esta ação protetora contra os danos causados pelo estresse oxidativo às biomoléculas justifica o emprego de extratos de plantas ricas nesses metabólitos secundários como agentes antioxidantes. Pratt e Birac (1979) estudaram os efeitos da quercetina, quercitrina, miricetina, quercetina 3-monoglicosídeo, quercetina 3-triglicosídeo, extraídos de sementes de diversas plantas por meio da determinação da atividade antioxidante através da utilização de ensaios espectrofotométricos *in vitro*. Vários antioxidantes naturais, principalmente os compostos fenólicos, também foram encontrados em muitos vegetais, conforme trabalhos realizados por Harel e Kanner (1984), Farr *et al.* (1988), Sheabar e

Neeman (1988), Namiki (1990), Pratt e Hudson (1990), Loliger (1991) e Kanner *et al.* (1994) (Angelis, 2001).

Embora o gênero *Costus* seja amplamente utilizado na medicina popular, ainda são poucos os estudos farmacológicos a respeito dos extratos dessas plantas. O extrato metanólico de *Costus afer Ker* mostrou-se citotóxico em ensaios com microcrustáceos, apresentou atividade anestésica local em porco da Índia, atividade estrogênica e progestogênica em ratas e atividade anti-hiperglicemiante em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (Anaga *et al.*, 2004).

Neste trabalho, estudou-se a capacidade antioxidante dos extratos hidroalcoólico e metanólico da planta *Costus spicatus* em razão da identificação química de compostos flavônicos obtida em estudos prévios (Silva *et al.*, 2000). Também foi investigada a genotoxicidade do extrato hidroalcoólico da *Costus spicatus*, em sistema eucarioto, na levedura *S. cerevisiae*, em ensaios de mutagênese e antimutagênese. Cabe ressaltar que o uso popular desta planta se faz com o extrato hidroalcoólico das partes aéreas, exatamente da mesma forma como ele foi preparado neste estudo. Sabe-se que este extrato é capaz de retirar compostos polares e também os apolares, como taninos e agliconas.

A atividade antioxidante foi determinada através de ensaios biológicos, utilizando linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* proficientes e deficientes no sistema de defesa antioxidante da enzima superóxido dismutase (*SOD*, *sod1*, *sod2*, *sod1sod2*), por meio de um ensaio semiquantitativo realizado através da inibição de crescimento (teste do disco central).

O modelo de resposta citotóxica em *S.cerevisiae*, através do teste de inibição de crescimento é uma estratégia simples e muito sensível para avaliação do efeito biológico de substâncias naturais e sintéticas em tratamentos diversos (Picada *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2004).

O tratamento com extrato hidroalcoólico apresentou um baixo efeito protetor contra a citotoxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio e paraquat em praticamente todas as linhagens utilizadas e principalmente nas doses mais baixas do extrato (25 e 50µL/mL suspensão celular). Este efeito possui o mesmo perfil tanto em

fase exponencial quanto em fase estacionária de crescimento, sugerindo que os componentes responsáveis pelo efeito não se alteram em função do tipo de metabolismo da célula. A proteção também foi similar tanto para peróxido de hidrogênio quanto para paraquat, os quais geram espécies reativas de oxigênio diferentes, indicando que as moléculas antioxidantes do extrato apresentam uma versatilidade e um amplo espectro de detoxificação de ERO. Estas características peculiares são observadas com frequência nos antioxidantes não enzimáticos, como as vitaminas, os polifenóis, os retinóides e os compostos sulfurados. Desta forma, novamente pode-se atribuir uma ação protetora aos flavonóides. No entanto, é importante notar que, na maior dose desse extrato, verificou-se um comportamento pró-oxidante, o qual se manifesta através da potencialização da citotoxicidade do agente oxidante na dose mais alta do extrato. Quando consideramos evidências consistentes da ação paradoxal dos flavonóides em relação ao seu comportamento antioxidante/pró-oxidante, na mesma substância, e a dissociação desses comportamentos nesse grupo de metabólitos, reforça-se ainda mais, a participação dessas substâncias na modulação do estado redox intracelular de *S. cerevisiae* causada pelo tratamento com *Costus spicatus*, sem descartar a possível influência dos demais compostos presentes no extrato hidroalcólico.

Por outro lado, o tratamento com a fração metanólica apresentou um efeito antioxidante significativo para todas as linhagens, sugerindo que os compostos presentes no extrato poderiam estar quelando espécies reativas de oxigênio, por interação direta e assim, substituindo e/ou reforçando algumas defesas antioxidantes celulares. É interessante notar que não foi verificada ação pró-oxidante, mesmo em altas doses da fração metanólica empregada. Considerando-se que a maior concentração de flavonóides deve estar representada na fração metanólica, sugere-se que a ação pró-oxidante observada no extrato hidroalcólico poderia ser atribuída a compostos de menor polaridade que não estariam presentes na fração metanólica do extrato.

O extrato metanólico de *Costus discolor* e outras plantas do gênero apresentaram ação antioxidante *in vitro*, verificada através da oxidação de micelas

do ácido linolêico, comparável e superior a vitamina E. Esta ação pode dever-se a compostos de baixa polaridade como curcuminóides, cava-pironas e gingeróis (Habsab *et al.*, 2000).

Este trabalho é o primeiro relato da atividade antioxidante de um extrato de planta do gênero *Costus* em um modelo *in vivo*. Mais estudos deverão ser realizados para investigação desta atividade, tais como, em células de mamíferos e ensaios bioguiados. Além disso, é de fundamental importância à identificação dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante encontrada. Para isso, ensaios em cromatografia gasosa (GC-MS) e HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) já estão em andamento.

Algumas das substâncias presentes nos alimentos e vegetais podem ter efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos, isto é, podem induzir mutações do DNA e/ou podem favorecer o desenvolvimento de tumores enquanto outras podem atenuar ou anular estes efeitos (Antunes e Araújo, 2000).

Após a observação inicial de efeitos antimutagênicos de certos vegetais, vários compostos têm sido isolados de plantas e testados quanto à ação protetora sobre lesões induzidas no DNA (Kada *et al.*, 1978). O termo “antimutagênico” foi usado originalmente por Novick e Szilard em 1952 para descrever os agentes que reduzem a frequência de mutação espontânea ou induzida, independente do mecanismo envolvido (Von Borstel *et al.*, 1996).

Os mecanismos de ação dos agentes antimutagênicos foram classificados em dois processos maiores, denominados desmutagênese e bio-antimutagênese. Na desmutagênese, os agentes protetores, ou antimutagênicos, atuam diretamente sobre os compostos que induzem mutações no DNA, inativando-os química ou enzimaticamente, inibindo ativação metabólica de pró-mutagênicos ou seqüestrando moléculas reativas. Na bio-antimutagênese, os antimutagênicos atuam sobre o processo que leva a indução de mutações, ou reparo das lesões causadas no DNA (Kada *et al.*, 1978). Posteriormente, uma outra classificação mais detalhada foi sugerida, considerando o modo de ação dos antimutagênicos e/ou

anticarcinogênicos, bem como o ambiente de ação, extra ou intracelular (De Flora e Ramel, 1988).

O potencial antimutagênico de uma substância pode ser avaliado em sistemas biológicos diversos, os mesmos empregados para o estudo e identificação dos agentes mutagênicos (Anderson *et al.*, 1995; Waters *et al.*, 1996). Em qualquer desses sistemas-teste, o tratamento com os agentes mutagênicos, que induzem as mutações, e com o antimutagênico, que poderá inibir o aparecimento de lesões no DNA, pode ocorrer simultaneamente ou em momentos diferentes, por meio de pré-ou pós-tratamento. Os agentes antimutagênicos usados em pré-tratamento ou tratamento simultâneo podem atuar como agentes desmutagênicos. A efetividade do agente antimutagênico no pós-tratamento sugere que ele esteja atuando pelo mecanismo de bio-antimutagênese e estaria relacionado ao processo de reparo das mutações, como acontece com a vanilina (Sasaki *et al.*, 1987) e com o ácido tânico (Sasaki *et al.*, 1988). Muitos compostos antimutagênicos encontrados nos alimentos são agentes antioxidantes e atuam seqüestrando os radicais livres de oxigênio, quando administrados como pré-tratamento ou nos tratamentos simultâneos com o agente que induz as mutações no DNA.

Para os ensaios de mutagênese, o extrato hidroalcoólico da *Costus spicatus* não induziu atividade mutagênica na linhagem XV185-14c de *S. cerevisiae* nas doses testadas. Para os testes de antimutagenicidade, o extrato não protegeu significativamente das lesões induzidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando pré-tratadas, mas quando tratadas simultaneamente, os testes sugeriram uma pequena atividade antimutagênica nas doses de 100, 250 e 500 µL/ mL suspensão celular, apenas no lócus da histidina. Conforme citado acima, este efeito poderia ser devido a uma atividade desmutagênica da planta, onde os agentes protetores atuariam diretamente sobre à ação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inibindo a formação dos compostos que induzem mutações no DNA ou seqüestrando as moléculas reativas, como o radical hidroxil.

O fato deste extrato vegetal não apresentar atividade mutagênica e sim, antimutagênica e antioxidante em *S. cerevisiae* torna-o bastante promissor para

estudos futuros com outros modelos animais, bem como para a identificação dos compostos biologicamente ativos presentes na planta.

## 9 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com os ensaios de atividade antioxidante permitem-nos concluir que:

- O extrato hidroalcoólico da planta *Costus spicatus* apresenta um baixo efeito antioxidante, contra a citotoxicidade induzida pelos agentes oxidantes peróxido de hidrogênio e paraquat em linhagens de *S. cerevisiae*, proficientes e deficientes na enzima superóxido dismutase, tanto em fase exponencial, quanto em fase estacionária de crescimento.
- Doses elevadas do extrato hidroalcoólico induzem um perfil pró-oxidante em *S. cerevisiae*, independente da fase de crescimento.
- A fração metanólica do extrato induz um efeito antioxidante significativo para todas as de *S. cerevisiae*, tanto em exposição com peróxido de hidrogênio quanto paraquat, sugerindo que, esta fração concentre uma quantidade significativa dos compostos antioxidantes da planta. Não foi observado um efeito pró-oxidante induzido pela fração metanólica.
- Como a maior concentração dos flavonóides deve estar representada pela fração metanólica, pode-se inferir que esses sejam responsáveis, pelo menos em parte, pela atividade encontrada. Da mesma forma, pode-se sugerir que o efeito pró-oxidante observado com extrato hidroalcoólico é devido à presença de compostos de menor polaridade, as quais não estariam presentes na fração metanólica.

Com os ensaios de atividade mutagênica e antimutagênica pode-se concluir que:

- Nas doses testadas, o extrato hidroalcolólico da *Costus spicatus* não induziu atividade mutagênica em levedura *S. cerevisiae*.
- O extrato hidroalcolólico não apresentou atividade antimutagênica para lesões induzidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quando a linhagem foi pré-tratada com o extrato; entretanto, no tratamento simultâneo da linhagem com o extrato vegetal da *Costus* e com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a atividade antimutagênica mostrou-se lócus-específico.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANAS'AV, I. B., OSTRACHOVITCH, E. A., KORKINA, L.G. Effect of rutin its copper complex on superoxide formation and lipid peroxidation in rat liver cromosomes. *FEBS Letters*, v. 425, p. 256-258, 1989.

ALBUQUERQUE, J.M. *Plantas Mediciniais de Uso Popular*. ABEAS, Brasília,1989. 100p.

AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* v. 221, p. 1256-1263, 1983.

ANAGA A.O., NIJOKU C.J., EKEJIUBA E.S., ESIKA M.N., ASUZU I.U. Investigations of the methanolic leaf extrac of *Costus* after. Ker for pharmacological activities *in vitro* and *in vivo*. *Phytomedicine*, v. 11, p. 242-248, 2004.

ANDERSON, D., BASARAN, N., BLOWERS, A., EDWARDS, A.J. The effect of antioxidants on bleomycin treatment in *in vitro* and *in vivo* genotoxic assays. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 329, p. 37-47, 1995.

ANGELIS, R.C. *Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas*. São Paulo: Ed. Atheneu, 2001. 295p.

ANTUNES, L.M.G., ARAÚJO, M.C.P. Mutagenicity and antimutagenicity of the main food colorings. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 13, p. 81-88, 2000.

ATKIN, A.L., RIAZI, M.A., GREER, C.L., ROY, K.L., BELL, J.B. The funcctional analysis of nonsense suppressors derived from *in vitro* engineered *Saccharomyces cerevisiae* tRNA (Trp) genes. *Genes*, v. 134, p. 57-65, 1993.

AUSUBEL, F., BRENT, R., KINGSTON, R.E. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York, 1989.

AYUB, M.A.Z., ASTOLFI-FILHO, S., MAVITUNA, F., OLIVER, S.G. Studies on plasmid stability, cell metabolism and superoxide dismutase production by P<sub>gk</sub>-strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology*, v. 37, p. 615-620, 1992.

BANDARA, B.M.R., FERNANDO, I.H.S., HEWAGE, C.M., KARUNARATNE, V., ADIKARAM, N.K.B., WIJESUNDARA, D.S.A. Antifungal activity of some medicinal plants of Sri Lanka. *Journal of the National Science Council of Sri Lanka* v. 17, p. 1-13, 1989.

- BECKMAN, K.B., AMES, B. N. The free theory of aging matures. *Physiology Review*, v. 78, p. 547-581, 1998.
- BERMINGHAM-McDONOGH, O., GRALLA, E.B., VALENTINE, J.S. The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing and biological activity. *Proceedings of the National Academy of Science*. USA, v. 85, p. 4789-4793, 1988.
- BILINSKI T., KRAWIEC Z., LICZMANSKI A., LITWINSKA J. Is hydroxyl radical generated by the Fenton reaction *in vivo*? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 130, p. 533-539, 1985.
- BILYK, A., SAPERS G. M. Distribution of quercetin and kaempferol in lettuce, kale, chive, garlic chive, leek, horseradish, red radish, and red cabbage tissues. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 33, p. 226-228, 1985.
- BJELDANES, L.F., CHANG, G.W. Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science*, v. 197, p. 577-578, 1977.
- BONNEFOY, M., DRAI, J., KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Medicale*, v. 31, p. 1174-1184, 2002.
- BOORHEM, R.L. *Reader's Digest – Segredos e Virtudes das Plantas Mediciniais*. Reader's Digest Brasil Ltda., Rio de Janeiro, 1999. 416 p.
- BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (Buenos Aires)*, v. 58, p. 350-356, 1998.
- BRENDEL, M., GREY, M., MARIS, A.F., HIETKAMP, J., FESUS F., PICH, C.T., DAFRÉ, L., SCHIMIDT, M., ECKARDT-SHUPP, F., HENRIQUES, J.A.P. Low glutathione pools in the original *ps03* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* are responsible for its pleiotropic sensitivity phenotype. *Current Genetics*, v. 33, p. 4-9, 1998.
- BRENNAN, R.J., SCHIEST, R.H. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutation Research (Fund. Mol. Mech. Mutagen)*, v. 356, p. 171-178, 1996.
- BRENNAN R.J., SCHIESTL R.H. Free radicals generated in yeast by the Salmonella test-negative carcinogens benzene, urethane, thiourea and auramine O. *Mutation Research*, v. 403, p. 65-73, 1998.
- BROZMANOVÁ, J., DUDAS, A., HENRIQUES, J.A.P. Repair of oxidative DNA damage – an important factor reducing cancer risk. *Neoplasms*, v. 48, p. 85-93, 2001.

BROUILLARD, R., CHEMINANT, A. Flavonoids and plant color, in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Cellular and Medicinal Properties* (Cody V, Middleton E and HARBORNE JB eds) p. 93-106, Alan R. Liss, *Inc.*, New York, 1988.

BURKILL, I.H. *A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula*. Crown Agent, London, 1966.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, v. 58, p. 79-110, 1989.

COHEN, G., RAPATZ, W., RUIS, H. Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTA1 gene and amino acid sequence of catalase A derived from it. *European Journal of Biochemistry*, v. 176, p. 159-163, 1988.

CORRÊA, A.D., SIQUEIRA-BATISTA, R., QUINTAS, L.E.M. *Plantas Mediciniais – do cultivo à terapêutica – 2ª Edição*. Editora Vozes. Petrópolis, 1998. 247p.

COSTA, V., AMORIM, M. A., REIS, E., QUINTANILHA, A., MORADAS -FERREIRA, P. Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology*, v. 143, p. 1649-1656, 1997.

COSTA, V., FERREIRA, P.M. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 22, p. 217-246, 2001.

CULOTTA, V. C., JOH, H.-D., LIN, S.-J., SLEKAR, K. H. A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering. *Journal of Biology Chemistry*, v. 270, p. 29991-29997, 1995.

CZAPSKI, G. Reaction of OH. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 209-215, 1984.

CZARNECKI, R., GRZYBEK, J. Antiinflammatory and vasoprotective activities of polysaccharides from fruit bodies of higher fungi P.I. *Phytotherapy Research*, v. 9, p. 123-127, 1995.

DE FLORA, S., RAMEL, C. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 202, p. 285-306, 1988.

DE STASI, L.C. (Org) *Plantas Mediciniais: Arte e Ciência. Um Guia de Estudo Interdisciplinar*. São Paulo: Unesp, 1996. *Revista PHARMACIA Brasileira*, N° 36, p. 62-66, 2003.

DEBY, C., GOUTIER, R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and efficiency of superoxide dismutases. *Biochemistry Pharmacology*, v. 39, p. 399-405, 1990.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Review*, v. 55, p. 396-407, 1997.

DE WINDE, J.H., THEVELEIN J.M., WINDERICK, J. *Adaptation to nutrient depletion in yeast*. In: MAGER, W.H. (ED) *Yeast stress responses*. Springer-Verlag, Heidelberg, p. 7-52, 1997.

DIAZ, J., SERRANO, E., ACOSTA, F., CARBONELL, L.F. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. *Clinical Chemistry*, v. 44, p. 2215-2217, 1998.

EIDE, D.J. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Nutrition*, v. 18, p. 441-469, 1998.

ELISABETSKY, E. *Revista Ciência Hoje*, v. 31, n° 182, 2002.

EPE, B. Genotoxicity of singlet oxygen. *Chemico-Biological Interactions*, v. 80, p. 239-260, 1991.

FAIRBAIRN, D.W., OLIVE, P.L., O'NEILL, K.L. The Comet Assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, v. 339, p. 37-59, 1995.

FARR, D.R.; MAGNOLATTO, D.; LOLINGER, J. *Protection of food-stuffs from Oxidation*. U.S. Pat 4741915, 1988.

FERNÁNDEZ-CHECA, J.C., GARCIA-RUIZ, C., COLELL, A., MORALES, A., MARÖ, M., MIRANDA, M., ARDITE E. Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactors*, v. 8, p. 7-11, 1998.

FORMAN, H.J.; THOMAS, M.J. Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. *Annual Review of Physiology*, v. 48, p. 669-680, 1986.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, v. 201, p. 1203-1209, 1998.

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W. DNA Repair and Mutagenesis. *American Society for Microbiology*, Washing DC., 1995.

FUGE, E.K., WERNER, M. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: HOHMANN, S and MAYER, W. H. (Eds) *Yeast Stress Response*, Heidelberg: Springer-Verlag, p. 53-74, 1997.

GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, p. 334-361, 1998.

GOGGELMANN, W., O. SCHIMMER. Mutagenic activity of phytotherapeutical Drugs. *Progress in Clinical Biological Research*, v. 206, p. 63-72, 1986.

GRALLA, E.B., VALENTINE, J. S. Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 5918-5920, 1991.

GRALLA, E.B., KOSMAN, D.J. Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and fungi. *Advances Genetics*, v. 30, p. 251-319, 1992.

GRANT, C.M.; MACIVER, F.H., DAWES, I.W. Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gammaglutamylcysteine. *Molecular Biology of the Cell*, v. 8, p. 1699-1707, 1997.

GRANT, C. M., PERRONE, G., DAWES, I. W. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen Peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 253, p. 893-898, 1998.

GRENAND, P., MORETTI, C., JACQUEMIN, H. *Pharmacopées Traditionnelles en Guyane: Créoles, Palikur, Wayãpi*. Editorial 1- ORSTROM, *College Review*, No.108, Paris, France, 1987.

GUIDOT, D.M., McCORD, J.M., WRIGHT, R.M., REPINE, J.E. Absence of electron transport (Rho° state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, p. 26699-26703, 1993.

HABSAB, M., AMRAN, M., MACKEEN, M.M., LAJIS, N.H, KIKUZAKI, H., NAKATANI, N., RAHMAN, A.A., GHAFAR, ALI, A.M. Sreening of Zinziberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. *Journal Ethnopharmacologist*, v. 72, p. 403-410, 2000.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3.ed. Oxford, New York, 2000.

HARAGUCHI, H., KUWATA, Y., INADA, K., SHINGU, K., MIYAHARA, K., NAGAO, M., YAGI, A. Antifungal activity from *Alpinia galanga* and the composition for incorporation of unsaturated fatty acid in cell growth. *Planta Medica*, v. 62, p. 308-313, 1996.

HARBORNE, J.B., MABRY T.J. MABRY H. *The Flavonoids*. Academic Press, New York, 1975.

HARBORNE, J.B. *Nature, distribution, and function of plant flavonoids, in Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships* (Cody V, Middleton E Jr and HARBORNE JB eds) Alan R. Liss, Incorporated: New York, p. 15-24, 1986.

HARBORNE, J.B. *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Chapman & Hall, New York, 1988a.

HARBORNE, J.B. *Flavonoids in the environment: Structure-activity relationships, in Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical Cellular and Medicinal Properties* (Cody V, Middleton E, HARBORNE JB and Beretz A eds) Alan R. Liss, Incorporated: New York, p. 17-28, 1988b.

HAREL, S., KANNER, J. Lipid antioxidizing factors in orange peel. *International Fruit Juice Union Proceedings*, v. 18, p. 185, 1984.

HARTIG, A., RUIS, H. Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene and deduced amino-acid sequence of yeast catalase T. *European Journal of Biochemistry*, v. 160, p. 487-490, 1986.

HAWTHORNE, D. C., LEOPOLD, U. *Current topics in microbiology and immunology*. Springer Verlag, Berlin, 1974.

HENRIQUES, J.A.P., VALSA, J.O., GOMES, R.A. Utilização de testes com microorganismos para detecção de atividades mutagênicas e/ou potencialmente oncogênicas, In: Pinto, S. O. C. (Ed.) *Genética Molecular de Microorganismos*, Manole, São Paulo, 1987.

HENRIQUES J.A.P., DAFRÉ A.L., PICADA J.N., MARIS A.F., SALVADOR M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI L.A., DE BARROS N.M., AZEVEDO J.L. (Eds.), *Biotechnology na agricultura e na indústria*. Guaíba: Agropecuária, p. 227-256, 2001.

HERMES-LIMA, M., STOREY, K.B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 120 B, p. 437-448, 1998.

HERRMANN K. Flavonols and flavones in food plants: A review. *Journal of Food Technol*, v. 11, p. 433-448, 1976.

HERTOG, M.G.L., HOLLMAN, P.C.H., KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, p. 2379-2383, 1992.

HOLTTUM, R.E. The Zingiberaceae of the Malay Peninsula. *Gardens Bulletin of Singapore*, v. 13, p. 1-249, 1950.

HUSAIN, S.R., CILLARD, J., CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, v. 26, p. 2489-2491, 1987.

INOUE, M. Protective mechanism against reactive oxygen species. In: *The Liver Biology and Pathobiology*. Ed. I. M. Arias, J. L. Boyer, N. Fausto, W. B. Jacoby, D. A. Schachter and D.A. Shafritz. *Raven Press*, New York, p. 443-460, 1994.

INOUE, Y., SUGIYAMA, K., IZAWA, S., KIMURA, A. Molecular identification of glutathione synthetase (*GSH2*) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1395, p. 315-320, 1998.

IZAWA, S., INOUE, Y., KIMURA, A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, v. 368, p. 73-76, 1995.

IZAWA, S., INOUE, Y., KIMURA, A. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry Journal*, v. 320, p. 61-67, 1996.

IWU, M.M., ANYAWU, B.N. Steroidal constituent of *Costus afer*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 6, p. 263, 1982.

JAMIESON, D.J., RIVERS, S.L., STEPHEN, D.W.S. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology*, v. 40, p. 3277-3283, 1994.

JITOE, A., MASUDA, T., TENGAH, I.G.P., SUPRAPTA, D.N., GARA, I.W., NAKATANI, N. Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, p. 1337-1340, 1992.

KADA, T., MORITA, K., INOUE, T. Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 53, p. 351-353, 1978.

KANNER, J., FRANKEL, E., GRANIT, R., GERMAN, B., KINSELLA, J. E. Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 42, p. 64-69, 1994.

KEFFORD J.F., CHANDLER B.V. The Chemical Constituents of Citrus Fruits. *Academic Press*, New York, 1970.

KISTLER, M., SUMMER, K. H., ECKARDT, F. Isolation of glutathione-deficient mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, v. 173, p. 117-120, 1986.

KOBAYASHI, S., MIYABE, S., IZAWA, S., INOUE, Y., KIMURA, A. Correlation of the OSR/ZRC1 gene product and the intracellular glutathione levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry*, v. 23, p. 3-6, 1996.

KUGE, S., JONES, N. YAP1-dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *The EMBO Journal*, v. 13, p. 655-664, 1994.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, v. 27, p. 969-978, 1988.

LE CURIEUX, F., MARZIN, D., ERB, F. Comparison of the three short-term assays: results of seven chemicals. Potential contribution to the control of water genotoxicity. *Mutation Research*, v. 319, p. 223-236, 1993.

LEE, J., GODON, C., LAGNIEL, G., SPECTOR, D., GARIN, J., LABARRE, J., TOLEDANO mb. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 16040-16046, 1999.

LEE, J.H., CHOI, I.Y., KIL, I.S., KIM, S.Y., YANG, E.S., PARK, J-W. Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1526, p. 191-198, 2001.

LISOWSKY, T. A high copy number of yeast gamma-glutamylcysteine synthetase suppresses a nuclear mutation affecting mitochondrial translation. *Current Genetics*, v. 23, p. 408-413, 1993.

LIU, Z.Q., MA, L.P., LIU, Z.L. Making vitamin C lipophilic enhances its perspective effects against free radical induced peroxidation of low density lipoprotein. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 95, p. 49-57, 1992.

LONGO, V.D., GRALLA, E.B., VALENTINE, J.S. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 12275-12280, 1996.

LONGO, V.D., LIOU, L-L., VALENTINE, J.S., GRALLA, E.B. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 365, p. 131- 142, 1999.

LORENZI, H., MATOS, F.J. DE ABREU. *Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

LOLIGER, J. The use of antioxidants of foods. In: AUROMA, O.I., HALLIWELL, London: *Elsevier*, p. 171, 1991.

MacGREGOR, J.T., Casciano, D., Muller, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutation Research*, v. 455, p. 3-20, 2000.

MACHLIN, L.J., BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*, v. 1, p. 441-445, 1987.

MADEO, F., FRÖLICH, E., LIGR, M., GREY, M., SIGRIST, S.J., WOLF, D.H., FRÖLICH, K.U. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *Journal of Cell Biology*, v. 145, p. 757-767, 1999.

MARCHLER, G., SCHÜLLER, C., ADAM, G., RUIS, H. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *The EMBO Journal*, v. 12, p. 1997-2003, 1993.

MARIS, A.F., KERN, A.L., PICADA, J.N., BOCCARDI, F., BRENDEL, M., HENRIQUES, J.A.P. Glutathione, but not transcription factor Yap1, required for carbon source-dependent resistance to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, v. 37, p. 175-182, 2000.

MARIS, A.F., ASSUMPÇÃO, A.L.K., BONATTO, D., BRENDEL, M., HENRIQUES, J.A.P. Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Current Genetics*, v. 39, p. 137-149, 2001.

MIDDLETON, E. JR., KANDASWAMI, C. *The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer*. In: HARBORNE, J. B. (Ed.), *The Flavonoids*. Chapman & Hall, London, p. 619-652, 1994.

MIDDLETON, E. JR., KANDASWAMI, C., THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, v. 52, p. 673-751, 2000.

MORENO, P.R.H., VARGAS, V.M.F., ANDRADE, H.H.R., HENRIQUES, A.T., HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity of the boldine oporphine alkaloid in prokaryotic and eukaryotic organisms. *Mutation Research*, v. 260, p. 145-152, 1991.

MORS, W.B., RIZZINI, C.T., PEREIRA, N.A. Medicinal Plants of Brazil. Reference Publications, *Incorporated Algonac*, Michigan, 2000.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, v. 29, p. 273-291, 1990.

OGA, Z. Fundamentos de toxicologia. 2.ed. Editora Atheneu, São Paulo, p. 39-44, 2003.

OHTAKE, Y., SATOU, A., YABUUCHI, S. Isolation and characterization of glutathione biosynthesis-deficient mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 54, p. 3145-3150, 1990.

OHTAKE, Y., YABUUCHI, S. Molecular cloning of the  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, v. 7, p. 953-961, 1991.

PARK, J.I., GRANT, C.M., DAVIES, M.J., DAWES, I.W. The cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to freeze-thaw stress. Generation of free radicals during freezing and thawing. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 22921-22928, 1998.

PARRY, E.M., PARRY, J.M. The assay of genotoxicity of chemicals using the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Mutagenicity testing: A practical approach, Venitt, S.; Parry, S. M (Eds.), *ORL Press*, Oxford, Washington DC, 1984.

PATTERSON, M.S., MADSEN, S.J., WILSON, B.C. Experimental tests of the feasibility of singlet oxygen luminescence monitoring *in vivo* during photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, v. 5, p. 69-84, 1990.

PAULA-RAMOS, A.L.L., QUEROL, C.B., MARQUES, E.K., HENRIQUES, J.A.P. Cytotoxic activation of the pyrrolizidine alkaloid integerrimine in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is caused by repairable DNA damage. *Revista Brasileira de Genética*, v. 14, p. 897-912, 1991.

PAWLAK, W., KEDZIORA, J., ZOLYNSKI, K., KEDZIORA-KOMATOWSKA, K., BLASZAZYK, J., WITKNOWSKI, P., ZICLENIEWSKI, J. Effect of long term bed rest in man on enzymatic antioxidative defence and lipid peroxidation in erythrocytes. *Journal of Gravitational Physiology*, p. 163-4, 1998.

PICADA J.N., MARIS A.F., CKLESS K., SALVADOR M., KHROMOV-BORISOV N. N., HENRIQUES J.A. Differential mutagenic, antimutagenic and cytotoxic responses

induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacteria and yeast. *Mutation Research*, v. 539, p. 29-41, 2000.

POLI, P., BUSCHINI, A., CANDI, A., ROSSI, C. Bleomycin genotoxicity alteration by glutathione and cytochromo P-450 cellular content in respiratory proficient and deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutagenesis*, v. 14, p. 233-238, 1999.

PRATT, D.E., BIRAC, P.M. Source of antioxidant activity in soybeans. *Journal of Food Science*, v. 44, p. 1720-1722, 1979.

PRATT, D.E., HUDSON, B.J.F. In: HUDSON, B.J.F. (Ed.). *Food antioxidants*. London: Elsevier, p. 171, 1990.

PRINGLE, J.R., HARTWELL, L.H. *The Saccharomyces cerevisiae cell cycle*. In: Strathern, J.N., Jones, E.W. & Broach, J.R. eds. *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae, life cycle and inheritance*. Cold Spring Hargbor, NY, p. 97-142, 1982.

RATES, S.M.K. *Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia*, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 11, p. 57-69, 2001.

RICE-EVANS, C.A. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochemical Society Symposium*, v. 61, p. 103-116, 1995.

RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 20, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, v. 2, p. 152-159, 1997.

RICE-EVANS, C.A., PACKER, L., eds. *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Decker, *Incorporated*, New York, 1998.

RICE-EVANS, C. A. Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, v. 8, p. 797-807, 2001.

RICHARDSON, G.A., EL-RAFEY, M.S., LONG, M.L. Flavones and flavone derivatives as antioxidants. *Journal of Dairy Science*, v. 30, p. 143-397, 1974.

RIOS, J.L., MAÑEZ, S., PAYA, M., ALCARAZ, M.J. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 6, p. 1947-1950, 1992.

ROSA R. M., SULZBACHER K, PICADA J. N., ROESLER R., SAFFI J., BRENDEL M., HENRIQUES J.A. Genotoxicity of diphenyl diselenide in bacteria and yeast. *Mutation Research*, v. 563, p. 107-115, 2004.

SANTORO, N., THIELE, D.J. *Oxidative stress responses in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. In: *Yeast Stress Responses*. Ed. S. Hohmann and W. H. Mager. [Heidelberg: Springer-Verlag GmbH & Co. KG], p. 171-212, 1997.

SALVADOR, M., HENRIQUES, J.A.P. *Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo*. 1<sup>a</sup> Ed. Editora da ULBRA, Canoas, 2004. 200p.

SASAKI, Y.F., IMANISHI, H., OHTA, T., SHIRASU, Y. Effects of vanillin on sister chromatid exchanges and chromosome aberrations induced by mitomycin C in cultured Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 191, p. 193-200, 1987.

SASAKI, Y.F., IMANISHI, H., OHTA, T., SHIRASU, Y., WATANABE, M., MATSUMOTO, K., SHIRASU, Y. Suppressing effect of tannic acid on UV and chemically induced chromosome aberrations in cultured mammalian cells. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 52, p. 2423-2428, 1988.

SCHELIN, R.R. Metabolism of oxygen heterocyclic compounds. In: *CRC handbook of mammalian metabolism of plant compounds*. Boca Raton, FL: CRC Press; p. 243-295, 1999.

SCHMITT, A.P., MCENTEE, K. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, v. 93, p. 5777-5782, 1996.

SHEABAR, F.Z., NEEMAN, I. Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives. *Journal of American Oil Chemical Society*, v. 65, p. 990-991, 1988.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, v. 215, p. 213-219, 1993.

SILVA, B.P., BERNARDO, R.R., PARENTE, J.P. A furostanol glycoside from rhizomes of *Costus spicatus*. *Phytochemistry*, v. 51, p. 931-935, 1999.

SILVA, B.P., BERNARDO, R.R. , PARENTE, J.P. Flavonol glycosides from *Costus spicatus*. *Phytochemistry*, v. 53, p. 87-92, 2000.

SINGH, N.P., STEPHENS, R.E. Microgel eletrophoresis: sensitivity, mechanisms and DNA eletrostretching. *Mutation Research*, v. 383, p. 167-175, 1996.

SINGH, N.P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein cross links and apoptosis. *Mutation Research*, v. 455, p. 111-127, 2000.

SIRAT, H.M. Study on the terpenoids of *Zingiber ottensi*. *Planta Medica*, v. 60, p. 497, 1994.

SIRAT, H.M., MASRI, D., RAHMAN, A.A. The distribution of labdane diterpenes in the Zingiberaceae of Malaysia. *Phytochemistry*, v. 3, p. 699-701, 1994.

SIRAT, H.M., NORDIN, A.B. Essential oil of *Zingiber ottensi* valeton. *Journal of Essential Oil Research*, v. 6, p. 635-636, 1994.

SIRAT, H.M., LIAMEN, M.R. Chemical constituents of *Alpinia purpurata*. *Pertanika Journal of Science and Technology*, v. 3, p. 67-71, 1995.

SIRAT, H.M., NORDIN, A.B. Chemical composition of the rhizome oil of *Alpinia conchigera* Griff from Malaysia. *Journal of Essential Oil Research*, v. 7, p. 195-197, 1995.

SIRAT, H.M., RAHMAN, A.A., ITOKAWA, H., MORITA, H. Constituents of rhizomes of two *Alpinia* species of Malaysia. *Planta Medica*, v. 62, p. 188-189, 1996.

SLEKAR, K.H., KOSMANN, D.J., CULOTTA, V.C. The yeast copper/zinc superoxide dismutase and the pentose phosphate pathway play overlapping roles in oxidative stress protection. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 28831-28836, 1996.

SMITH, D.A., BANKS, S.W. Formation and biological properties of isoflavonoid phytoalexins, in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships* (Cody V, Middleton E and Harborne JB eds) Alan R. Liss, Incorporated, New York, p. 113-124, 1986.

SPENCER, J.P.E., CHOWRIMOOTO, G., CHOUDHURY, R., DEBNAM, E.S., SRAI, S.K., RICE-EVANS, C. *The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids*. *FEBS Letters*, v. 458, p. 224-230, 1999.

SPENCER, J.P.E., SCHROETER, H., CROSSTHWAITHE, A.J., KUHNLE, G., WILLIAMS, R.J., RICE-EVANS, C. Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 31, p. 1139-1146, 2001a.

SPENCER, J.P.E., SCHROETER, H., KUHNLE, G., SRAI, S.K., TYRRELL, R.M., HAHN, U., RICE-EVANS, C. Epicatechin and its *in vivo* metabolite, 3V-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress-induced cell death involving caspase-3 activation. *The Biochemical Journal*, v. 354, p. 493-500, 2001b.

SPENCER, J.P.E., SCHROETER, H., RECHNER, A.R., RICE-EVANS, C. *Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal Flavonoids 845 tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. Antioxidants & Redox Signaling*, v. 3, p. 1023–1039, 2001c.

SPENCER, J.P.E., SRAI, S.K., RICE-EVANS, C. Metabolism in the small intestine and gastrointestinal tract. In: Rice-Evans, C.; Packer, L., eds. *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, New York, p. 363-390, 2003.

SPEVAK, W., FESSL, F., RYTKA, J., TRACZYK, A., SKONECZNY, M., RUIS H. Isolation of the catalase T structural gene of *Saccharomyces cerevisiae* by functional complementation. *Molecular and Cellular Biology*, v. 3, p. 1545-1551, 1983.

SRINIVASAN, C., LIBA, A., IMLAY, J.A., VALENTINE J.S., GRALLA, E.B. Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of “free iron” as measured by whole cell electron paramagnetic resonance. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 29187-29192, 2000.

STORZ, G., CHRISTMAN, M.F., SIES, H., AMES, B.N. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Science. USA*, v. 84, p. 8917-8921, 1987.

SUGIHARA, N., ARAKAWA, T., OHNISHI, M., FURUNO, K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 27, p. 1313-1323, 1999.

SUGIYAMA, K-I., IZAWA, S., INOUE, Y. The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 15535-15540, 2000.

SUMMERS, C.B., FELTON, G.W. Prooxidant effects of phenolic acids on the generalist herbivore *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae): potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 24, p. 943-953, 1994.

TERZIYSKA, A., WALTSCHWA, L., VENKOV, P. A new sensitive test based on yeast cells for studying environmental pollution. *Environmental Pollution*, v. 109, p. 43-52, 2000.

TICE, R.R. Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants. In: Butterworth, B.E., Corkun, L.D., Guzmán-Rincón, J.(Eds) *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environment Change*. New York: Plenum Press, p. 69-79, 1995.

TICE, R.R., ORMISTON, B.G., BOUCHER, R., LUKE, C.A., PAQUETTE, D.S. Environmental biomonitoring with feral rodent species. In: Sandhu, S., Waters, M.D. (Eds) *Application of short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures*. New York: Plenum Publishing Co., p. 175-180, 1998.

TIMBERLAKE C.F., HENRY B.S. *Plant pigments as natural food colours*. Endeavour, v. 10, p. 31-36, 1986.

TOMODA, M., OHARA, N., SHIMIZU, N., GONDA, R. Characterization of a novel glucan, which exhibits reticuloendothelial system-potentiating and anti-complementary activities, from the rhizomes of *Cnidium officinale*. *Chemical and Biochemistry*, v. 32, p. 235-275, 1994.

VAN DEN BERG, M.E. *Plantas Medicinais na Amazônia- Contribuição ao seu conhecimento sistemático*. Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 1993. 206 p.

VIEIRA, L.S., ALBUQUERQUE, J.M. *Fitoterapia Tropical – Manual de Plantas Medicinais*. FCAP - Serviço e Documentação e Informação. Belém, 1998.

VON BORSTEL, R.C., DRAKE, J.W., LOEB, L.A. Foreword. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 350, p. 1-3, 1996.

WATERS, M.D., STACK, H.F., JACKSON, M.A., BROCKMAN, H.E., DE FLORA S. Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 350, p. 109-129, 1996.

WEISBURGER, E.K. Natural carcinogenic products. *Environmental Science & Technology*, v. 13, p. 278-281, 1979.

WILLIAMS, R.J., SPENCER, J.P.E., RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? *Free Radical Biology & Medicine*, v. 36, p. 838-849, 2004.

WOLFF, S.P., GARNER, A., DEAN, R.T. Free radicals, lipids and protein degradation. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 11, p. 27-31, 1986.

YAMADA, Y., KIKUZAKI, H., NAKATANI, N. Identification of antimicrobial gingerols from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, v. 20, p. 309-311, 1982.

YAMANAKA, N., ODA, O., NAGAO, S. Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu<sup>+2</sup>-induced low density lipoprotein oxidation. *FEBS Letters*, v. 405, p. 186-190, 1997.

YUNES, R., PEDROSA, R C, FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos do Brasil. *Química Nova*, v. 24, p. 147-152, 2001.

YUTING, C., RONGLIANG, Z., ZHONGJIAN, J., YONG, J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 9, p. 19-21, 1990.

ZIMMERMANN, F.K. Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research*, v. 31, p.71-86, 1975.