



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**Estudo da composição química e toxicidade genética do
extrato aquoso de sementes de *Entada polystachya***

Dissertação de Mestrado

Juliane Cristina Bugs de Carvalho

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Estudo da composição química e toxicidade genética do extrato aquoso
de sementes de *Entada polystachya***

Juliane Cristina Bugs de Carvalho

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação
em Biologia Celular e Molecular da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre, fevereiro de 2014

“E o tal livre arbítrio... A todo momento realizamos escolhas. Com a idade você vai adquirindo experiências, vai se adaptando ao meio ao qual está inserido, não somente porque escolheu, mas sim, porque criou e desenvolveu competências para estar onde está, vai crescendo, amadurecendo. E o que fica, apesar de todo esse somatório, é a essência, você sempre será você, por mais que tentem te mudar, por mais que te façam sofrer, por mais que te façam amar, vencer, criar, sorrir. Você sempre será sua essência, porém lapidada pelo tempo e experiência.”

(Juliane Bugs)

APRESENTAÇÃO

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O projeto foi subsidiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento e Formação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - EDITAL TOXINOLOGIA - CAPES nº 063/2010, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) -PRONEX/FAPERGS/CNPq (nº 10/0044-3) e pelo – Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica Royal, Unidade GENOTOX-ROYAL, Centro de Biotecnologia/Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor João Antônio Pêgas Henriques, pela oportunidade de desenvolver esse projeto, pela confiança depositada em meu trabalho, pelos conhecimentos compartilhados, pela amizade e principalmente pela compreensão em vários momentos difíceis. Obrigada por me despertar o interesse científico e a vontade de contribuir com a ciência.

À professora Marilene Henning Vainstein pela oportunidade de participar do desenvolvimento desse projeto.

Ao professor Sidnei da Universidade de Caxias, obrigada pela caracterização química e pelos ensinamentos.

A todos colegas e amigos do laboratório 210, as minhas amigas queridas: Larissa (Moranguinho) para quem não sabe, ela foi MISS MORANGUINHO na infância, desculpa Lari, mas tinha que dizer isso, hahaha... Gosto muito das nossas conversas, e sua praticidade é algo que admiro. A Michele (poxa, bicho...) sem palavras para expressar a nossa afinidade, as minhas queridas colombianas Victória e Grethel, que sempre me deixam com saudades quando viajam de férias para a Colômbia. A Fernanda, Patrícia, Cristiano (meu amigo e ex-colega de faculdade, que me ajudou na bancada e me auxiliou diversas vezes, muito obrigada) e ao André, um queridão. A Nucha pela colaboração nos testes e revisão do artigo.

Ao meu amigo querido e co-orientador (não oficial) Iuri, obrigada por todo o conhecimento compartilhado, pela correção e auxílio no preparo do artigo e dissertação,

pelas conversas, conselhos, puxões de orelha, desabafos, foste mais que um co-orientador, foste um grande amigo, que nossa amizade perdure por muitos anos.

Aos funcionários, em especial a Silvia e ao Luciano, e aos professores do PPGBCM.

A toda família GENOTOX-ROYAL, obrigada por tudo!

Aos meus irmãos por escolha: Fábio, Leila, Juliana, Fernanda, Odete, Ivanilda, Elisete, Luis, Wanessa, Lombardi, Cláudia, Leonardo, Lisiele, Luciana, Iriane, vocês foram muito importantes, obrigada pelas palavras de incentivo e pela torcida, cada um tem um espaço especial em meu coração.

Agradeço a minha família, que é meu “porto-seguro” e fortaleza. Não existem palavras para expressar minha ternura por vocês, em especial, meus pais, João e Leoni e minha irmã, Aline, que são as pessoas mais importantes da minha vida: obrigada por tudo, palavras não são o suficiente para descrever todo amor que sinto por vocês. Não poderia deixar de lembrar da minha prima TOP Carla, obrigada querida pelas conversas e conselhos, superamos juntas um momento importante para ambas. Minha avó linda, Eva, obrigada pelos conselhos, em especial os amorosos e os profissionais, sua sabedoria me encanta a cada dia, que Deus te conceda muito anos de vida, pois preciso muito das suas palavras e seu abraço confortante. E a Deus, que me deu o livre arbítrio e a oportunidade de fazer parte da vida de cada um. Obrigada pelo foco, força e fé.

Somos do tamanho dos nossos sonhos!

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Metabólitos secundários.....	15
1.1.1 Saponinas.....	16
1.1.2. Flavonoides.....	18
1.1.2.1 Chalconas	20
1.2. Plantas medicinais.....	21
1.3. <i>Entada polystachya</i> (L.) (DC) (Leguminosae).....	24
1.4. Composição química e atividades farmacológicas relacionadas aos extratos de plantas do gênero <i>Entada</i>	26
1.4.1. Atividade citotóxica e antiproliferativa.....	27
1.4.2. Atividades antibacteriana, antiparasitária e antiviral	29
1.4.3. Efeito imunomodulador	30
1.4.4. Atividade antidiabética	31
1.4.5. Atividade hepatoprotetora.....	31
1.4.6. Atividade antioxidante.....	31
1.5. Toxicidade genética de extratos vegetais	32
1.6. Estratégias para o estudo do extrato bruto das sementes de <i>E. polystachya</i>	35
1.6.1. Teste Salmonella/microsoma	35
1.6.2. Ensaio com células de mamíferos.....	37
1.6.2.1. Células V79	37
1.6.2.2. Citotoxicidade	38
1.6.2.3. MTT	39
1.6.2.4. Sobrevivência clonogênica	39
1.6.2.5. Teste de Micronúcleo	40
1.6.2.6. Ensaio Cometa.....	43
OBJETIVOS.....	47
Objetivo Geral.....	48
Objetivos Específicos.....	48
CAPÍTULO I.....	49
Chemical characterization, cytotoxic, genotoxic, and mutagenic activities of <i>Entada polystachya</i> (L.) aqueous seed extract.....	49
DISCUSSÃO.....	90
CONCLUSÕES.....	102
Conclusão geral.....	103
Conclusões específicas.....	103
PERSPECTIVAS	105

REFERÊNCIAS	107
CURRICULUM VITAE	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura básica de saponinas	17
Figura 2: Estrutura geral de flavonoides.....	18
Figura 3: Fórmula estrutural básica das chalconas.....	20
Figura 4: Foto de <i>E. polystachya</i>	25
Figura 5: Modelo hipotético mostrando a formação do micronúcleo.	42
Figura 6: Diferentes classes de danos (0-4) de células obtidas pelo Ensaio de Cometa.	45
Figura 7: Modelo esquemático proposto para ao possível mecanismo de toxicidade do extrato aquoso de sementes de <i>E. polystachya</i> , com base nos resultados obtidos neste estudo.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Linhagens utilizadas no Teste de Ames	36
Tabela 2 - Ensaio Cometa: Efeito do pH na avaliação do dano no DNA.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AP	apurínico/apirimidínico
ATP	trifosfato de adenosina
BER	reparo por excisão de bases
CAT	catalase
CIM	concentração inibitória mínima
CP	ciclofosfamida
DNA	ácido desoxirribonucléico
DSB	quebras duplas
SSB	quebras simples
EBSEP	extrato bruto de sementes de <i>Entada polystachya</i>
Endo III	endonuclease III
ERO	espécies reativas de oxigênio
Fapy	formamidopirimidinas
Fpg	formamidopirimidina DNA-glicosilase
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
HR	<i>homologous recombination</i> (reparo por recombinação homóloga)
IC ₅₀	concentração inibitória em 50%
MDA	malondialdeído
MMS	metil metano sulfonato
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium
NHEJ	recombinação não homóloga
TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
SOD	superóxido dismutase
4-HNE	t-4-hidroxi-2-nonenal

RESUMO

As sementes, caule e raízes de várias espécies do gênero *Entada*, tais como *Entada africana*, *Entada abyssinica* e *Entada phaseoloides* são usadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças, como doenças do fígado, doença do sono, e hemorróidas. *Entada polystachya* (L.) DC. (Leguminosae) é uma planta nativa e comum em matas costeiras do oeste do México, América Central, Colômbia e Brasil. A raiz de *E. polystachya* é utilizada no tratamento de doenças venéreas e como diurético. No entanto, a composição química de *E. polystachya* é pouco conhecida e o potencial tóxico desta espécie não foram ainda investigados. Portanto, devido à utilização popular de espécies *Entada* e o interesse na obtenção de novas moléculas com potencial farmacológico, especialmente atividade antiproliferativa, se faz importante avaliar os efeitos tóxicos destas plantas. No presente estudo, foram avaliadas as propriedades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas do extrato bruto de sementes de *E. polystachya* (EBSEP) em dois modelos biológicos: em células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (células V79) e na bactéria *Salmonella typhimurium*. Em células V79 tratadas com concentrações crescentes de EBSEP, a atividade citotóxica, foi determinada usando ensaio de MTT, ocorre na concentração de 10 µg/mL após 2 h de exposição. Consistentemente, o tratamento das células V79 por 2 h com EBSEP aumentaram os níveis de peroxidação lipídica e a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), caracterizando um estado de estresse oxidativo. Nas concentrações maiores de 10 µg/mL, o EBSEP induziu a formação de quebras de DNA em células V79, como evidenciado pelo ensaio cometa alcalino. O EBSEP induziu a danos oxidativos ao DNA, determinados pelo ensaio cometa modificado empregando as endonucleases formamidopirimidina DNA-glicosilase (Fpg) e endonuclease III (endoIII). O tratamento também induziu aumento no número de células binucleadas e na frequência de micronúcleos no teste micronúcleo em células V79, salientando o potencial citotóxico e mutagênico do extrato. O EBSEP pode induzir alteração no quadro de leitura em *S. typhimurium*. Assim, moléculas presentes no extrato podem apresentar um comportamento similar a um agente intercalante. Por fim, a análise por EMAR (Espectrometria de Massa de Alta Resolução) mostrou a presença de glicose, aminoácidos e os compostos: 6-hidroxi-2,6-dimetil-2, 7 - ácido octadienoico (C₁₀H₁₅O₃) e 3-deoxysapanchalcona (C₁₆H₃₁O₂) foram propostos ser uma saponina e uma chalcona, respectivamente. Portanto, devido ao reconhecido potencial tóxico de saponinas e chalconas, estas moléculas podem estar modulando os efeitos tóxicos do extrato. Em resumo, os efeitos celulares do EBSEP parecem ser muito complexos e ligados a habilidade de moléculas presentes no extrato, como a saponina e a chalcona, de induzir distúrbios na homeostase redox celular e na capacidade de intercalar no DNA, que conduzem a dano e a quebras do DNA e morte celular.

ABSTRACT

The seeds, stalk and roots of several related *Entada* species, namely *Entada africana*, *Entada abyssinica* and *Entada phaseoloides* are used in traditional medicine for the treatment of diverse diseases, such as liver diseases, sleeping sickness, and hemorrhoids. *Entada polystachya* (L.) DC. (Leguminosae) is a native and common plant in coastal thickets from western Mexico through Central America to Colombia and Brazil. The root is used in venereal diseases treatment and as diuretic. However, chemical composition of *E. polystachya* is poorly understood and the potential toxic this specie have not been previously investigated. Then, due to popular use of *Entada* species and the interest in obtaining new molecules with pharmacological potential, especially antiproliferative activity, it is important to evaluate the toxic effects of these plants. In the present study, we evaluated the putative cytotoxic, genotoxic, and mutagenic properties of *E. polystachya* crude extract seed (EPCSE) in two biological models: in V79 Chinese lung fibroblast cells and *Salmonella typhimurium*. In V79 cells treated with increasing concentrations of EPCSE, the cytotoxic activity, as determined using MTT assay, occurs in doses up to 10 µg/mL after 2 h of exposure. Accordingly, the treatment of V79 cells for 2 h with EPCSE increased lipid peroxidation and superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, characterizing an oxidative stress status. At the doses up to 10 µg/mL, EPCSE generates DNA strand breaks in V79 cells, as observed using the alkaline comet assay. EPCSE induced pronounced oxidative DNA damage, determined using modified comet assay with the enzymes formamidopyrimidine DNA-glycosylase (Fpg) and endonuclease III (Endo III). The treatment also induced an increase in the number of binucleated and micronucleus frequency cells in the micronucleus test in V79 cells, showing cytotoxic potential and mutagenic risk this extract. EPCSE is able to induce frameshift mutations in *S. typhimurium*. Thus, molecules in EPCSE presents a behavior of an intercalating agent. Finally, the analysis by HRMS (High Resolution Mass Spectrometry) showed the presence of glucose, amino acids and the compounds: 6-hydroxy-2,6-dimethyl-2,7-octadienoic acid (C₁₀H₁₅O₃) and 3-deoxysappanchalcone (C₁₆H₃₁O₂), which were proposed to be a saponin and chalcone, respectively. Therefore, due the toxic potential of saponins and chalcones, these molecules may be modulating the toxic effects of the extract. In summary, the cellular effects of EPCSE appear to be complex and linked to its ability of molecules in extract, such as saponin and chalcone, to impose disturbs in redox cellular homeostasis and in the ability to intercalate into DNA, which lead to DNA damage and breakage, cellular injury and cell death.



Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Metabólitos secundários

Os seres vivos, além do seu metabolismo de subsistência, produzem uma grande variedade de moléculas, tanto para resistência e reprodução, quanto para defesa. Entre estas moléculas produzidas, podemos incluir princípios ativos de origem vegetal com diversos tipos de atividades secundárias ou ainda desconhecidas. Nesta direção, as plantas produzem uma série de produtos químicos que podem ser divididos em dois grandes grupos: os metabólitos primários (lipídeos, protéidos e glicídios) que se relacionam de forma direta à manutenção da vida da própria planta e os metabólitos secundários, compostos produzidos que garantem vantagens (ex. defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra os raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes) para a planta em relação a sua sobrevivência e perpetuação da espécie (Jones e Kinghorn, 2012; Wink, 2012; Kliebenstein, 2013).

Os metabólitos secundários são conhecidos por atuar de forma direta ou indireta no organismo, podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares, por exemplo: interferindo na produção de mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, entre outros); agindo sobre a produção ou ação de segundos mensageiros (como guanosina monofosfato cíclica (GMPc), adenosina monofosfato cíclica (AMPc), proteínas quinases (PKs), etc.), na expressão de fatores de transcrição como proteína ativadora-1 (AP-1), fator nuclear κ B (NF- κ B), e proto-oncogenes (cjun, c-fos e c-myc); inibindo ou ativando a expressão de células pró-inflamatórias como sintetase do óxido nítrico (NOS), ciclooxigenases

(COX), citocinas (interleucina (IL)-1 β , fator de necrose tumoral (TNF)- α , etc.), neuropeptídeos e proteases (Satheeshkumar *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012; Patra *et al.*, 2013).

A grande maioria das moléculas biologicamente ativas provenientes das plantas são metabólitos secundários (flavonoides, saponinas, etc.). Estas substâncias de origem natural exibem considerável diversidade estrutural e tendem a aceitar uma conformação preferida e complexidade estérica necessária para exercer atividades variadas em sistemas biológicos. Quando comparado com compostos orgânicos sintéticos, em geral, as moléculas de produtos naturais têm mais centros quirais, menos heteroátomos, menos átomos pesados (Francis *et al.*, 2002; Cragg e Newman, 2013). Estes atributos fazem dos produtos naturais um recurso inestimável de diversidade química e, portanto, levam à descoberta e otimização da síntese de moléculas com potencial efeito biológico (Satheeshkumar *et al.*, 2012; Kliebenstein, 2013).

1.1.1 Saponinas

Saponinas são um grupo de glicosídeos largamente distribuídos em plantas superiores (Sparg *et al.*, 2004; Vincken *et al.*, 2007). Essas moléculas consistem de açúcares, como glicose, galactose, xilose, metilpentose, ligados a um esqueleto de aglicona por ligação glicosídica. Esta estrutura apresenta caráter anfifílico, parte da molécula com característica lipofílica (esqueleto de aglicona) e outra hidrofílica (açúcares) (Francis *et al.*, 2002; Vincken *et al.*, 2007; Satheeshkumar *et al.*, 2012). Essa característica possibilitam que estas moléculas reduzam a tensão superficial da água e atuem como detergentes e emulsificantes (Sparg *et al.*, 2004; Guclu-Ustundag e Mazza, 2007; Satheeshkumar *et al.*, 2012).

Essas moléculas podem ser classificadas em dois grupos baseado na natureza de seu esqueleto de aglicona, que pode ser esteroidal (Fig. 1A) ou triterpenóide (Fig. 1B). As saponinas esteroidais e as saponinas triterpenóides são mais comumente encontradas em monocotiledôneas e dicotiledôneas, respectivamente (Sahu *et al.*, 2008; Osbourn *et al.*, 2011). Em adição, alguns autores ainda distinguem um terceiro grupo de aminos esteroidais, que são classificadas por outros como alcaloides esteroidais (Guclu-Ustundag e Mazza, 2007).

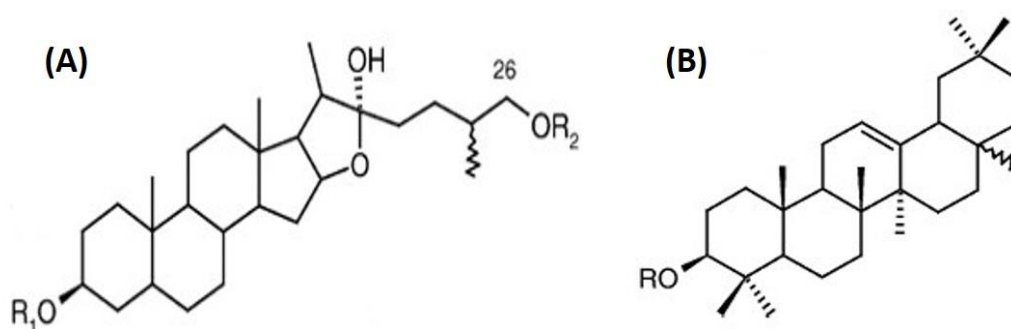


Figura 1: Estrutura básica de saponinas. (A) esteroidal e (B) triterpenóide. Adaptado de Sparg e colaboradores (2004).

A grande complexidade da estrutura das saponinas é relacionada à variabilidade do esqueleto de aglicona, e da natureza e posição dos grupos de açúcares ligados nessa estrutura. Essa diversidade estrutural tem repercussão nas atividades biológicas dessas moléculas que tem atraído considerável interesse no emprego farmacológico dessas substâncias (Sparg *et al.*, 2004; Guclu-Ustundag e Mazza, 2007).

O papel fisiológicos das saponinas não é bem conhecido. Hipóteses em relação a esta questão apontam que estas substâncias estejam, principalmente, envolvidas com o sistema de defesa das plantas, como contra o ataque de patógenos (Francis *et al.*, 2002). Como alternativa, também tem sido proposto que saponinas possam atuar como reserva de monossacarídeos (Dinda *et al.*, 2010; Augustin *et al.*, 2011).

Na indústria farmacêutica, as saponinas possuem importância, sobretudo, como ponto de partida para a síntese de drogas esteroidais (Yoshiki *et al.*, 1998; Osbourn *et al.*, 2011). Muitas dessas moléculas tem propriedades farmacológicas, sendo usadas como medicamentos ou cosméticos (Francis *et al.*, 2002). Neste sentido, algumas atividades biológicas de saponinas têm sido relatadas, entre elas ação hemolítica, moluscida, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antiparasitária, antiviral e antiproliferativa contra diversas linhagens de célula tumorais (Francis *et al.*, 2002; Sparg *et al.*, 2004; Guclu-Ustundag e Mazza, 2007; Bachran *et al.*, 2008).

1.1.2. Flavonoides

Os flavonoides são metabólitos secundários dos vegetais e constituem o principal grupo dentro dos compostos fenólicos. Apresentam como estrutura básica dois anéis aromáticos (anéis A e B) ligados por um anel heterocíclico (anel C), de modo C6-C3-C6 (Fig. 2) (Kumar e Pandey, 2013). A estrutura básica pode possuir numerosos substituintes, como hidroxilação, metilação, glicosilação, acilação ou prenilação (Erdman *et al.*, 2007; Pourcel *et al.*, 2007; Braicu *et al.*, 2013; Kumar e Pandey, 2013).

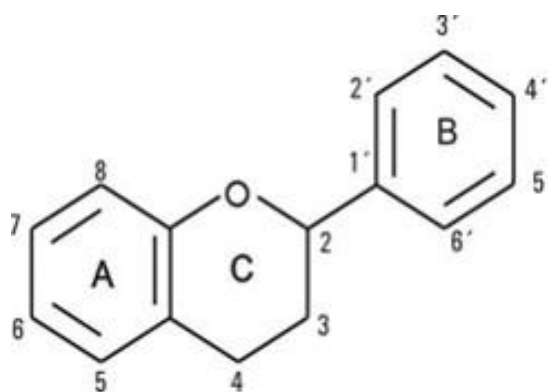


Figura 2: Estrutura geral de flavonoides. Adaptado de Erdman e colaboradores (2007)

As principais subclasses dos flavonoides são as flavonas, flavonóis, flavon-3-óis, isoflavonas, flavononas e antocianinas. Outros grupos menos comuns de flavonoides são dihidroflavonois, flavon-3,4-dios, auronas, cumarinas, dihidrochalconas e chalconas. A maioria destes compostos existe em forma glicosilada, sendo que os grupos hidroxil e açúcares incrementam a solubilidade em água. Grupos metil e isopentil e outros substituintes dão caráter lipofílico aos flavonoides (Pourcel *et al.*, 2007; Kumar e Pandey, 2013).

Os flavonoides desempenham um papel central nas interações das plantas com o ambiente. Neste sentido, estão envolvidos em numerosos mecanismos nas plantas, como a proteção ante a radiação ultravioleta UV, pigmentação, estimulação dos nodos fixadores de nitrogênio e proteção contra vírus, bactérias, fungos e insetos e propriedades organolépticas de frutas e os seus derivados (Kumar e Pandey, 2013; Lu *et al.*, 2013; Veitch, 2013).

Estes compostos podem apresentar atividade antioxidante, podendo ativar enzimas antioxidantes, agir na quelação de metais, inibir oxidases, incrementar as propriedades antioxidantes de outros compostos. Além disso, os flavonoides exibem múltiplos efeitos biológicos como antiviral, antimicrobiano, antitumoral, anti-inflamatório, vasodilatador, pelos quais tem desencadeado a sua importância farmacológica (Hadi *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2011; Prochazkova *et al.*, 2011; Daglia, 2012; Romagnolo e Selmin, 2012; Quinones *et al.*, 2013; Tangney e Rasmussen, 2013).

1.1.2.1 Chalconas

O termo chalconas foi introduzido por Kostanecki e Tabor e são consideradas precursores de flavonas na biossíntese dos flavonóides. As chalconas possuem um esqueleto estrutural de cetona, 1,3-difenil-2-propen-1-one, que pertencem à família dos flavonoides de cadeia aberta, contendo dois anéis aromáticos A e B unidos por três carbonos em um sistema carbonílico α - β -insaturado (Fig. 3) (Sawle *et al.*, 2008; Bandgar *et al.*, 2010; Bukhari *et al.*, 2012; Sahu *et al.*, 2012).

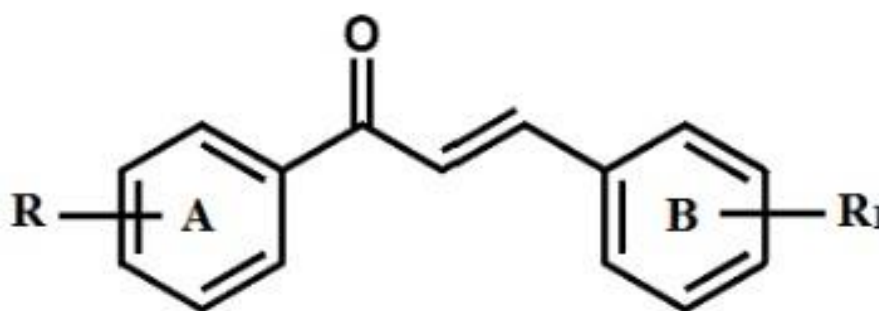


Figura 3: Fórmula estrutural básica das chalconas. Adaptado de Bandgar e colaboradores (2010).

As chalconas apresentam uma vasta gama de atividades biológicas. Atualmente as chalconas têm mostrado atividade hipocolesterolêmica, antinociceptiva, imunomoduladora, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral e antioxidante (Kontogiorgis *et al.*, 2008; Bandgar *et al.*, 2010; Youn *et al.*, 2011; Tran *et al.*, 2012). Ainda, dentre as chalconas muitos compostos mostram citotoxicidade em cultura de células tumorais (Sabzevari *et al.*, 2004; Bandgar *et al.*, 2010; Solomon e Lee, 2012).

1.2. Plantas medicinais

As plantas, portanto, constituem fonte interessante de moléculas com ação farmacológica. De fato, o uso de extratos vegetais e fitoquímicos com fins terapêuticos é uma das mais antigas formas de prática medicinal no tratamento de enfermidades de todos os tipos (Cragg e Newman, 2013; Kirst, 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utiliza plantas medicinais como principal recurso no atendimento básico de saúde. Sendo assim, o interesse em terapias naturais, principalmente em produtos de origem vegetal, tem aumentado muito em países subdesenvolvidos e desenvolvidos, crescendo o comércio internacional de plantas medicinais e o grande interesse do mundo em países que possuam uma flora que possa ser explorada (Farnsworth *et al.*, 1985; Efferth, 2010). O interesse nas plantas não é somente em substâncias novas, mas também de moléculas já conhecidas, só que de uma nova fonte, talvez mais abundante (Cragg e Newman, 2013; Ngo *et al.*, 2013).

A utilização de plantas medicinais no país teve início com a vinda dos primeiros médicos portugueses ao Brasil, diante da escassez, na colônia, de remédios empregados na Europa, perceberam a importância das plantas utilizadas pelos indígenas como medicamento (Calixto, 2005). A primeira descrição sobre o uso medicinal de plantas foi feita por Gabriel Soares de Souza, autor do Tratado Descritivo do Brasil, de 1587. Esse tratado descrevia os produtos medicinais utilizados pelos índios de “as árvores e ervas da virtude” (Simões *et al.*, 2003). Atualmente, estima-se que aproximadamente 44% dos medicamentos vendidos nas farmácias são fabricados a partir de moléculas extraídas de produtos naturais ou de estruturas químicas derivadas (25% de plantas, 14% de microrganismos e 5% de animais) (Barreiro e Bolzani, 2009), e mais de 80% das drogas descobertas são de origem natural ou sintetizadas a partir de compostos naturais

(Hanessian, 2006). Aproximadamente 100 novos produtos de origem natural estão em desenvolvimento clínico, incluindo moléculas antitumorais, antiinflamatórias, antidiabéticas, antimicrobianas, entre outras, sendo a maioria de origem vegetal e microbiana (Butler, 2008; Harvey, 2008; Molinari, 2009; Cragg e Newman, 2013).

A existência, no Brasil, de uma variedade de biomas, atesta o alto potencial da biodiversidade brasileira que deve ser explorado no sentido de buscar moléculas, extratos que possam ser utilizados para aplicação: na área médica, no controle de pragas de importância agropecuária e sanitária, na síntese química e no desenvolvimento de novos compostos farmacologicamente ativos, diagnóstico e tratamento de diferentes patologias, entre outros (Calixto, 2005).

No entanto, apesar da grande biodiversidade existente no país, muitas espécies são usadas empiricamente sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança. A maioria das plantas é utilizada com base no conhecimento popular, observando-se a carência do conhecimento científico de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas. Muitas vezes, as propriedades farmacológicas anunciadas não possuem validação científica, por não terem sido investigadas ou comprovadas. É necessário ter atenção para esse fato, pois, deve haver garantia de segurança em relação aos efeitos tóxicos e conhecimento sobre os efeitos secundários, interações, contraindicações e mutagenicidade (Farnsworth *et al.*, 1985; Calixto, 2005; Viegas Jr e Bolzani, 2011).

Até o momento, pouco se conhece sobre a composição química das plantas da flora brasileira, estimadas entre 40 a 55 mil espécies, sendo que 10 mil podem ser consideradas com potencial aplicação médica e/ou biotecnológica (Barreiro e Bolzani, 2009). O que demonstra que em um país com grande biodiversidade vegetal como o Brasil existe uma grande lacuna entre a oferta de plantas e poucas pesquisas realizadas (Calixto, 2005; Barreiro e Bolzani, 2009). Além disso, verifica-se também escasso

conhecimento a respeito dos constituintes responsáveis pela atividade farmacológica, ou as possíveis interações que envolvam as inúmeras moléculas presentes no extrato da planta (Harvey, 2008). Além da rica biodiversidade da qual dispomos, igualmente importantes são os dados etnofarmacológicos e de uso tradicional de plantas que podem guiar a prospecção por novas substâncias (Barreiro e Bolzani, 2009).

O processo que envolve a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos vem crescendo notadamente nesses últimos anos, e existe uma grande necessidade do desenvolvimento de novos compostos farmacologicamente ativos, que sejam eficazes contra diferentes patologias ainda sem tratamento, ou que possam substituir os existentes com custos reduzidos e também com baixo efeito colateral (Harvey, 2008; Molinari, 2009; Cragg e Newman, 2013). Neste sentido, o estudo do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de diversas substâncias naturais e sintéticas é de grande utilidade, atualmente, já que novos compostos são desenvolvidos com fins farmacológicos, onde sua potencialidade tóxica é fundamental como nas atividades antimicrobianas, antiparasitárias e antitumorais (Calixto, 2005; Pan *et al.*, 2012; Savoia, 2012; Cragg e Newman, 2013).

É importante salientar que as propriedades farmacológicas de extratos brutos de plantas algumas vezes podem ser perdidas quando se isolam componentes específicos. Isto indica que parte dessas propriedades pode estar relacionada com o efeito sinérgico de diversos compostos. Assim, extratos brutos, como por exemplo, extratos aquosos (chás), podem oferecer vantagens a compostos isolados, uma vez que oferecem um menor custo, apresentam atividade farmacológica, baixa toxicidade, além de ser a forma mais utilizada tradicionalmente pela população (Calixto, 2005; Butler, 2008; Diamond e Bailey, 2013; Bauer e Bronstrup, 2014).

1.3. *Entada polystachya* (L.) (DC) (Leguminosae)

A América Tropical, segundo é o maior centro de diversidade de leguminosas, e suas espécies estão representadas próximo ao equador, nas regiões temperadas, nas zonas áridas, nas savanas e nas terras baixas inundadas, como igapós, várzeas, além das florestas de terra firme da região amazônica (Silva e Souza, 2002).

As leguminosas constituem um grupo de plantas bem caracterizada apresentando uma série de caracteres que as diferenciam de outros grupos de plantas, como o fruto predominantemente do tipo legume, os nódulos das raízes onde vivem simbioticamente as bactérias fixadoras de nitrogênio; ovário sempre súpero e flores pentacíclicas (Barroso *et al.*, 1991).

As leguminosas possuem cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies, sendo considerada a terceira maior família entre as Angiospermas, depois das Asteraceae e Orchidaceae. Apresenta distribuição cosmopolita, com centro de diversidade nos trópicos (Lewis *et al.*, 2005). No Brasil está representada por cerca de 200 gêneros e 1500 espécies, distribuídas em quase todas as formações vegetais (Lima, 2000). Na Amazônia, a família conta com cerca de 148 gêneros, que corresponde a quase um terço do total do grupo (3.100 táxons específicos e infraespecíficos), com padrão de distribuição disjunta e/ou contínua e cerca de 21 gêneros provavelmente endêmicos (Silva e Souza, 2002).

É uma das famílias mais importantes na fisionomia e estrutura da flora amazônica, destacando-se pelo número e extensão de distribuição de suas espécies, bem como pelo valor econômico que apresenta. É uma família importante em produtos alimentares, pois vem sendo apontada como uma das principais fontes para a produção de proteína vegetal, em especial para os países subdesenvolvidos. Os frutos e sementes

de leguminosas são utilizados na alimentação, na produção de óleos, resinas, perfumes, tinturas, medicamentos e inseticidas. As folhas produzem forragem de qualidade e a madeira está entre as mais valiosas do mundo, devido ao seu alto poder de combustão (Lima, 2000).

Tradicionalmente, as leguminosas estão divididas em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae. Mimosoideae apresenta 78 gêneros e aproximadamente 3.270 espécies, distribuídos nas regiões tropicais, subtropicais e cálido-temperadas (Barroso *et al.*, 1991; Lewis, 2005).

As subfamílias da família Leguminosae são tradicionalmente diferenciadas através de seus caracteres vegetativos e reprodutivos. Assim, Mimosoideae distingui-se das demais, principalmente por apresentar flores actinomorfas e corola com prefloração valvar, frequentemente gamopétala (Lewis, 2005; Souza e Lorenzi, 2005).

A planta em estudo, *Entada polystachya* (L.) DC. (Fig.4), pertence à família Leguminosae, subfamília Mimosoideae e apresenta como sinônimo de nomenclatura: *Entada polyphylla* Benth.; *Entadopsis polyphylla* (Benth) Britton.; *E. polystachya* (L.) Britton.; *Mimosa polystachya* L., e nome popular de cipó-da-beira-mar (Corrêa, 1952).



Figura 4: Foto de *E. polystachya*. Extraído de Lopes e colaboradores (2007)

Trata-se de uma trepadeira alta, folhas longo-pecioladas, pecíolos de 16-20 cm, bipinadas, terminando com cirro, compostas de pinas com 2-6 jugos e folíolos com 6-8 jugos, oblongos ou ovados, obtusos ou emarginados, com até 4 cm de comprimento, glabros nas duas páginas; flores brancas ou esverdeadas, monossépalas e polipétalas, pequenas, numerosíssimas, reunidas em espigas curtas, dispostas em racemos afilos, densos e paniculados, de 30-65 cm; fruto, é uma vagem achatada, articulada coriácea, com até 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, não contraída entre as sementes e tendo bem nítidas as linhas transversais de separação dos artículos. Sementes arredondadas medindo cerca de 2 cm (Corrêa, 1952).

Com relação à distribuição a *E. polystachya* (L) (DC), distribui-se desde o México, América central, Pequenas Antilhas até a América do Sul, sendo registrada ao norte da Colômbia, Guianas, Equador, Bolívia e Brasil: de Roraima ao Maranhão. Nas restingas do Pará, ocorre na formação aberta de moitas, brejo herbáceo, campo de dunas e floresta de restinga (Lopes *et al.*, 2007).

1.4. Composição química e atividades farmacológicas relacionadas aos extratos de plantas do gênero *Entada*

Os estudos referentes aos extratos de espécies do gênero *Entada* tem mostrado uma diversidade de metabólitos com atividades biológicas, principalmente polissacarídeos, saponinas e compostos fenólicos, como flavonoides (Liu *et al.*, 1972; Siddhuraju *et al.*, 2002; Da Silva e Parente, 2010; Zhao *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2012; Mo *et al.*, 2013).

Os extratos de diferentes partes das plantas do gênero *Entada* são utilizados na medicina tradicional, sobretudo em diferentes partes da África e da China, sendo utilizadas popularmente como antídoto, antipirético, antisséptico, fortificante, diurético, tônico e no tratamento para vários tipos de doenças, entre elas dores de estômago, gastrite, erupções cutâneas, bronquite, reumatismo, catarata, disenteria, hemorroidas, diabetes, malária e hepatite (Sugimoto *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Sugimoto *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2012; Owona *et al.*, 2013). Com base no conhecimento etnobotânico, diversos efeitos terapêuticos foram observados em relação aos extratos e moléculas isoladas de espécies desse gênero, como efeito antidiabético, antioxidante, antibacteriana, antiviral, antiparasitário, moluscida, anti-inflamatório, antiproliferativo e hepatoprotetor (Yasuraoka *et al.*, 1977; Sanogo *et al.*, 1998; Olajide e Alada, 2001; Nyasse *et al.*, 2004; Cioffi *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2012; Ezenyi *et al.*, 2013; Mo *et al.*, 2013; Nzowa *et al.*, 2013).

Faz-se importante ressaltar que o único estudo relativo à espécie *E. polystachya* foi realizado por Da silva e Parente (2010) que identificaram uma nova saponina triterpenóide, a partir do extrato metanólico. Esta saponina apresentou atividade hemolítica *in vitro* e aumentou a resposta imune em ratos quando conjugada com ovalbumina, sugerindo um potencial uso como adjuvante em vacinas. No entanto, não há relatos a respeito da toxicidade genética de nenhuma planta do gênero, sendo o presente estudo pioneiro neste sentido.

1.4.1. Atividade citotóxica e antiproliferativa

Os extratos das espécies de *Entada* já estudados anteriormente apresentaram atividade citotóxica em diferentes tipos celulares. Neste sentido, Cioffi e colaboradores

(2006) atribuíram atividade antiproliferativa ao extrato das raízes de *E. africana* contra células de monócito murino (J774.1), epitélio renal humano (HEK-293) e fibrosarcoma murinho (WEHI-164).

O efeito citotóxico dos extratos de plantas do gênero parece ser influenciado pela presença de saponinas (Sparg *et al.*, 2004; Cioffi *et al.*, 2006; Da Silva e Parente, 2010). Neste raciocínio, Siddhuraju e colaboradores (2002) identificaram entre os principais constituintes tóxicos das sementes de *E. phaseoloides* um composto pertencente ao grupo de saponinas triterpenoides possuindo alta atividade hemolítica contra eritrócitos bovinos e causando alta mortalidade em peixes (*Oreochromis niloticus*). Ainda, Liu e colaboradores (1972) isolaram da fração metanólica de sementes de *E. phaseoloides* uma saponina semelhante estruturalmente ao ácido entagênico mostrando 54% de inibição do crescimento de carcinosarcoma (Walker 256) em ratos em concentrações superiores a 14 mg/Kg. Mo e colaboradores (2013) identificaram uma nova saponina da fração *n*-butanólica do extrato etanólico de semente dessa espécie, a Phaseoloideside E (PE), que apresentou ação antiproliferativa ($IC_{50} > 23 \mu M$) em células de carcinoma hepático (HepG-2), câncer de cólon (SW480), células de câncer cervical (HeLa) e de câncer de esôfago (Ec-109). O efeito antiproliferativo foi mais acentuado nas células Ec-109 e os valores de IC_{50} foram semelhantes à cisplatina.

Ainda neste sentido, duas saponinas triterpenoides, redinosídeo A e B, foram isoladas do extrato de sementes de *E. rheedei* e apresentaram potencial citotóxico ($IC_{50} > 89.75 \mu g/mL$ e $> 20.48 \mu g/mL$, respectivamente) em linhagens tumorais humanas de glioblastoma (T98G), carcinoma (A431), adenocarcinoma de próstata (PC3) e ainda melanoma de camundongo (B16-F1). O potencial citotóxico das saponinas foram consideravelmente menores em comparação com cisplatina ($IC_{50} > 0.9 \mu g/mL$) (Nzowa *et al.*, 2010). Sugimoto e colaboradores (2011) identificaram cinco novas saponinas

triterpenoides (pursateosídeos A-E) do extrato metanólico das sementes de *E. pursaetha*, com estrutura similar ao ácido entagênico e com atividade antiproliferativa contra células de câncer de cólon (HCT-116 e HT-29).

1.4.2. Atividades antibacteriana, antiparasitária e antiviral

Atividade antibacteriana do extrato de caule de *E. phaseoloides* foi demonstrada por Li e colaboradores (2012) que isolaram diversos flavonoides (quercitina, luteonina, apigenina, galangina, narigenina, catequinas, epicatequinas e flavonas), os quais apresentaram atividade citotóxica contra bactérias gram-positivas (*Enterococcus* e *Bacillus subtilis*), gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). O extrato etanólico da raiz e de caule de *E. africana* mostraram efeito inibitório no crescimento de *Staphylococcus aureus* (CIM = 1.56 µg/mL e <0.39 µg/mL, respectivamente) (Magassouba *et al.*, 2007).

O extrato de raiz de *E. abyssinica* foi utilizado para tratar a tripanossomíase humana (doença do sono) causada pelos parasitas flagelados *Trypanosoma brucei gambiense* e *T. b. rhodesiense*, respectivamente. Após o fracionamento do extrato, as frações diclorometano inibiram o crescimento *in vitro* dos parasitas (CIM = 56 µg/mL). A partir da fração diclorometado, foi isolado um diastereoisômero do tipo clerodano diterpeno kolavenol, que apresentou atividade tripanocida, embora com potencial inferior a outras drogas como suramina (IC₅₀ = 0.01 µg/mL) e melarsoprol (IC₅₀ = 0.007 µg/mL), contra *Trypanosoma brucei rhodesiense* (IC₅₀ de 2.5 µg/mL), o agente causador da forma aguda da tripanossomíase humana (Freiburghaus *et al.*, 1998).

Uma importante possível aplicação de *E. africana* no tratamento da malária, foi sugerida por Ezenyi e colaboradores (2013) que demonstraram a atividade antiplasmodial

do extrato etanólico do caule da planta contra o parasita *Plasmodium falciparum*, agente causador da doença.

Ainda, Nzowa e colaboradores (2013) isolaram a partir da fração acetato de etila do extrato etanólico de sementes de *E. rheedei* dois novos derivados do triptofano, N-sulfonil-L-triptofano (tryptorheedei A) e 3-(N-sulfonylindolyl)-D-ácido láctico (tryptorheedei B). Ambos os compostos 1 e 2 promoveram a ocorrência de infecções precoces em portadores de HIV, provavelmente através da inibição da enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) e impedindo o esgotamento do triptofano. A inibição da IDO aguda da infecção por HIV inibe a replicação viral, mas a ativação crônica do IDO leva ao comprometimento imunológico em AIDS.

1.4.3. Efeito imunomodulador

No estudo realizado por Zheng e colaboradores (2012) foi evidenciado potencial anti-inflamatório do extrato de caule de *E. phaseoloides* pela redução dos níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), fator de necrose alfa (TNF- α) e proteína C-reativa (CRP).

Owona e colaboradores (2013) também apontaram esse tipo de atividade, mostrando que a fração diclorometano-metanol 5% do extrato de caule de *E. africana* possui polissacarídeos com capacidade imunomodulatória interagindo com o sistema complemento. A fração do extrato, em concentrações maiores do que 0.1 $\mu\text{g/mL}$, também reduziu a inflamação provocada por lipopolissacarídeos (LPS) em células de micróglia (N9) em ratos e em modelo de macrófagos (RAW 264.7), sendo que em ambos os casos houve redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-10 e IL-13), TNF- α , na atividade das enzimas óxido nítrico sintase (87% de inibição) e p38 MAP cinase (30% de inibição) (Ayissi Owona *et al.*, 2013). Os resultados

referentes à redução na inflamação na micróglia sugere um potencial uso de *E. africana* no tratamento de doenças neurodegenerativas (Owona *et al.*, 2013).

1.4.4. Atividade antidiabética

O possível potencial de aplicação da semente no tratamento da diabetes foi indicada por Zheng e colaboradores (2012). No estudo, os autores realizaram a administração oral do extrato de saponinas totais, presentes nas sementes de *Entada phaseoloides*, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/Kg em ratos com Diabetes mellitus do tipo II (T2DM). Os resultados apontaram uma possível atividade antidiabética das saponinas pela redução dos níveis plasmáticos de glicose e lipídios nos ratos tratados.

1.4.5. Atividade hepatoprotetora

Sanogo e colaboradores (1998) mostraram que frações de acetato de etila e butanólica do extrato aquoso de raiz de *E. africana* reduzem o dano hepático em ratos. Após indução de dano hepático com tetracloreto de carbono (CCl₄) e administração das frações do extrato houve redução dos níveis séricos das enzimas transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP). Esses resultados são uma indicação que o extrato induziu reparação dos danos do tecido hepático causada pelo CCl₄.

1.4.6. Atividade antioxidante

Em contraste ao seu efeito citotóxico, o extrato etanólico do caule de *E. phaseoloides* e a fração de acetato de etila do caule de *E. phaseoloides* apresentaram

acentuado efeito antioxidante quando avaliado pelo ensaio com 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Em contraste, as frações butanólica e aquosa apresentaram fraca atividade antioxidante. Esse efeito foi atribuído aos compostos fenólicos e saponinas presentes na composição do extrato etanólico e na fração de acetato de etila (Dong *et al.*, 2012). As saponinas, redinosídeos A e B, de *E. rheedei* também apresentaram potencial antioxidante pelo ensaio de DPPH (Nzowa *et al.*, 2010).

1.5. Toxicidade genética de extratos vegetais

As células estão em constante interação com o meio interno e o meio externo (ambiente), representado pelo fluido intersticial e tecidos adjacentes. As interações químicas entre as diversas substâncias tanto exógenas quanto endógenas e lipídios, proteínas e ácidos nucléicos podem conduzir a alterações da estrutura física dessas biomoléculas. Entre as biomoléculas, somente os ácidos nucléicos não são passíveis de substituição quando danificados, mas podem ser reparados. A fidelidade do processo de reparação de DNA é requisito fundamental para evitar que uma lesão física na estrutura da fita fixe-se no genoma na forma de mutação (Marnett e Plastaras, 2001; Hubscher e Maga, 2011; Jones e Petermann, 2012; Khobta e Epe, 2012).

Uma lesão a um ácido nucléico, denominada lesão genotóxica, corresponde a uma alteração na estrutura química e/ou física da dupla hélice, perturbando as funções que necessitam da integridade conformacional do polímero, tais como a replicação e transcrição. Essas lesões são variadas e incluem quebras simples, quebras duplas, ligações cruzadas entre as fitas de DNA de moléculas diferentes, ligações cruzadas entre DNA e proteínas e DNA e lipídios, distorções na hélice, formação de dímeros, pontes intercadeias, alquilações das bases, perda de bases, desaminações, depurinações (comum nas altas temperaturas que ocorrem durante a inflamação sistêmica) e

oxidações das bases, entre outras (Marnett e Plastaras, 2001; Jackson e Bartek, 2009; Ide *et al.*, 2011; Stone *et al.*, 2011; Dizdaroglu, 2012).

Imediatamente após o estresse genotóxico, as vias de sinalização que percebem o dano reduzem a velocidade de progressão do ciclo celular, com o intuito de favorecer a reparação do material lesado (Huen e Chen, 2010; Van Vugt e Yaffe, 2010; Medema e Macurek, 2012; Heijink *et al.*, 2013). Quando a lesão é muito complexa e/ou muito numerosa, as vias de indução de morte celular programada eliminam a célula danificada da população (Roos e Kaina, 2006; Nowsheen e Yang, 2012; De Zio *et al.*, 2013). No entanto, algumas vezes, um sistema de reparação de DNA permite que a célula tolere o dano – síntese translesão de DNA - e embora não consiga corrigir a lesão eficientemente, garante a sobrevivência celular; desse modo, as lesões removidas de forma ineficiente acabam gerando a reparação incorreta da sequência de nucleotídeos original, causando mutação gênica (Sale, 2013). Em verdade, quando uma lesão genotóxica não é reparada antes da divisão celular, tem-se uma situação muito delicada, que frequentemente acarreta eventos recombinacionais, aberrações cromossômicas e instabilidade genômica como consequência da ação das DNA polimerases atuantes na síntese translesão (Ho e Scharer, 2010; Livneh *et al.*, 2010). É importante considerar que os tecidos do organismo possuem diferentes capacidades de reparação das lesões ao DNA bem como graus diferenciados de suscetibilidade a agentes genotóxicos, fato que é uma consequência da capacidade de proliferação celular de cada tecido, do conteúdo hídrico e lipídico, da ploidia e do metabolismo (Chow e Poon, 2010; Sperka *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2013).

Essas mutações gênicas podem atingir alvos críticos, como proto-oncogenes, genes supressores de tumor, genes envolvidos na reparação de DNA ou indução de apoptose, acarretando alterações no ciclo celular, acúmulo de mutações, mutações na

estrutura física dos cromossomos - mutação cromossômica - configurando um quadro de extrema instabilidade genômica, o qual desencadeia a transformação celular maligna, o primeiro evento do processo carcinogênico. As estratégias para erradicar as células tumorais são diversas, mas o postulado mais antigo da quimioterapia baseia-se nos mesmos mecanismos que atuaram como geradores do problema. Uma vez que as lesões genotóxicas podem perturbar a manutenção da integridade genômica e causar uma transformação maligna, o uso de drogas (e radiações) que causem lesões extensas ao DNA dessas células, as quais proliferam em maior ritmo que células saudáveis, podem induzir a morte celular programada e bloquear o desenvolvimento tumoral (Hanahan e Weinberg, 2000; Mirzayans *et al.*, 2012; Cheung-Ong *et al.*, 2013; Muller e Vousden, 2013; Woods e Turchi, 2013).

Nesta direção, houve um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais, especialmente de plantas, no campo da oncologia propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antiproliferativa. Uma proporção importante dos fármacos antitumorais com ação citotóxica e genotóxica atualmente utilizados em clínica foi obtida a partir de produtos naturais (Calixto, 2005; Pan *et al.*, 2012; Cragg e Newman, 2013). Dentre estes se destacam a vimblastina (Velban®) e a vincristina (Oncovin®) e os análogos vindesina (Eldisine®) e vinorelbina (Navelbine®); o paclitaxel (Taxol®) e o análogo docetaxel (Taxotere®); a podofilotoxina e os análogos, etoposídeo (Etopophos®) e teniposídeo (Vumon®); e a camptotecina e os análogos, topotecano (Hycamtin®) e irinotecano (Camptosar®) (Calixto, 2005; Pan *et al.*, 2012). Portanto, a descoberta de fármacos antineoplásicos de fácil administração e com poucos ou insignificantes efeitos colaterais é uma das principais metas buscadas (Molinari, 2009).

Assim, uma grande quantidade de moléculas derivadas de plantas com atividade citotóxica e genotóxica com potencial emprego em terapias antitumorais ainda pode ser revelada (Calixto, 2005).

1.6. Estratégias para o estudo do extrato bruto das sementes de *E. polystachya*

1.6.1. Teste Salmonella/microsoma

O teste *Salmonella/microsoma* é um ensaio bacteriano de curta duração que visa identificar substâncias que causem danos genéticos e possam evoluir a mutações. Ele foi desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames e seus colaboradores na década de 70 e está baseado na indução de mutações reversas em linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina que as conduzem à prototrofia (Maron e Ames, 1983; Mortelmans e Zeiger, 2000).

O teste emprega várias linhagens de *Salmonella* dependentes de histidina, cada estirpe transporta diferentes mutações em vários genes do operon histidina. Essas mutações atuam como pontos para agentes mutagênicos que causam danos no DNA por meio de mecanismos diferentes (Mortelmans e Zeiger, 2000; Escobar *et al.*, 2013).

Quando as cepas de *Salmonella* são cultivadas numa placa de ágar com meio mínimo contendo um pouco de histidina, somente as bactérias que reverterem para a independência de histidina (His⁺) são capazes de formar colônias. Entretanto, quando um agente mutagênico é adicionada à placa, o número de colônias revertentes por placa é aumentada, frequentemente de uma forma relacionada com a dose resposta (Maron e Ames, 1983; Gatehouse, 1987; Mortelmans e Zeiger, 2000)

Cada linhagem de *S. typhimurium* é mutada de forma diferente no operon da histidina, o que confere maior especificidade na detecção de um determinado tipo de mutágeno (Tabela 1) (Mortelmans e Zeiger, 2000; Escobar *et al.*, 2013). A linhagem TA100 detecta compostos mutagênicos que causam substituição de pares de base do DNA, por meio de uma mutação no gene *his_{G46}*, que codifica a primeira enzima da biossíntese de histidina e têm como ponto preferencial para a reversão o par GC, sendo a mutação uma substituição de uma prolina por uma leucina (Maron e Ames, 1983; Mortelmans e Zeiger, 2000). A linhagem TA98 detecta agentes mutagênicos que causam erro no quadro de leitura do DNA e apresenta como ponto preferencial de lesão oito resíduos repetitivos GC no operon do gene *his_{d3052}* (Maron e Ames, 1983; Escobar *et al.*, 2013).

Tabela 1- Linhagens utilizadas no Teste de Ames

Linhagem	Genótipo	Tipo da Mutação Detectada	Referência
TA100	<i>bio chlD uvrB gal, rfa, pKM101</i>	Substituição de pares de bases	(Mortelmans e Zeiger, 2000)
TA98	<i>bio chlD uvrB gal, rfa, pKM101</i>	Alteração no quadro de leitura	(Mortelmans e Zeiger, 2000)

1.6.2. Ensaio com células de mamíferos

1.6.2.1. Células V79

Os ensaios de mutagênese empregando células de mamíferos em cultura datam de 1968 e as primeiras linhagens celulares utilizadas para esse propósito foram os fibroblastos de pulmão de hamster chinês, conhecida como V79, e as células de ovário de hamster chinês, as CHO (Bradley *et al.*, 1981).

As células V79 apresentam características importantes para ensaios de toxicologia genética, ou seja, são de fácil cultivo e manutenção, apresentam crescimento rápido e curto período de adaptação, elevada eficiência de clonagem em torno de 75-95%, pertencem ao gênero masculino, possuem tempo de geração entre 12 e 16 horas, bem como uma boa capacidade de iniciar um rápido crescimento exponencial a partir um pequeno inóculo, além de apresentam cariótipo estável (22 ± 1). Essas células recuperam-se rapidamente após estoque em nitrogênio líquido, permitindo criopreservação, e possuem uma baixa frequência de mutação espontânea (Bradley *et al.*, 1981; Doehmer, 1993).

Os elementos básicos de estrutura e reparação de DNA nas células V79 são similares, mas não idênticos aos de células humanas (Bradley *et al.*, 1981). De tal maneira, as consequências da interação química de xenobióticos com o DNA sejam de células humanas, sejam de célula V79, são similares. Portanto, os resultados obtidos nessa linhagem são relevantes para humanos, sendo inclusive mais importantes que a extrapolação dos dados obtidos em procariotos (Bradley *et al.*, 1981; Doehmer, 1993; Degrandi *et al.*, 2010). Além disso, essas células podem ser adaptadas para uso com sistemas de ativação metabólica, simulando o metabolismo *in vivo* para detecção de pró-

mutágenos (Rosa, Do Nascimento Picada, *et al.*, 2007; Degrandi *et al.*, 2010; Lemos *et al.*, 2011). Entretanto, se faz importante ressaltar que as células V79 possuem a proteína p53 com duas mutações, o que leva a uma alteração na sua atividade, conseqüentemente a extrapolação dos resultados obtidos com estas células deve ser feita de forma muito cuidadosa (Chaung *et al.*, 1997).

Sendo assim, as células V79 apresenta uma reconhecida importância em estudos de genotoxicidade. Para avaliação de lesões ao DNA utiliza-se principalmente o ensaio cometa, já para a avaliação de potencial mutagênico, utiliza-se o ensaio de mutação empregando o locus da hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase. Uma pequena porcentagem de trabalhos avalia mutação utilizando marcas auxotróficas e prototróficas, mutações que conferem sensibilidade à temperatura e mutações medidas pela resistência a várias drogas. O ensaio de micronúcleo é utilizado para avaliar quebras cromossômicas (Doehmer, 1993; Fenech, 2000; Olive e Banath, 2006).

As células V79 têm sido amplamente empregadas em estudos variados, como estresse oxidativo (Shin *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 2009; Grosicka-Maciag *et al.*, 2011), mutagênese e reparação de DNA (Snyder e Arnone, 2002; Degrandi *et al.*, 2010), mecanismos da morte celular programada (Filipczak *et al.*, 2012; Ghosh *et al.*, 2012) e metabolismo (Oda, 2006; Doehmer, 2009).

1.6.2.2. Citotoxicidade

Os efeitos citotóxicos (danos celulares), se suficientemente intensos, poderão comprometer a viabilidade da célula perturbando sua integridade estrutural e/ou metabólica, a sua integridade reprodutiva, causando inibição da divisão celular ou morte celular (Albertini *et al.*, 2000).

Em virtude dos diversos danos celulares, existem diferentes metodologias para analisar a citotoxicidade de um dado composto ou mistura de compostos.

1.6.2.3. MTT

O teste de MTT (sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium) é utilizado para avaliar a citotoxicidade, sendo considerado um ensaio de curta duração e utilizado para medir a proporção de células viáveis após contato com agente citotóxico. O MTT, quando incubado com células metabolicamente ativas, é reduzido por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo para um composto roxo pela formação dos cristais de formazan (Hatok *et al.*, 2009; Sumantran, 2011; Van Meerloo *et al.*, 2011).

1.6.2.4. Sobrevivência clonogênica

Os testes de longo prazo, geralmente são usados para demonstrar a capacidade metabólica ou proliferativa das células após influência tóxica, cujo objetivo final é medir a sobrevivência das células, uma vez que a sobrevivência implica na retenção da capacidade regenerativa da célula e têm sido a base da maioria dos testes de citotoxicidade. Por outro lado, ensaios de citotoxicidade não clonogênicos às vezes podem superestimar a citotoxicidade por não avaliarem danos reversíveis ou regeneração de células resistentes à droga/agente citotóxico. Por estas razões, é aconselhável incluir ensaios de sobrevivência de células em estudos de citotoxicidade *in vitro* em linhagens celulares (Parent-Massin, 2001; Stewart e Dorr, 2009; Sumantran, 2011).

O ensaio clonogênico avalia os efeitos citostáticos de longo prazo de uma droga (composto)/agente citotóxico, medindo a capacidade proliferativa de uma única célula para formar um clone e produzir uma colônia viável. O ensaio clonogênico é o mais confiável quando é avaliado índice de letalidade da célula (Parent-Massin, 2001; Sumantran, 2011). Estas observações podem ser explicadas pela constatação de que o dano no DNA correlaciona diretamente com redução da eficiência de clonagem e foi associada com o aparecimento de marcadores de apoptose em certas linhagens de células tumorais (Parent-Massin, 2001; Sumantran, 2011).

1.6.2.5. Teste de Micronúcleo

O teste de micronúcleo tem sido amplamente usado, nos últimos anos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Fenech *et al.*, 2011; Morita *et al.*, 2011; Samanta e Dey, 2012). Esse teste oferece a vantagem de ser simples e rápido na detecção de danos cromossômicos induzidos e permite o estabelecimento de correlações entre diferentes sistemas de avaliação biológica em um determinado sistema de células. O ensaio de micronúcleo é hoje um dos testes citogenéticos mais bem estabelecidos, com validação internacional e aplicável a qualquer população celular nucleada (Fenech, 2000; Fenech *et al.*, 2011).

Os micronúcleos são formados de fragmentos cromossômicos ou cromatídicos acêntricos e de cromossomos inteiros que não são incorporados no núcleo da célula filha durante a divisão celular. Eles são corpúsculos contendo DNA sem qualquer conexão estrutural com o núcleo principal. A presença de micronúcleos pode ser considerada um indicativo prévio da existência de alterações cromossômicas (Fenech, 2000; Fenech *et al.*, 2011). Neste sentido, as anormalidades na estrutura do cromossomo são uma consequência direta do dano em nível de DNA. Por exemplo, as quebras

cromossômicas podem resultar de quebras duplas de DNA não reparadas e os rearranjos cromossômicos, do reparo incorreto de quebras na fita de DNA (Pastwa e Blasiak, 2003).

A perda de cromossomos e os erros de segregação são eventos importantes na carcinogênese, causados principalmente por defeitos na formação do fuso, centrômero e alterações na condensação da cromatina antes da metáfase (Fenech *et al.*, 2011). Sendo assim, o estudo do dano de DNA em nível cromossômico é uma parte essencial da toxicologia genética, já que a mutação cromossômica é um evento importante na carcinogênese. Os ensaios de micronúcleos têm emergido como um dos métodos preferidos para avaliar esses danos porque eles permitem que tanto a perda cromossômica quanto as quebras cromossômicas possam ser medidas de forma confiável (Fenech, 2000; Tilmant *et al.*, 2013).

O micronúcleo constitui um índice de quebras cromossômicas permanentes e perda cromossomal que pode ser detectado em células que tenham completado ao menos um ciclo de divisão celular, sendo desejável a avaliação no estágio de células binucleadas (Fenech, 2000; 2006). Ocasionalmente, pontes nucleoplásmicas entre os núcleos também podem ser observadas e frequentemente correspondem a cromossomos dicêntricos em que os centrômeros foram deslocados para pólos opostos da célula, constituindo assim em um indicativo de rearranjo cromossômico. Dessa forma, o teste de micronúcleos detecta mutagênese cromossômica do tipo aberrações numéricas e cromossômicas, clastogênese, aneugênese e também danos no fuso mitótico. O micronúcleo aparece pela primeira vez no final da primeira divisão mitótica, após clastogênese ou aneugênese, porém micronúcleos adicionais podem se formar nas divisões seguintes, porém as células precisam ter passado por um ciclo mitótico (Fenech, 2006; 2007; Fenech *et al.*, 2011).

A frequência de células com micronúcleo reflete o nível de dano induzido por agentes que originam quebras e/ou problemas no fuso mitótico, detectando tanto clastogênese como aneugênese (Fenech, 2000; 2007).

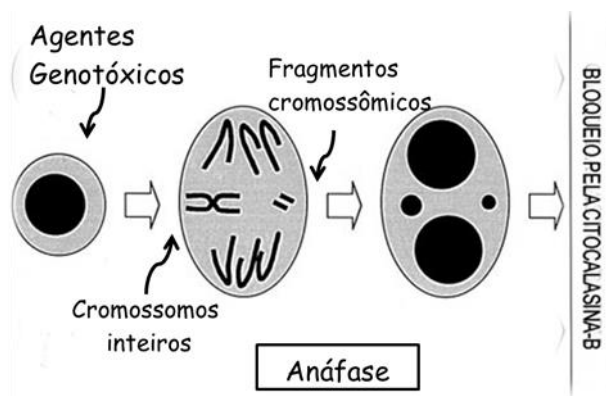


Figura 5: Modelo hipotético mostrando a formação do micronúcleo. A origem de micronúcleos de atraso cromossomos inteiros e fragmentos do cromossoma acêntricos em anáfase. O papel da citocalasina-B no bloqueio da divisão celular na fase binucleada também é indicado no diagrama. O exemplo mostrado é para uma célula hipotética com apenas dois pares de cromossomos. Adaptado de Fenech (2000).

No ensaio de micronúcleo com bloqueio da citocinese por citocalasina-B as células que completaram uma divisão nuclear são impedidos de realizar a citocinese e são facilmente identificadas pela sua aparência binucleadas (Figura 5). A citocalasina-B é um inibidor da polimerização da actina necessárias para a formação de anéis microfilamentosos que comprimem o citoplasma entre os novos núcleos (filhos) durante a citocinese (Fenech, 2000; 2007).

O uso de citocalasina-B permite a acumulação de praticamente todas as células em divisão na fase binucleada em populações de células em divisão, independentemente do seu grau de sincronia e a proporção de células em divisão (Fenech, 2000; 2006; 2007).

Atualmente o teste de micronúcleo o qual utiliza o bloqueio da citocinese é um método útil para medida não somente de quebras, perdas e não disjunções

cromossômicas, mas também necrose, apoptose e efeito citostático (Fenech *et al.*, 1999; Fenech, 2000).

1.6.2.6. Ensaio Cometa

O ensaio cometa ou SCGE (*Single Cell Gel Eletrophoresis Assay*) é amplamente empregado para avaliar danos e reparação do DNA em células eucarióticas. A popularidade deste teste deve-se à sua sensibilidade, custo relativamente baixo e simplicidade. Além disso, o teste pode ser realizado em uma suspensão celular contendo uma população pequena de células, em proliferação ou não, e corresponde a um teste citogenético (Collins, 2004; Olive e Banath, 2006; Dhawan *et al.*, 2009; Kawaguchi *et al.*, 2010; Collins e Azqueta, 2012).

O princípio do teste leva em conta o comportamento do DNA em células individualizadas e sua organização no núcleo celular. Para a realização do ensaio, as células são embebidas em agarose, suas membranas são rompidas com uso de detergentes em pH alcalino e as proteínas nucleares são removidas com uso de altas concentrações salinas. Dessa maneira, em lâmina permanece apenas o nucleoide. Quando a lâmina é submetida ao campo elétrico, o DNA do nucleoide migra no gel de acordo com seu tamanho, os fragmentos pequenos migram com uma velocidade maior que a matriz nuclear. Sendo assim, os fragmentos do DNA danificado formam após migrarem “um cometa” e a extensão da migração correlaciona-se diretamente com a quantidade de dano ocorrido (Tice *et al.*, 2000; Collins, 2004; Dhawan *et al.*, 2009; Kawaguchi *et al.*, 2010).

Existem dois protocolos principais para a execução do teste: a versão neutra (pH entre 7,0 e 8,0) para a detecção de quebras duplas nas fitas de DNA e ligações cruzadas

DNA-DNA, DNA-proteína e a versão alcalina (pH maior que 13,0) que desnatura o DNA, podendo detectar quebras simples e duplas, sítios de reparo por excisão incompletos, sítios álcali-lábeis, e as ligações cruzadas. A versão alcalina é mais empregada por ser mais abrangente, pois além de detectar danos diretos, torna possível a avaliação de danos indiretos como lesões por metilação e adutos. Além disso, pode-se ainda utilizar o protocolo levemente alcalino, cuja eletroforese acontece em pH 12,1 e assim não detecta danos álcali-lábeis (Tabea 2) (Tice *et al.*, 2000; Olive e Banath, 2006)

Tabela 2 - Ensaio Cometa: Efeito do pH na avaliação do dano no DNA

pH 7-8	pH 12,1	pH > 13
Quebras duplas de DNA	Quebras duplas de DNA	Quebras duplas de DNA
Crosslinks	Quebras simples de DNA	Quebras simples de DNA
	Reparo por excisão	Reparo por excisão
	<i>Crosslinks</i>	<i>Crosslinks</i>
		Danos alcalilábeis

O ensaio cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas (que podem ou não serem reparadas) que, após o processamento, podem resultar em mutação (Tice *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2008). A análise dos resultados pode ser realizada utilizando microscópio óptico (células coradas com nitrato de prata) ou em microscópio de fluorescência (células coradas com brometo de etídeo, SYBR® Green, laranja de acridina ou iodeto de propídeo). As células são classificadas pela

visualização da cauda do cometa, ou seja, de acordo com o tamanho da cauda em relação à cabeça (núcleo) em 4 classes de danos: classe 0: sem cauda (sem dano); classe 1: com uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça; classe 2: com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro da cabeça; classe 3: com uma cauda longa, superior a duas vezes o diâmetro da cabeça; classe 4: cauda longa e espalhada em forma de leque (Fig. 6). O teste ainda permite inferir fragmentação apoptótica de DNA, em células cujo nucleóide não mostra-se denso e apresenta-se difuso, ao contrário da célula sem dano, em que o material nuclear está compacto (Tice *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2008; Collins e Azqueta, 2012).

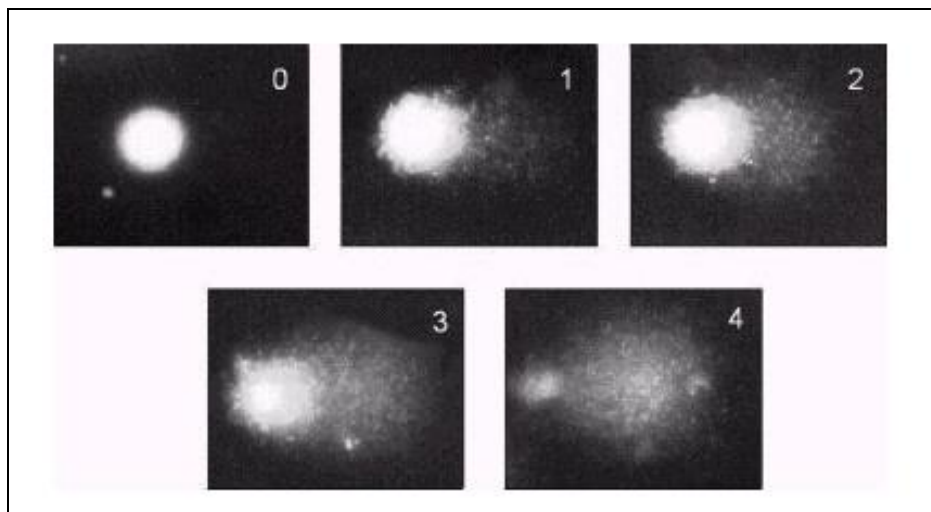


Figura 6: Diferentes classes de danos (0-4) de células obtidas pelo Ensaio de Cometa. Adaptado de Kumaravel e colaboradores (2009).

A avaliação de quebras simples na cadeia de DNA fornece informações limitadas e não são consideradas como lesões mutagênicas, visto que são rapidamente reparadas. Com isso, para tornar a pesquisa mais sensível e específica, foi introduzida uma nova etapa de digestão com enzimas de reparo sítio-específicas, como exemplo citamos a endonuclease III (Endo III) que detecta pirimidinas oxidadas;

formamidopirimidina DNA glicosilase (Fpg) que detecta purinas oxidadas. Quando os nucleóides são incubados com essas enzimas os sítios específicos reconhecidos por esses agentes são incisados gerando uma quebra de cadeia de DNA que pode ser detectada pelo ensaio cometa. Dessa forma, a diferença entre o índice de dano de uma amostra tratada com uma enzima de reparação de DNA para um dano específico e a mesma amostra não tratada (incubada somente com o tampão de reação) fornece a quantificação da lesão em análise (Collins, 2009; Azqueta *et al.*, 2013).

Esse teste pode ser realizado tanto *in vitro* como *in vivo*, em diversos tipos celulares, incluindo fungos, vegetais e células animais; existe um grande interesse no cometa *in vivo* em animais com fins de detecção de lesões ao DNA em diferentes órgãos (Rosa, Hoch, *et al.*, 2007). Dessa maneira, o ensaio cometa também é amplamente empregado em biomonitoramento humano e ambiental utilizando diversos organismos (Guecheva *et al.*, 2001; Villela *et al.*, 2006; Villela *et al.*, 2007; Collins *et al.*, 2008; Ersson *et al.*, 2013). Além disso, programas de computador foram desenvolvidos para aperfeiçoar a análise de resultados e permitir a quantificação exata do conteúdo de DNA na cabeça e cauda, tanto em protocolos empregando corantes fluorescentes como em experimentos utilizando coloração com prata. Atualmente a análise automatizada tem sido utilizada exponencialmente em trabalhos empregando o ensaio cometa, embora a análise visual seja extremamente válida (Collins, 2004).



Objetivos

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente estudo tem como proposta a caracterização da composição química do extrato de sementes de *Entada polystachya* e a investigação dos seus efeitos biológicos com ênfase em lesões ao DNA e suas repercussões na integridade genômica.

Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização química do extrato de sementes de *E. polystachya*;
- Determinar o potencial citotóxico do extrato de *E. polystachya* em células V79;
- Avaliar a ação genotóxica do extrato de sementes de *E. polystachya* e a participação da oxidação de bases nitrogenadas no DNA na formação deste efeito em células de mamífero (V79);
- Verificar o efeito mutagênico do extrato de sementes de *E. polystachya* em células procarióticas de *Salmonella tiphymurium* e em células eucarióticas de mamíferos (V79);
- Estabelecer o potencial oxidante do extrato sementes de *E. polystachya* tendo como parâmetros o nível de peroxidação lipídica e as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase em células V79.



Capítulo I

Chemical characterization, cytotoxic, genotoxic, and mutagenic activities of *Entada polystachya* (L.) aqueous seed extract

Juliane Cristina Bugs de Carvalho¹, Iuri Marques de Oliveira¹, Cristiano Trindade¹, Temenouga Nikolova Guecheva¹, Sidnei Moura², Marilene Henning Vainstein^{3,4} and João Antonio Pêgas Henriques^{1,2,3,4*}

¹ Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

² Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul – UCS Caxias do Sul – RS, Brazil.

³ Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Departamento de Biotecnologia e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author

Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Departamento de Biofísica- Prédio 43422- Laboratório 210

Campus do Vale – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Avenida Bento Gonçalves 9500, Bairro Agronomia–CEP 91501-970

Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 33166069

Fax: +55 5133167003

E-mail: pegas.henriques@gmail.com

Abstract

The seeds of *Entada* species have been long used in traditional medicine for the treatment of liver diseases, sleeping sickness, stomachache, hemorrhoids, malaria and Diabetes mellitus. Studies on the *Entada* genus revealed the presence of saponins, flavonoids, thioamides and phenylacetic acid derivatives. However, the chemical constituents of *Entada polystachya* (L.) DC. are poorly understood and *Entada* species genotoxicity have not been previously investigated. In the present study we determined the chemical composition of aqueous *Entada polystachya* crude seed extract (EPCSE) and evaluated the cytotoxic, genotoxic and mutagenic properties of EPCSE in Chinese hamster fibroblast (V79) cells and in *Salmonella typhimurium*. The analysis by HRMS (High Resolution Mass Spectrometry) in negative mode of EPCSE, showed compounds with intensive peaks $[M-H]^-$ at m/z 183.1030 : 6-hydroxy-2,6-dimethyl-2,7- Octadienoic acid ($C_{10}H_{15}O_3$) and m/z 269.0826: 3-deoxysappanchalcone ($C_{16}H_{31}O_2$), which were proposed to be a saponin and chalcone. EPCSE induced frameshift mutations in *S. typhimurium*. The results of MTT assay suggest that EPCSE is cytotoxic to V79 cells in doses up to 10 $\mu\text{g/mL}$ after 2 h of exposure. At cytotoxic concentrations, this extract increased lipid peroxidation and superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in V79 cells. EPCSE generated DNA strand breaks in V79 cells as revealed by alkaline comet assays. Moreover, an induction of oxidative DNA base damage was indicated by a modified comet assay using formamidopyrimidine DNA glycosylase and endonuclease III. Treatment with EPCSE also induced micronucleus formation in V79 cells. Our results suggest that the toxic and mutagenic properties of compounds present in EPCSE, such as saponin and chalcone, may stem from its ability to disturb the redox balance of the cell, which leads to oxidative stress and the induction of DNA damage.

Keywords: *Entada polystachya*, seed extract, DNA damage, saponin, chalcone.

Introduction

The use of plant extracts and phytochemicals for medical purposes is one of the oldest forms of medical practice in treating diseases of all kinds. In recent times, the focus on plant research has increased all over the world and a large body of evidence has been collected to show the immense potential of medicinal plants used in traditional systems [1,2]. The World Health Organization (WHO) estimates that 80% of the world population uses medicinal plants as the main feature in primary health care [3]. Therefore, various medicinal plants have been studied using modern scientific approaches, and the results have revealed the potential of medicinal plants in the area of pharmacology [4,5]. In this sense, the seeds of plants and other plant parts are interesting source of molecules with pharmacological action. However, the interest in plant studies is not only intended in finding of new substances, but also of already known molecules in a new, more abundant source [6]. These substances should follow scientific validation of pharmacological properties, as well as toxicity and genotoxicity evaluation, before their release for consumption [5].

The *Entada* species, such as *Entada africana*, *Entada abyssinica* and *Entada phaseoloides* are used in traditional medicine for the treatment of liver diseases, sleeping sickness, stomachache and hemorrhoids [7-11]. Previous pharmacological studies on *E. africana* seed have shown antibacterial, antiplasmodial, immunomodulatory and anti-inflammatory activities [12-15]. *E. abyssinica* seed extract showed promising anti-inflammatory and trypanocidal activity [16-18]. The *E. phaseoloides* seed has antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory and antimicrobial potential, and also are used in treatment of Diabetes mellitus [7,19,20]. *Entada* species seed extracts show cytotoxic activity against an array of cancer cells

[21,22]. Phytochemical studies on *Entada* species revealed the presence of saponins, thioamides and phenylacetic acid derivatives [23-27].

Entada polystachya (L.) DC. (Leguminosae) presents as a synonym naming: *Entada polyphylla* Benth; *Entadopsis polyphylla* (Benth) Britton and popular name - the - vine waterfront. It is a native and common plant in coastal thickets from western Mexico through Central America to Colombia and Brazil. The *E. polystachya* is taken to relieve urinary burning, especially in venereal diseases. It is also taken as a diuretic [28,29]. However, chemical composition of *E. polystachya* is poorly understood and the toxic potential of this specie has not been previously investigated.

The aim of the present study was to investigate the cytotoxic effects of aqueous *E. polystachya* crude seed extract (EPCSE), particularly its genotoxicity, mutagenicity and effects on cellular redox status. To this end, we employed two different test systems: the *Salmonella*/microsome assay and a permanent lung fibroblast cell line V79, derived from Chinese hamster (V79 cells). In V79 cells, we measured EPCSE cytotoxicity as well as its effect on superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities and lipid peroxidation. EPCSE-induced DNA damage was estimated by the comet assay and assessment of micronucleus formation in mammalian cells. The mutagenic potential of EPCSE was also evaluated in bacteria. This information is very important for the evaluation of the safety of this extract for possible future pharmacological applications and to explore the mechanisms underlying its antiproliferative effects.

Materials and methods

1. Chemicals

Bacto-agar was obtained from Difco Laboratories (Detroit, MI). Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, L-glutamine, and antibiotics were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Aflatoxin B1, 4-nitroquinoline (4-NQO), phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF), sodium azide, Thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), hydrochloric acid, sulfuric acid, epinephrine bitartrate, cytochalasin-B (Cyt-B), methylmethanesulfonate (MMS), dimethyl sulfoxide (DMSO), hydrogen peroxide (H₂O₂), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), and 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-biphenyl tetrazolium bromide (MTT), were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Low-melting point agarose and agarose were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Giemsa stain was bought from Merck (Darmstadt, Germany). Formamidopyrimidine DNA-glycosylase (Fpg, also known as MutM) and endonuclease III (Endo III, also known as Nth) were obtained from New England BioLabs. The S9 fraction, prepared from the livers of Sprague-Dawley rats pre-treated with the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254, was purchased from Moltex (Annapolis, MD, USA). All others reagents were analytical grade.

2. *E. polystachya* seed sample

E. polystachya seeds were collected in two locations: on the ground and around the tree array. In some cases the harvest of fruits in the pantry with the aid of a trimmer,

was also practiced. The dispersion of the fruit is taken by wind and water (and anemochory and hydrochory). Four botanical herbarium specimens were prepared for collection and identification of the taxon was taken by Marlene Freitas da Silva (INPA). In the Herbarium of INPA received the registration number 156 632. The species is common on the road from Boa Vista to Maraca cities in State of Roraima. Seeds of different matrices with the main record in June 22, 1997 were collected.

3. Preparation of EPCSE.

Powdered seeds from *E. polystachya* were extracted by agitation with MilliQ water (1g/20 ml) for 4h, followed by 3 washings of 1 h. The EPCSE was centrifuged and the supernatant was filtrated with filter paper and pre-filter. After, the extract was lyophilized until completely dryness at -50 °C and 0.040 mbar (Christ Alpha 1-4 LDplus, Germany) and stored at - 20°C.

4. EPCSE chemical characterization mass analysis

The dry extracts were dissolved in a solution of 50% (v/v) chromatographic grade acetonitrile (Tedia, Fairfield, OH, USA), 50% (v/v) deionized water and 0.1% formic acid for the positive mode, changing for 0.1% of ammonia hydroxide for the negative mode. The solutions were infused directly, individually or with HPLC (Shymadzu) assistance, into the ESI source by means of a syringe pump (Harvard Apparatus) at a flow rate of 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. ESI(+)-MS, tandem ESI(+)-MS/MS and ESI(-)-MS were acquired using a hybrid high-resolution and high accuracy (5 $\mu\text{L/L}$) microTof (Q-TOF) mass spectrometer (Bruker® Scientific) under the following

conditions: capillary and cone voltages were set to + 3500 V and +40 V, respectively, with a de-solvation temperature of 180°C. For ESI(+)-MS/MS, the energy for the collision induced dissociations (CID) was optimized for each component. Diagnostic ions in different fractions were identified by the comparison of their exact mass (ESI(-) or ESI(+)), isotopic ratio and ESI(+)-MS/MS, dissociation patterns with compounds identified in previous studies. For data acquisition and processing, TOFcontrol software (Bruker® Scientific) was used. The data were collected in the m/z range of 70–1000 at the speed of two scans per second, providing the resolution of 50,000 (FWHM) at m/z 200. No important ions were observed below m/z 100 or above m/z 750.

5. Assays in bacteria

5.1. Strains and culture conditions for bacterial assays

Salmonella typhimurium strains TA98 and TA100 were purchased from Moltax (Annapolis, MD, USA). Bacterial media were prepared according to Mortelmans and Zeiger [30]. Complete medium for growing strains (NB) contained 2.5% oxoid nutrient broth #2. Solidified medium with 1.5% bacto-agar supplemented with 1× Vogel-Bonner salts and 2% glucose was used for plates.

5.2. *Salmonella*/microsome mutagenicity assay

Mutagenicity was assayed by the preincubation procedure. The S9 metabolic activation mixture (S9 mix) was prepared according to Maron and Ames [31]. Briefly, 100 μ L of test bacterial cultures ($1-2 \times 10^9$ cells/mL) were incubated at 37°C with

different amounts of EPCSE (500-2500 µg/plate) in the presence or absence of S9 mix for 20-30 min, without shaking. These doses were defined in previous range finder experiment in accordance with the *Salmonella/microsome* assay guidelines. Subsequently, 2 mL of soft agar (0.6% agar, 0.5% NaCl, 50 µM histidine, 50 µM biotin, pH 7.4, 42°C) were added to the test tube and poured immediately onto a plate of minimal agar (1.5% agar, Vogel-Bonner E medium, containing 2% glucose). As positive control, 2-aminofluorene (2-AF, 10 µg/plate) was used for all strains in the presence of metabolic activation (with S9 mix). In the absence of metabolic activation, 4-nitroquinoline-oxide (4-NQO, 0.5µg/plate) was used for TA98 and sodium azide (1µg/plate) for TA100 strain. Plates were incubated in the dark at 37°C for 48-72 h before counting the revertant colonies.

6. Assays in V79 cells

6.1. V79 cells culture and treatments

V79 cells were cultured under standard conditions in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated-FBS, 0.2 mg/mL L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Cells were kept in tissue-culture flasks at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air, and were harvested by treatment with 0.15% trypsin-0.08% EDTA in phosphate-buffered saline solution (PBS). Cells were seeded (3×10^6 cells) in 5 mL complete medium in a 25-cm² flask, and grown for 2 days up to 60-70% confluence before the treatment with the test substance. EPCSE was diluted in distilled water, and added to FBS-free medium to achieve the different designed concentrations (1µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL, 30µg/mL, 40µg/mL e 50µg/mL).

6.2. MTT reduction assay (MTT)

MTT reduction was performed according to Denizot and Lang [32]. Briefly, 48 h after treatment, cells were washed once with PBS before adding 0.1 mL serum-free medium containing yellow tetrazolium salt MTT dye 1 mg/mL to each sample. After incubation for 3 h, the supernatant was removed, and the obtained purple formazan product was dissolved in 1 mL ethanol, stirred for 15 min, and the absorbance was read at 570 nm. Results are expressed as mean percentage of absorbance at 570 nm in treated cells as compared to controls.

6.3. Colony-forming ability (clonogenic survival)

The clonogenic assay is based on the ability of cell to form colonies after the extract treatment [33]. After trypsinization, 200 V79 cells were added to each 06-well microtiter plate and incubated overnight at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. The supernatant was discarded and the cells were exposed to different concentrations of the aqueous extracts for 3 h. Afterwards, the medium was replaced with a fresh one. Colonies were allowed to grow for 1 week at 37 °C, 5% CO₂. The medium was then removed, the colonies were fixed in methanol and stained with 0.1% crystal violet and then counted.

6.4. Comet assay

The alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. [34] with minor modifications. V79 cells were incubated with various concentrations of EPCSE extract for 3 h in FBS-free medium. After treatment, cells were washed with ice-cold PBS, trypsinized, and resuspended in complete medium. Then, 20 μL of cell suspension (3×10^6 cells/mL) was dissolved in 0.75% low-melting point agarose and immediately spread onto a glass microscope slide pre-coated with a layer of 1% normal melting point agarose. The agarose was allowed to set at 4°C for 5 min. The slides were then incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, and 10% DMSO, pH 10.0) at 4°C for at least 1 h in order to remove cellular proteins and membranes, leaving the DNA as “nucleoids” [34]. In the modified comet assay, slides were removed from the lysis solution, washed three times in enzyme buffer (40 mM HEPES, 100 mM KCl, 0.5 mM Na₂EDTA, 0.2 mg/mL BSA, pH 8.0), and incubated with 70 μL Fpg (100 mU per gel; 45 min 37°C) or EndoIII (100 mU per gel; 30 min 37°C). After this procedure, the slides were placed on a horizontal electrophoresis unit. The unit was filled with fresh buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13.0), which covered the slides for 20 min at 4°C in order to allow unwinding of DNA and expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V (74 V/cm). All the steps listed above were performed under yellow light or in the dark in order to prevent additional DNA damage. Slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), washed in bi-distilled water, and stained using a silver staining protocol. After the staining step, gels were left to dry at room temperature overnight and analyzed. One hundred cells (50 cells from each of two replicate slides) per concentration of each test substance were selected and analyzed visually using an optical microscope for tail length and amount of DNA present in the tail. When selecting cells, the areas around air bubbles or at the edges were avoided [35]. These

cells were visually scored according to tail length into five classes: class 0: undamaged, without a tail; class 1: with a tail shorter than the diameter of the head (nucleus); class 2: with a tail length one to two times the diameter of the head; class 3: with a tail longer than twice the diameter of the head; and class 4: comets with no heads.

The genotoxic effect of EPCSE in V79 cells was estimated by damage index (DI). The damage index ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells \times 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells \times 4) [35]. The vehicle was used as a negative control, MMS treatment at 4×10^{-5} M for 1 h was used as a positive control. In the modified comet assay, the vehicle was used as a negative control, and treatment with 150 μ M H₂O₂ for 5 min at 4 °C was used as a positive control.

International guidelines and recommendations for alkaline comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method, and that it can be used with high reliability [35]. This was also shown by Garcia et al. [36], who compared the comet assay carried out in different laboratories with silver staining and visual scoring, and showed high correlation between the results.

6.5. Micronucleus test

The micronucleus assay was performed according to Fenech [37], with minor modifications. V79 cells were incubated with various EPCSE concentrations for 2 h in FBS-free medium. After treatment, cultures were washed twice with medium, and Cyt-B was added at final concentration of 2 μ g/mL. Cultures were harvested 21 h after Cyt-B addition. Cells were separated from the flask by trypsinization, and the cell suspension was centrifuged at $1000 \times g$ for 5 min. Cells were then resuspended in 0.075

M KCl solution and maintained at 4°C for 3 min (mild hypotonic treatment). Subsequently, cells were centrifuged, and methanol/acetic acid (3:1) solution was carefully added. This fixation step was repeated twice, and finally, cells were resuspended in a small volume of methanol/acetic acid and dropped onto clean slides. Slides were stained with 10% Giemsa (pH 6.8) for 3 - 4 min. Slides were mounted and coded prior to analysis. MMS, at 4×10^{-5} M concentration, was used as a positive control, and the vehicle was used as a negative control. Micronuclei were counted in 2000 binucleated cells (BNCs) with well-preserved cytoplasm. The identification of micronuclei was carried out according to Fenech [37].

6.6. Preparation of V79 cell-free extracts

Briefly, 3×10^6 cells were incubated with various concentrations of EPCSE for 2 h in FBS-free medium, and after the extracts were prepared by glass bead lysis as follows: cells were suspended in lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 7.2) with an equal volume of acid-washed 425–600 μm glass beads and PMSF, vortexed for 10–15 cycles (30 s each), followed by 30 s of cooling. The mixture was then microcentrifuged for 5 min at $6000 \times g$ to remove the cellular debris and the glass beads. The supernatant was kept on ice for immediate use. Protein concentration was determined by the Bradford assay [38].

6.8. Measurement of lipid peroxidation

The extent of EPCSE-induced lipid peroxidation was determined by the reaction of TBA with malondialdehyde (MDA), a product formed by lipid peroxidation. The

assays were performed according to Degrandi et al. (2010). To the lysate, 2 mL of 0.4 mg/mL TCA in 0.25 M HCl was added. The mixture was incubated with 6.7 mg/mL TBA for 15 min at 100°C and centrifuged at $750 \times g$ for 10 min. As TBA reacts with other products of lipid peroxidation in addition to MDA, results are expressed in terms of thiobarbituric reactive species (TBARS), which were determined by measuring the absorbance at 532 nm. Hydrolyzed TMP was used as the standard. The results were normalized to protein content [38].

6.9. Antioxidant enzyme activity estimations

Total superoxide dismutase (SOD) activity was assessed by measuring the inhibition of self-catalytic adrenochrome formation rate at 480 nm, in a reaction medium containing 60 mmol/L of adrenaline (pH 2.0), and 50 mmol/L of glycine (pH 10.2). This reaction was performed at 30 °C for 3 min [39]. The results obtained for SOD were expressed in U SOD/mg protein. Catalase (CAT) activity was assayed by the decreasing rate of H₂O₂ at 240 nm [40]. The CAT activity results were expressed in U CAT/mg protein.

7. Statistical analysis

The results of *Salmonella*/microsome mutagenicity assay were analysed by the *Salmonella* Statistic Assay (Environmental Monitoring System Laboratory, EPA - Software Version 2.3, April 1988). A test substance was considered mutagenic when significant dose-response and ANOVA variance were observed, and the increase in the

mean number of revertants on test plates was at least twice higher than that observed in the negative control plates.

All experiments with V79 cells were independently repeated at least three times, with triplicate samples for each treatment. Results are expressed as means \pm standard deviation (SD) and were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test ($p < 0.05$ was considered statistically significant).

Results

Chemical composition

The measurements were done in high-resolution direct-infusion mass spectrometry (HR-DIMS) in Q-TOF II (Bruker® Scientific). For response in positive mode, 0.1% of formic acid was introduced into the sample solution, which was done with acetonitrile/water (1:1). However, for response in negative mode, the formic acid was changed by ammonia hydroxide in the same proportion.

The full mass spectrum in positive mode (A) and in negative mode (B) is shown in Table 1, where the representative compounds show peaks with m/z between 100-380 and 80-490 respectively. According to this information, for some compounds the elemental composition was defined. In specific cases, the molecules have been defined by direct comparison with the previous results showed in the literature. The results are presented in Table 1. Since the widely accepted accuracy threshold for confirmation of elemental compositions was established as 5 ppm [41], this analysis usually provides highly reliable identification of the target compounds. The number of identified compounds in negative mode was higher because of the presence of several molecules

with carboxylic acid, in agreement with the expected for water extraction. The presence of glucose and derivatives, that may be associated with small molecules is also expected. Indicative peaks with m/z between 600-800 are detected as well (data not shown).

Evaluation of mutagenesis in bacteria

The EPCSE dose range was determined in range finder experiment in TA100 strain, with and without metabolization (data not shown). Cytotoxicity was not observed at the higher concentration tested, as determined on basis of the solubility limit (250 mg/mL in DMSO). In the mutagenicity assay, the dose range between 500-2500 $\mu\text{g}/\text{plate}$ was used.

A mutagenic effect of the extract on TA98 strain (detects frameshifts in the DNA target -C-G-C-G-C-G-C-G) was observed (Table 3). The mutagenic effect was more pronounced in the absence of metabolic activation, indicating that some components of the extract can interact with DNA. No mutagenicity was seen in the strain TA100 detecting base pair substitutions of a leucine [GAG] by proline [GGG] in the absence or presence of metabolic activation [30].

Cytotoxic effects in V79 cells

To investigate whether EPCSE modulate cell viability, we used the MTT assay that measures the mitochondrial activity and indirectly the cell viability, in culture medium without serum. The V79 cultured cells were incubated with various concentrations of extract for 2 h. Analysis of MTT assay showed that EPCSE

significantly decreased the cell viability starting at 10 µg/mL (Figure 1A). In agreement, significant EPCSE cytotoxic effects were observed in clonogenic survival assay at the same concentration range for 2 h treatment (Figure 1B). The clonogenic survival assay is a method that consists of a direct investigation of survival by colony formation capacity after 168 h of the exposition. Therefore, our results confirm the *in vitro* cytotoxic effects of EPCSE, indicating inhibition of cell proliferation at concentration range of 10-50 µg/mL in V79 cells.

DNA damage in V79 cells

Comet assay

Considering the cytotoxic effects of EPCSE in V79 cells, we investigated if this extract could induce DNA damage under the same experimental conditions. The Figure 2 showed the effects of EPCSE on DNA damage in V79 cells in the comet assay. EPCSE clearly induced a dose-response increase in the means of DI in relation to the control group in the alkaline comet assay at concentrations range of 10-50 µg/mL. The comet assay under alkaline conditions simultaneously detects DNA single and double strand breaks (SSBs and DSBs, respectively) and alkali-labile sites [34,42]. In this sense, we can infer therefore that EPCSE induces SSBs and/or DSBs (Figure 2). The extent of DNA damage in cells exposed to this extract was concentration dependent.

In order to determine the nature of the EPCSE-induced DNA damage in V79 cells, we carried out the modified comet assay. While the alkaline version of the comet assay detects SSBs and DSBs, crosslinks and alkali-labile sites, the modified comet assay is more specific than the standard method. In this version, there is an incubation

step of lysed cells with lesion-specific enzymes, that recognize and remove certain damaged bases, and the resultant abasic sites are converted in single-strand breaks [43-45]. The enzyme Fpg is specific for oxidized purines, including 8-oxo-7,8-dihydroguanine, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine, and 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, as well as other ring-opened purines whereas Endo III recognizes oxidized pyrimidines, including thymine glycol and uracyl glycol [43]. In this manner, DI increases in a dose-related manner after incubation with the lesion-specific enzymes and this increment represents the extension of oxidative DNA damage. The levels of Endo III- and Fpg-sensitive sites were calculated from the score obtained with the enzyme incubation minus the score without enzyme (incubation with the enzyme buffer only) and denominated "oxidative damage score". It can be seen on Figure 3A and 3B that the H₂O₂ treatment increases the extent of oxidative DNA damage recognized by Endo III and Fpg in V79 cells, indicating the presence of oxidized pyrimidines and oxidized purines, respectively, validating the experiment. The oxidative damage score in V79 cells treated with EPCSE (Figures 3A and 3B) indicated the occurrence of oxidative DNA damage.

Micronucleus assay

The treatment with EPCSE decreased the percentage of BNCs in a dose-response manner, reinforcing the cytotoxic effect of this molecule on cell proliferation (Table 3). Furthermore, the exposure at concentration range of 30 to 50 µg/mL significantly increased incidence of micronuclei (Figure 4).

Oxidative stress biomarkers in V79 cells

Considering the oxidative DNA damage induced by EPCSE in V79 cells, we examined three well-established oxidative stress biomarkers: the increase of lipid peroxidation measured by TBARS levels and enzyme activity of SOD and CAT. As can be seen in Figure 5, the treatment of cells with EPCSE resulted in a dose-dependent increase in TBARS production in V79 cells. This increase was statistically significant after incubation at concentrations above 10 µg/mL EPCSE for 2 h treatment. Table 4 shows that EPCSE increased SOD and CAT activities at concentration range of 10-50 µg/mL. These results indicate oxidative stress induction by EPCSE treatment in V79 cells.

Discussion

In this study, we determined the major compounds presented in the aqueous extracts from seed of *E. polystachya* and evaluated the mutagenic properties of EPCSE in bacteria and cultured mammalian cells. We found similarity between the compounds belonging to the same genus, and seek comparisons to identify the compounds present in EPCSE. Thus, considering the complex constituents of the EPCSE, we used ESI-MS (+) and ESI-MS (-) techniques, which are important tools to characterize and identify metabolites. These techniques have been used for the rapid analysis of natural products, such as flavonoids [46] and terpenoids [47]. The full mass spectrum shows the identified ions of EPCSE by ESI-MS (+) and ESI-MS (-).

In EI-MS analysis was identified some aminoacids and glucose (Table 1). The presence of these compounds in EPCSE is expected since the seed contains extra quantities of stored materials as food reserve to sustain germination, such as

carbohydrates and proteins [28]. The compound (9): 6-hydroxy-2,6-dimethyl-(2E)-2,7-octadienoyl (Table 1) is part of a saponin molecule. Confirming our data, this same triterpenoid saponin was identified in *E. polystachya* by Da Silva and Parente (2010). The presence of saponins was identified also in *E. africana*, *E. phaseoloides*, *E. pursaetha* and *E. rheedei* [24,48-50]. Saponins are a vast group of glycosides widely distributed in higher plants. Many of them have pharmacological properties and are used in phytotherapy and in the cosmetic industry [51,52].

The compound 3-deoxysappanchalcone (14) also was identified in EPCSE by ESI-MS (-) technique (Table 1), and was characterized as a chalcone [7,20]. Chalcones are bioprecursors of flavonoids that bear the structure of 1,3-diaryl-2-propen-1-one. This class of flavonoids is pharmacologically relevant because of the ability to exert anticarcinogenic, antimicrobial, and anti-inflammatory activities [53-55].

Besides phytochemical characterization, this is the first report on the biological effects of *E. polystachya* seed extract. Our results in mammalian cell culture indicate that EPCSE exhibits dose-dependent cytotoxic effects in V79 cells (Figure 1). Moreover, cell proliferation data, based on the percentage of BNCs in the micronucleus assay, also show the cytotoxic effect of the extract (Table 3). In agreement, Da Silva and Parente [29] showed hemolytic activity of saponin of *E. polystachya*. Mo et al. [21] reported induction of cell death in human esophageal cancer cells (Ec-109) by Phaseoloideside E, an oleanane-type triterpene saponin isolated from the seed kernels of *E. phaseoloides*. Iwamoto et al. [24] showed antiproliferative activities of two triterpene saponins (Etanosides A-D) of *E. phaseoloides* against A549 lung cancer cells by the MTT method. Nzowa et al. [56] isolated two N-acetylglucosamine-containing saponins (Rheediinosides) from the seed kernels of *E. rheedii* and showed moderate cytotoxic potential against human glioblastoma (T98G), human squamous carcinoma (A431),

human prostatic adenocarcinoma (PC3), and mouse melanoma (B16-F1) cell lines. The compound (14) could also be contributing to extract toxicity since biological effects of chalcones are linked to their potential cytotoxic effect [57,58]. In this sense, chalcones were reported to present high cytotoxic activity against variety of cancer cell lines, such as T98G, A549, PC3, breast cancer cells (MDA-MB231), leukemia cells (HL-60) and colon adenocarcinoma cells (HT-29) by blocking the cell cycle or inducing apoptosis [59-61]. Indeed, numerous reports highlight the cytotoxic properties of many saponins and chalcones in different cell types and animal systems [51,58,62].

The chalcones and saponins can promote prooxidant effects, and as consequence cytotoxicity [57,63,64]. Sabzevari et al. [63] showed that hydroxychalcones depleted hepatocyte glutathione (GSH) and oxidized GSH to GSSG, or increase the reactive oxygen species (ROS) accumulation by conjugation with GSH. In relation to saponins, Phaseoloideside E of *E. phaseoloides* induced ROS accumulation in Ec-109 cells contributing to cytotoxic effect of this molecule [21]. Nandi et al. (2004) observed that two triterpene saponins (Acaciaside A and B) of *Acacia auriculiformis* induced membrane damage through peroxidation in rat liver microsomal membrane. ROS can induce DNA and protein damage and to enhance lipid peroxidation [65,66]. Thus, in order to investigate the EPCSE ability to disturb redox homeostasis, we measured the extent of lipid peroxidation in EPCSE-treated mammalian cells. The occurrence of an increase in TBARS levels, shown in Figure 5, suggests that ROS play an important role in EPCSE cytotoxicity in V79 cells. Under oxidative stress, cells usually enter into an antioxidant adaptive process, elevating the enzymatic antioxidant defense such a catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity. SOD is an important enzyme that catalyzes the dismutation of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) to oxygen and H_2O_2 , while CAT converts H_2O_2 to H_2O and molecular oxygen. In fact, we found that EPCSE

significantly increase SOD and CAT activities in V79 cells (Table 4). In agreement, the presence of SOD and CAT blocked the effect of Acaciaside A and B-induced membrane damage suggesting that these saponins can generate superoxide anions and initiate lipid peroxidation [64]. Similarly, Champelovier et al. [57] showed increase of superoxide accumulation and lipid peroxidation in gliomas induced by chalcones.

In order to increase our knowledge of the toxicity of EPCSE, an investigation of its genotoxic profile was performed. The observed induction of frameshift mutations in the *Salmonella*/microsome assay in strain TA98 (Table 2) cannot be related to direct oxidative damage as EPCSE induced only slight elevation in the number of His⁺ revertants in the strain TA100 (detecting base pair substitution). Alternatively, the frameshift mutation can be a result of intercalating ability of some compound present in EPCSE. Stefanisinova et al. [67] showed that a series of chalcone derivatives can intercalate into base pairs of DNA. In this rationale, chalcones exhibit planar arrangement due to the aromatic rings present in the structure, which provides the molecule chemical stability and favors biological activity [57]. Chemical compounds with planar topologies and electrophilicity are often capable of intercalation between DNA bases [68]. Intercalating agent-induced genotoxicity manifests itself primarily as frameshift mutagenicity in microbial systems [69]. In fact, many flavonoids have been reported to be mutagenic in diverse strains of *S. typhimurium* in the Ames test. However, the results of Ames test suggest that the lesion induced by compounds of EPCSE could be rather specific and not detectable in the test system used or that only limited direct oxidative damage was induced by compounds at the experimental conditions of our study. In this sense, many saponins with cytotoxic activity evaluated in Ames test did not induce mutations in histidine auxotrophs *S. typhimurium* both in the presence and absence of metabolic activation system [70-72].

The DNA damage in V79 cells after EPCSE exposure detected by alkaline comet assay (Figure 2) may be result of free radicals attack on DNA. This could be attributed to the ability of compounds in the extract, such as compounds (9) and (14), to impose oxidative stress, since ROS may cause base damage, single strand breaks (SSBs), double strand breaks (DSBs) and mutations [65]. In fact, the results of the modified comet assay employing Endo III and FPG reinforce the oxidative nature of the DNA damage in EPCSE-exposed cells (Figure 3). In this sense, the genotoxic effect of six saponins extracted from *Nauclea* bark was shown in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. Moreover, micronuclei induction could be attributed to the capacity of *Nauclea* saponins to reduce cell defense against oxidative stress through the inhibition of glutathione-S-transferase activity [73]. Flavonoids also can cause DNA breakage by ROS generation [62]. It can be speculated that several of DNA-damages observed in comet assay have evolved into DSBs. If not repaired, the DSBs lead to chromosomal breakage and rearrangements, which in mammalian cells lead to chromosomal aberrations and micronucleus formation (as observed in our experiment; Figure 4), and that can trigger cell death [37,74]. In addition, the possible DSBs formation after EPCSE treatment could indicate the ability of some compound in the extract, such as compound (14), to intercalate into DNA and/or affect topoisomerase activity. In agreement with this hypothesis, flavonoids and other polyphenolic compounds, including chalcone, have been shown to inhibit human topoisomerases I and II enzymes both through the inhibition of relaxation activity and through the stabilization of the cleavable complex [67,75]. In contrast, a direct interaction of saponins between DNA base-pairs appears improbable, due to the large molecule size of saponins [73].

In summary, the cellular effects of EPCSE appear to be very complex and linked to its ability to disturb cellular redox homeostasis, which leads to oxidative DNA

damage, SSBs, DSBs formation and cell death. In addition, the EPCSE induced frameshift mutation in *S. typhimurium*, as well as micronucleus formation in V79 cells. The EPCSE toxic effects may be modulated by a great variety of compounds present and their interactions. Moreover, the compounds (9) and (14), a chalcone and saponin respectively, identified by ESI-MS, can contribute to DNA damage and cytotoxicity induced by EPCSE. However, the isolation of additional components and further characterization of the chemical structures of compounds present in the EPCSE are necessary for better understanding of the biological effects observed in our study.

Funding

This work was supported by grants from the Brazilian Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Pronex – Fapergs/CNPq n° 10/0044-3 and PqG n°06/2010), Coordenação de Aperfeiçoamento e Formação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - EDITAL TOXINOLOGIA - CAPES n° 063/2010 and GENOTOX-Genotoxicity Laboratory – Royal Institute.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- [1] Cragg, G.M., and Newman, D.J. (2013) Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et biophysica acta*, 1830, 3670-3695.
- [2] Ngo, L.T., Okogun, J.I., and Folk, W.R. (2013) 21st century natural product research and drug development and traditional medicines. *Natural product reports*, 30, 584-592.
- [3] Wangchuk, P., Keller, P.A., Pyne, S.G., Taweechotipatr, M., Tonsomboon, A., Rattanajak, R., and Kamchonwongpaisan, S. (2011) Evaluation of an ethnopharmacologically selected Bhutanese medicinal plants for their major classes of phytochemicals and biological activities. *Journal of ethnopharmacology*, 137, 730-742.
- [4] Tapsell, L.C., Hemphill, I., Cobiac, L., Patch, C.S., Sullivan, D.R., Fenech, M., Roodenrys, S., Keogh, J.B., Clifton, P.M., Williams, P.G., Fazio, V.A., and Inge, K.E. (2006) Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *The Medical journal of Australia*, 185, S4-24.
- [5] Bauer, A., and Bronstrup, M. (2014) Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. *Natural product reports*, 31, 35-60.
- [6] Mondal, S., Bandyopadhyay, S., Ghosh, M.K., Mukhopadhyay, S., Roy, S., and Mandal, C. (2012) Natural products: promising resources for cancer drug discovery. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 12, 49-75.
- [7] Dong, Y., Shi, H., Yang, H., Peng, Y., Wang, M., and Li, X. (2012) Antioxidant phenolic compounds from the stems of *Entada phaseoloides*. *Chemistry & biodiversity*, 9, 68-79.
- [8] Teke, G.N., Lunga, P.K., Wabo, H.K., Kuate, J.R., Vilarem, G., Giacinti, G., Kikuchi, H., and Oshima, Y. (2011) Antimicrobial and antioxidant properties of methanol extract, fractions and compounds from the stem bark of *Entada abyssinica* Stend ex A. Satabie. *BMC complementary and alternative medicine*, 11, 57.
- [9] Obidike, I.C., and Emeje, M.O. (2011) Microencapsulation enhances the anti-ulcerogenic properties of *Entada africana* leaf extract. *Journal of ethnopharmacology*, 137, 553-561.
- [10] Sugimoto, S., Matsunami, K., and Otsuka, H. (2012) Medicinal plants of Thailand. II: chemical studies on the seed kernels of *Entada rheedei* Sprengel. *Journal of natural medicines*, 66, 552-557.
- [11] Siddhuraju, P., Becker, K., and Makkar, H. (2002) Chemical composition, protein fractionation, essential amino acid potential and antimetabolic constituents of an unconventional legume, gila bean (*Entada phaseoloides* Merrill) seed kernel. *J Sci Food Agric*, 82, 10.
- [12] Owona, B.A., Njayou, N.F., Laufer, S.A., Schluesener, H.J., and Moundipa, P.F. (2013) *Entada africana* fraction CH(2)Cl(2)/MEOH 5% inhibits inducible nitric oxide synthase and pro-inflammatory cytokines gene expression induced by lipopolysaccharide in microglia. *BMC complementary and alternative medicine*, 13, 254.
- [13] Ezenyi, I.C., Ranarivelo, L., Oluwakanyinsola, S.A., and Emeje, M. (2013) Analgesic, anti-inflammatory, and heme biomineralization inhibitory properties of *Entada africana* ethanol leaf extract with antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum*. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 1-7.

- [14] Ayissi Owona, B., Njyou, N.F., Laufer, S., Moundipa, P.F., and Schluesener, H.J. (2013) A fraction of stem bark extract of *Entada africana* suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 cells. *Journal of ethnopharmacology*, 149, 162-168.
- [15] Diallo, D., Paulsen, B.S., Liljeback, T.H., and Michaelsen, T.E. (2001) Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. *Journal of ethnopharmacology*, 74, 159-171.
- [16] Nyasse, B., Ngantchou, I., Tchana, E.M., Sonke, B., Denier, C., and Fontaine, C. (2004) Inhibition of both *Trypanosoma brucei* bloodstream form and related glycolytic enzymes by a new kolavincic acid derivative isolated from *Entada abyssinica*. *Die Pharmazie*, 59, 873-875.
- [17] Freiburghaus, F., Steck, A., Pfander, H., and Brun, R. (1998) Bioassay-guided isolation of a diastereoisomer of kolavenol from *Entada abyssinica* active on *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Journal of ethnopharmacology*, 61, 179-183.
- [18] Olajide, O.A., and Alada, A.R. (2001) Studies on the anti-inflammatory properties of *Entada abyssinica*. *Fitoterapia*, 72, 492-496.
- [19] Zheng, T., Shu, G., Yang, Z., Mo, S., Zhao, Y., and Mei, Z. (2012) Antidiabetic effect of total saponins from *Entada phaseoloides* (L.) Merr. in type 2 diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 139, 814-821.
- [20] Li, K., Xing, S., Wang, M., Peng, Y., Dong, Y., and Li, X. (2012) Anticomplement and antimicrobial activities of flavonoids from *Entada phaseoloides*. *Natural product communications*, 7, 867-871.
- [21] Mo, S., Xiong, H., Shu, G., Yang, X., Wang, J., Zheng, C., Xiong, W., and Mei, Z. (2013) Phaseoloideside E, a novel natural triterpenoid saponin identified from *Entada phaseoloides*, induces apoptosis in Ec-109 esophageal cancer cells through reactive oxygen species generation. *Journal of pharmacological sciences*, 122, 163-175.
- [22] Nzowa, L.K., Teponno, R.B., Tapondjou, L.A., Verotta, L., Liao, Z., Graham, D., Zink, M.C., and Barboni, L. (2013) Two new tryptophan derivatives from the seed kernels of *Entada rheedei*: effects on cell viability and HIV infectivity. *Fitoterapia*, 87, 37-42.
- [23] Zhao, Z.X., Jin, J., Lin, C.Z., Zhu, C.C., Liu, Y.M., Lin, A.H., Liu, Y.X., Zhang, L., and Luo, H.F. (2011) Two new chalcone glycosides from the stems of *Entada phaseoloides*. *Fitoterapia*, 82, 1102-1105.
- [24] Iwamoto, Y., Sugimoto, S., Harinantenaina, L., Matsunami, K., and Otsuka, H. (2012) Entadosides A-D, triterpene saponins and a glucoside of the sulphur-containing amide from the kernel nuts of *Entada phaseoloides* (L.) Merrill. *Journal of natural medicines*, 66, 321-328.
- [25] Xiong, H., Xiao, E., Zhao, Y.H., Yang, G.Z., and Mei, Z.N. (2010) Sulfur-containing amides from *Entada phaseoloides*. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica*, 45, 624-626.
- [26] Okada, Y., Shibata, S., Ikekawa, T., Javellana, A., and Kamo, O. (1987) *Entada* saponin III, a saponin isolated from the bark of *Entada phaseoloides*. *Phytochemistry*, 26, 7.
- [27] Liu, W., Kugelman, M., Wilson, R., and Rao, K. (1972) Crystalline saponin with antitumor activity from *Entada phaseoloides*. *Phytochemistry*, 11, 4.
- [28] Lopes, I.L., Jardim, M.A., and Medeiros, T.D. (2007) Germinação de sementes e desenvolvimento morfológico de plantas oleaginosas: 2. *Entada polystachya* (L.) DC. (Mimosaceae). *Rev. Bras. Farm.*, 88, 3.

- [29] Da Silva, B.P., and Parente, J.P. (2010) Polystachyasaponin with Adjuvant Activity from *Entada polystachya*. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-A Journal Of Chemical Sciences*, 65, 7.
- [30] Mortelmans, K., and Zeiger, E. (2000) The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation research*, 455, 29-60.
- [31] Maron, D.M., and Ames, B.N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation research*, 113, 173-215.
- [32] Denizot, F., and Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*, 89, 271-277.
- [33] Mirabelli, C.K., Sung, C.M., McCabe, F.L., Faucette, L.F., Crooke, S.T., and Johnson, R.K. (1988) A murine model to evaluate the ability of in vitro clonogenic assays to predict the response to tumors in vivo. *Cancer research*, 48, 5447-5454.
- [34] Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175, 184-191.
- [35] Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., and Sasaki, Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 35, 206-221.
- [36] Garcia, O., Mandina, T., Lamadrid, A.I., Diaz, A., Remigio, A., Gonzalez, Y., Piloto, J., Gonzalez, J.E., and Alvarez, A. (2004) Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutation research*, 556, 25-34.
- [37] Fenech, M. (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutation research*, 455, 81-95.
- [38] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
- [39] Bannister, J.V., and Calabrese, L. (1987) Assays for superoxide dismutase. *Methods of biochemical analysis*, 32, 279-312.
- [40] Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- [41] Lacorte, S., and Fernandez-Alba, A.R. (2006) Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass spectrometry reviews*, 25, 866-880.
- [42] Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., and Stetina, R. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23, 143-151.
- [43] Dizdaroglu, M. (2005) Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutation research*, 591, 45-59.
- [44] Viau, C.M., Guecheva, T.N., Sousa, F.G., Pungartnik, C., Brendel, M., Saffi, J., and Henriques, J.A. (2009) SnCl₂-induced DNA damage and repair inhibition of MMS-caused lesions in V79 Chinese hamster fibroblasts. *Archives of toxicology*, 83, 769-775.
- [45] Degrandi, T.H., de Oliveira, I.M., d'Almeida, G.S., Garcia, C.R., Villela, I.V., Guecheva, T.N., Rosa, R.M., and Henriques, J.A. (2010) Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. *Mutagenesis*, 25, 257-269.

- [46] Vessecchi, R., Zocolo, G.J., Gouvea, D.R., Hubner, F., Cramer, B., de Marchi, M.R., Humpf, H.U., and Lopes, N.P. (2011) Re-examination of the anion derivatives of isoflavones by radical fragmentation in negative electrospray ionization tandem mass spectrometry: experimental and computational studies. *Rapid communications in mass spectrometry* : RCM, 25, 2020-2026.
- [47] Yang, M., Wang, X., Guan, S., Xia, J., Sun, J., Guo, H., and Guo, D.A. (2007) Analysis of triterpenoids in ganoderma lucidum using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 18, 927-939.
- [48] Cioffi, G., Dal Piaz, F., De Caprariis, P., Sanogo, R., Marzocco, S., Autore, G., and De Tommasi, N. (2006) Antiproliferative triterpene saponins from *Entada africana*. *Journal of natural products*, 69, 1323-1329.
- [49] Sugimoto, S., Matsunami, K., and Otsuka, H. (2011) Medicinal plants of Thailand. I structures of rheedeiosides A-D and cis-entadamide A beta-D-glucopyranoside from the seed kernels of *Entada rheedii*. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 59, 466-471.
- [50] Taponjdjou, A.L., Miyamoto, T., Mirjolet, J.F., Guilbaud, N., and Lacaille-Dubois, M.A. (2005) Pursaethosides A-E, triterpene saponins from *Entada pursaetha*. *Journal of natural products*, 68, 1185-1190.
- [51] Sparg, S.G., Light, M.E., and van Staden, J. (2004) Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of ethnopharmacology*, 94, 219-243.
- [52] Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P., and Becker, K. (2002) The biological action of saponins in animal systems: a review. *The British journal of nutrition*, 88, 587-605.
- [53] Batovska, D.I., and Todorova, I.T. (2010) Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Current clinical pharmacology*, 5, 1-29.
- [54] Sahu, N.K., Balbhadra, S.S., Choudhary, J., and Kohli, D.V. (2012) Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. *Current medicinal chemistry*, 19, 209-225.
- [55] Nowakowska, Z. (2007) A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European journal of medicinal chemistry*, 42, 125-137.
- [56] Nzowa, L.K., Barboni, L., Teponno, R.B., Ricciutelli, M., Lupidi, G., Quassinti, L., Bramucci, M., and Taponjdjou, L.A. (2010) Rheediinosides A and B, two antiproliferative and antioxidant triterpene saponins from *Entada rheedii*. *Phytochemistry*, 71, 254-261.
- [57] Champelovier, P., Chauchet, X., Hazane-Puch, F., Vergnaud, S., Garrel, C., Laporte, F., Boutonnat, J., and Boumendjel, A. (2013) Cellular and molecular mechanisms activating the cell death processes by chalcones: Critical structural effects. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 27, 2305-2315.
- [58] Pilatova, M., Varinska, L., Perjesi, P., Sarissky, M., Mirossay, L., Solar, P., Ostro, A., and Mojzis, J. (2010) In vitro antiproliferative and antiangiogenic effects of synthetic chalcone analogues. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 24, 1347-1355.
- [59] Han, Y., Riwanto, M., Go, M.L., and Ee, P.L. (2008) Modulation of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) by non-basic chalcone analogues. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 35, 30-41.

- [60] Bandgar, B.P., Gawande, S.S., Bodade, R.G., Totre, J.V., and Khobragade, C.N. (2010) Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18, 1364-1370.
- [61] Dias, T.A., Duarte, C.L., Lima, C.F., Proenca, M.F., and Pereira-Wilson, C. (2013) Superior anticancer activity of halogenated chalcones and flavonols over the natural flavonol quercetin. *European journal of medicinal chemistry*, 65, 500-510.
- [62] Hadi, S.M., Bhat, S.H., Azmi, A.S., Hanif, S., Shamim, U., and Ullah, M.F. (2007) Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties. *Seminars in cancer biology*, 17, 370-376.
- [63] Sabzevari, O., Galati, G., Moridani, M.Y., Siraki, A., and O'Brien, P.J. (2004) Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydroxychalcones. *Chemico-biological interactions*, 148, 57-67.
- [64] Nandi, B., Roy, S., Bhattacharya, S., and Sinha Babu, S.P. (2004) Free radicals mediated membrane damage by the saponins acaciaside A and acaciaside B. *Phytotherapy research : PTR*, 18, 191-194.
- [65] Storr, S.J., Woolston, C.M., Zhang, Y., and Martin, S.G. (2013) Redox environment, free radical, and oxidative DNA damage. *Antioxidants & redox signaling*, 18, 2399-2408.
- [66] Barzilai, A., and Yamamoto, K. (2004) DNA damage responses to oxidative stress. *DNA repair*, 3, 1109-1115.
- [67] Stefanisinova, M., Tomeckova, V., Kozurkova, M., Ostro, A., and Marekova, M. (2011) Study of DNA interactions with cyclic chalcone derivatives by spectroscopic techniques. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 81, 666-671.
- [68] Mukherjee, A., and Sasikala, W.D. (2013) Drug-DNA Intercalation: From Discovery to the Molecular Mechanism. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 92, 1-62.
- [69] Ferguson, L.R., and Denny, W.A. (2007) Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. *Mutation research*, 623, 14-23.
- [70] Czczot, H., Rahden-Staron, I., Oleszek, W., and Jurzysta, M. (1993) Lack of mutagenic activity of saponins in the Ames test. *Acta biochimica Polonica*, 40, 74-76.
- [71] Czczot, H., Rahden-Staron, I., Oleszek, W., and Jurzysta, M. (1994) Isolation and studies of the mutagenic activity of saponins in the Ames test. *Acta poloniae pharmaceutica*, 51, 133-136.
- [72] Pal, D., Chakraborty, P., Ray, H.N., Pal, B.C., Mitra, D., and Kabir, S.N. (2009) Acaciaside-B-enriched fraction of *Acacia auriculiformis* is a prospective spermicide with no mutagenic property. *Reproduction*, 138, 453-462.
- [73] Liu, W., Di Giorgio, C., Lamidi, M., Elias, R., Ollivier, E., and De Meo, M.P. (2011) Genotoxic and clastogenic activity of saponins extracted from *Nauclea* bark as assessed by the micronucleus and the comet assays in Chinese Hamster Ovary cells. *Journal of ethnopharmacology*, 137, 176-183.
- [74] Pastwa, E., and Blasiak, J. (2003) Non-homologous DNA end joining. *Acta biochimica Polonica*, 50, 891-908.
- [75] Constantinou, A., Mehta, R., Runyan, C., Rao, K., Vaughan, A., and Moon, R. (1995) Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. *Journal of natural products*, 58, 217-225.

Legends for figures

Figure 1. Dose-dependent cytotoxicity (% of negative control) as determined by two assays in V79 cells: MTT reduction method (Panel A) and Clonogenic survival (Panel B). Cells were treated with 0 (control), 1, 10, 20, 30, 40 and 50 $\mu\text{g/mL}$ *E. polystachya* crude seed extract for 2 h. Negative control (solvent). Data are expressed as mean \pm SD, n= 4. **Significant difference in relation to the negative control group at $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ /One-way ANOVA Tukey's Multiple Comparison Test.

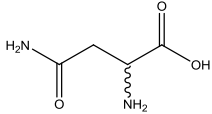
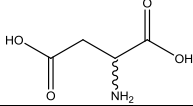
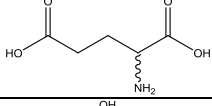
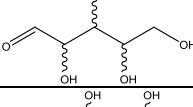
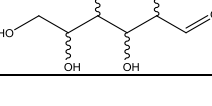
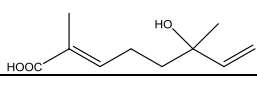
Figure 2. *E. polystachya* crude seed extract -induced DNA damage in V79 cells as evaluated by the alkaline comet assay. Cells were treated with 0 (control), 1, 10, 20, 30, 40 and 50 $\mu\text{g/mL}$ *E. polystachya* crude seed extract for 2 h. Negative control (solvent). Data are expressed as means \pm SD, n = 4. Significantly different in relation to the untreated control, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$ by one-way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test.

Figure 3. Oxidative damage induced by 2 h *E. polystachya* crude seed extract treatment in V79 cells as evaluated by the modified comet assay using Fpg (Panel A) and Endo III (Panel B) enzymes. The oxidative damage score was calculated as the difference between the score obtained after incubation with the respective enzyme or with the enzyme buffer. Data are expressed as means \pm SD, n = 4. Significantly different in relation to the untreated control, ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$ by one-way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test.

Figure 4. Micronucleus induction in V79 cells by 2 h *E. polystachya* crude seed extract treatment. The MN frequency is expressed per 2000 BNC. MMS was used as positive control. Solvent was used as negative control. Data are expressed as mean \pm SD, n = 4. Significantly different in relation to the negative control, ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$ by one-way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test.

Figure 5. Determination of TBARS in V79 cells treated with *E. polystachya* crude seed extract at the indicated concentrations for 2 h. Solvent was used as a negative control. Data are expressed as means \pm SD, n = 4. Significantly different in relation to the negative control, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; and *** $p < 0.001$ by one-way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test.

Table 1. Main identified ions of *E. polystachya* crude seed extract by ESI-MS (+) and ESI-MS (-)

Entry	Precursor Ion m/z(%)	Isotopic (%)	Elem. Comp.	Diff. ppm	Fragmentation (intensity %)	
ESI-MS (+)						
1	138.0551	139.0556 (8.4); 140.0576 (1.9).	C ₇ H ₈ NO ₂	2.92	94.0645 (15); 92.0489 (13)	
2	175.1193	176.1210 (8.3); 177.1275 (0.9).	C ₆ H ₁₅ N ₄ O ₂	1.15	158.0886 (18); 141.0668 (16); 130.0966 (70); 116.0692 (100); 112.0880 (12); 111.0069 (10); 98.0581 (3); 17.0727 (3)	
3	243.1825	244.1846 (13.3); 245.1864 (1.3).	C ₁₁ H ₂₃ N ₄ O ₂	1.64	226.1558 (5); 196.1602 (10); 175.1189 (95); 158.0926 (14); 130.0974 (13); 128.1180 (10); 116.0708 (35); 112.0870 (5)	
ESI-MS(-)						
Entry	Precursor Ion m/z (%)	Elem. Comp.	Diff. ppm	Identification	Chemical structure	Reference
4	131.0457	C ₄ H ₇ N ₂ O ₃	0.25	Asparagine		[15]
5	132.0300	C ₄ H ₆ NO ₄	2.40	Aspartic Acid		[11]
6	146.0460	C ₅ H ₉ NO ₄	4.59	Glutamic acid		[11]
7	149.0453	C ₅ H ₉ O ₅	2.21	Arabinose		[27]
8	179.0560	C ₆ H ₁₁ O ₆	2.44	Glucose		[19]
9	183.1030	C ₁₀ H ₁₅ O ₃	4.81	6-hydroxy-2,6-dimethyl-2,7-Octadienoic acid		[26]
10	191.0213	C ₉ H ₅ NO ₄	2.91	-	-	-
11	215.0340	C ₁₂ H ₇ O ₄	2.02	-	-	-

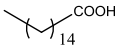
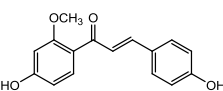
12	241.1708	C ₁₆ H ₂₁ N ₂	1.35	-	-	-
13	255.2331	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	2.72	Hexanoic acid		[26]
14	269.0826	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	4.52	1-(4-hydroxy-2-methoxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-Propen-1-one Or 3-deoxysappanchalcone		[29]
15	277.0354	C ₁₃ H ₉ O ₇	2.07	-	-	-

Table 2: Induction of *his+* revertants in *S. typhimurium* strains by *E. polystachya* crude seed extract with and without metabolic activation (S9 mix).

<i>S. typhimurium</i> strains					
Substance	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	TA100		TA98	
		Rev/plate ^a	MI ^b	Rev/plate ^a	MI ^b
Without metabolic activation (-S9)					
Negative control ^c	-	109.3 \pm 5.8	-	9.7 \pm 1.5	-
Positive control ^d	0.5 (4NQO)			216.7 \pm 1.16***	22.41
	1 (NaN ₃)	388.7 \pm 12.2***	3.56		
Extract	500	136.7 \pm 9.9	1.25	29.7 \pm 19.9	3.07
	1000	143.0 \pm 7.6	1.31	48.3 \pm 7.4**	5.00
	1500	159.0 \pm 11.5	1.46	46.0 \pm 18.2	4.76
	2000	158.3 \pm 22.5	1.45	70.0 \pm 14.0**	7.24
	2500	133.0 \pm 15.7	1.22	48.7 \pm 24.5	5.04
With metabolic activation (+S9)					
Negative control ^c	-	114.7 \pm 15.3	-	15.7 \pm 1.2	-
Positive control ^d	10 (2-AF)	550.7 \pm 16.5**	4.80	1289.7 \pm 73.5***	82.3
Extract	500	124.3 \pm 16.4	1.08	27.3 \pm 8.2	1.74
	1000	115.3 \pm 30.6	1.01	29.3 \pm 7.0	1.87
	1500	107.7 \pm 4.7	0.94	24.7 \pm 4.5	1.58
	2000	138.7 \pm 16.4	1.21	26.0 \pm 5.3	1.66
	2500	149.7 \pm 15.4	1.31	54.7 \pm 7.5**	3.49

^aNumber of revertants/plate: mean of three independent experiments \pm SD; ^bMI: mutagenic index (n^o. of *his+* induced in the sample/n^o. of spontaneous *his+* in the negative control); ^cnegative control DMSO (10 μL) used as a solvent for the extract; ^dpositive control (-S9) sodium azide to TA100; 4-NQO to TA98; (+S9) 2-aminofluorene (2-AF). **Data significantly different in relation to negative control, $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Table 3. Effect of *E. polystachya* crude seed extract treatment on the cell proliferation measured as percentage of binucleated cells (BNCs) in micronucleus assay.

EPCSE	% BNCs ^a
Negative control	93.4 ± 2.5
Positive control	62.0 ± 7,5***
1 µg/mL	93.8 ± 3.1
10 µg/mL	90.0 ± 3.4
20 µg/mL	83.6 ± 4.5
30 µg/mL	78.8 ± 3.4**
40 µg/mL	72.3 ± 6.4***
50 µg/mL	63.6 ± 5.3***

^aV79 cells were exposed to *E. polystachya* crude seed extract for 2 h and the BNC per 1000 cells were counted. MMS was used as positive control. Data are expressed as mean ± SD, n= 4, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (ANOVA, Tukey's test): untreated cells vs. EPCSE exposure.

Table 4: Influence of 2h *E. polystachya* crude seed extract treatment on enzymatic activities in V79 cells.

EPCSE ($\mu\text{g/mL}$)	Superoxide dismutase (U SOD/mg protein)	Catalase (U CAT/mg protein)
0	1.3 ± 0.2	3.9 ± 0.2
1	1.5 ± 0.3	4.3 ± 0.5
10	$1.7 \pm 0.4^*$	$6.4 \pm 0.4^*$
20	$2.1 \pm 0.4^{**}$	$7.8 \pm 0.3^{**}$
30	$2.2 \pm 0.3^{***}$	$8.9 \pm 0.1^{***}$
40	$2.5 \pm 0.5^{***}$	$10.7 \pm 0.1^{***}$
50	$3.6 \pm 0.4^{***}$	$15.5 \pm 0.2^{***}$

E. polystachya crude seed extract treatments were compared to control (solvent). Data are expressed as mean \pm SD, n= 4; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (ANOVA, Tukey's test).

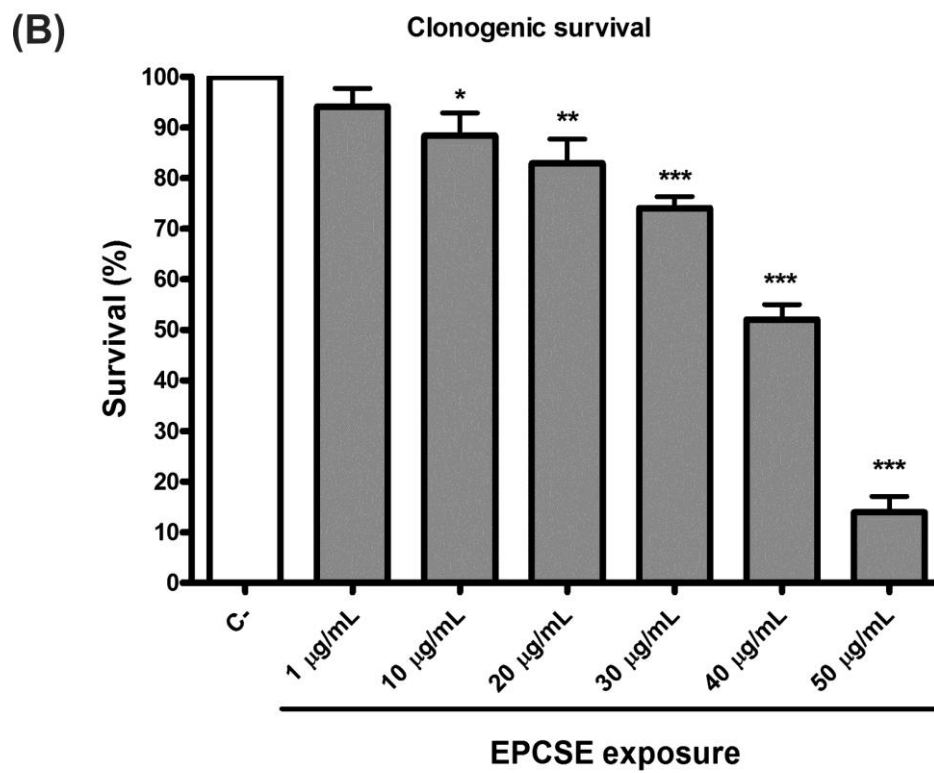
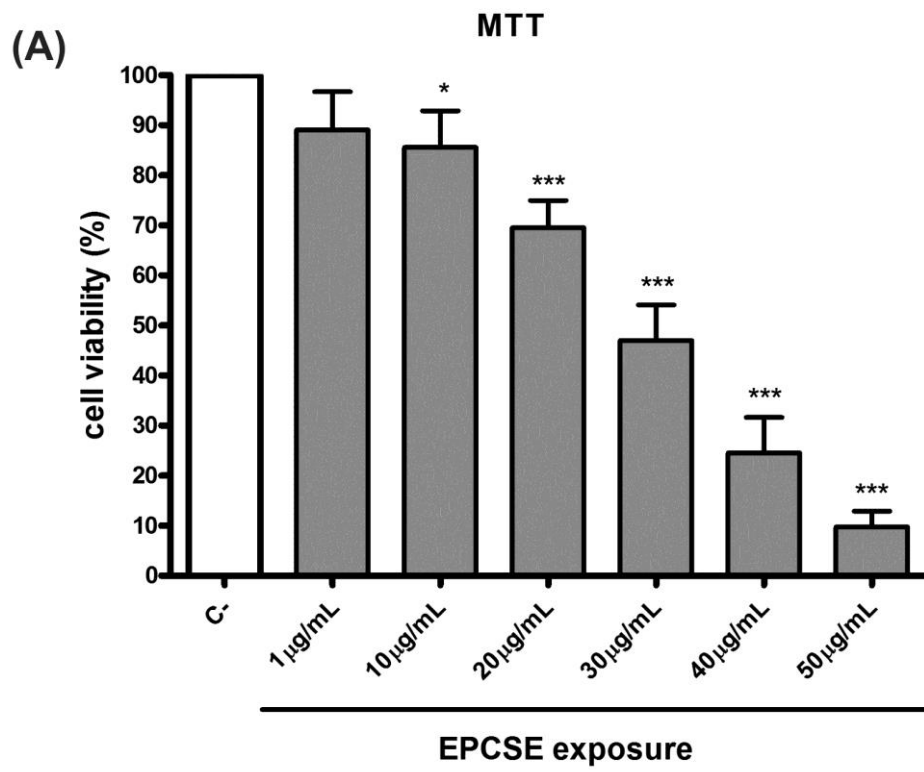


Figure 1

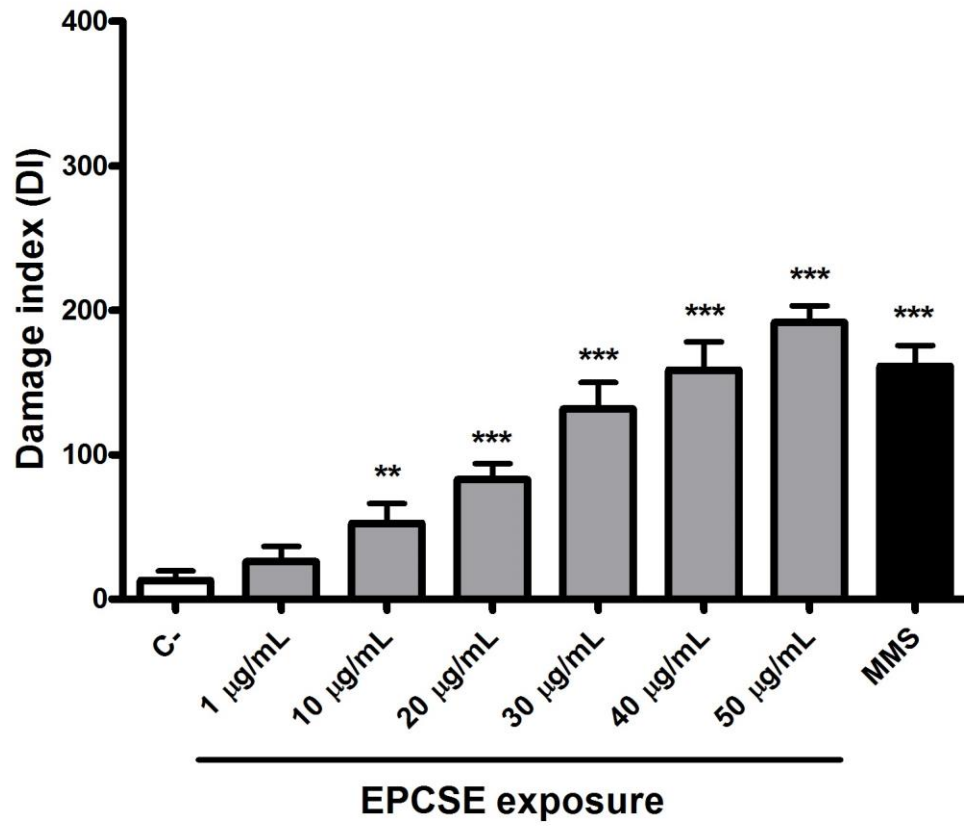
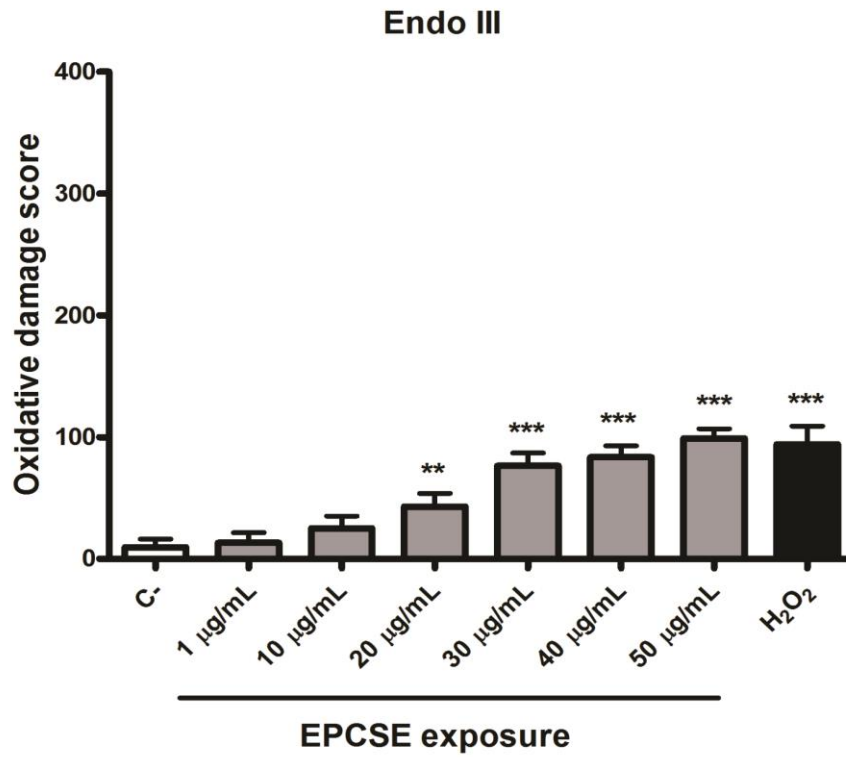


Figure 2

(A)



(B)

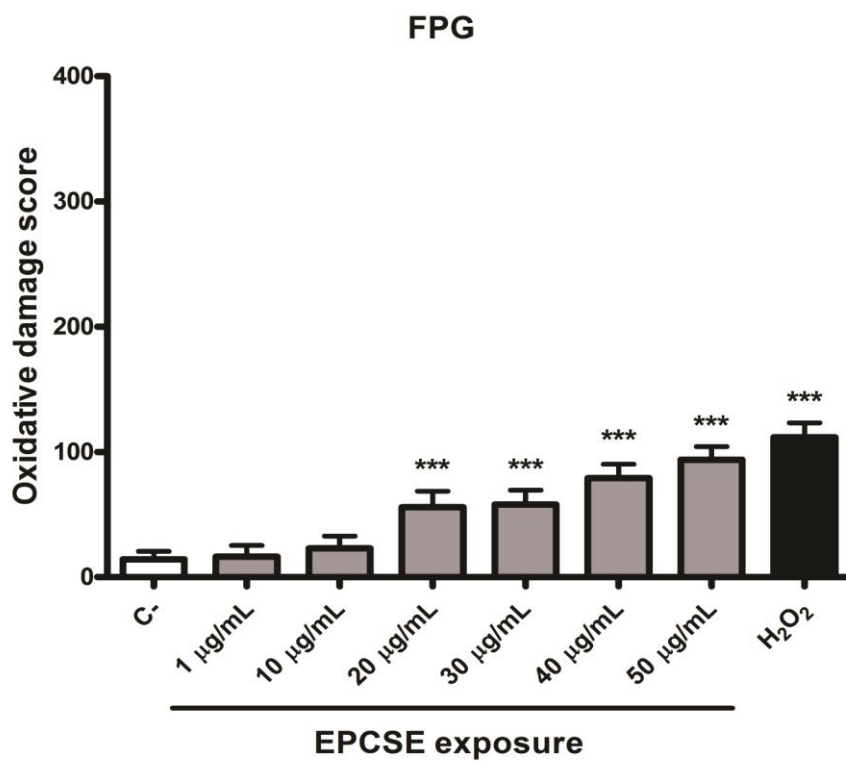


Figure 3

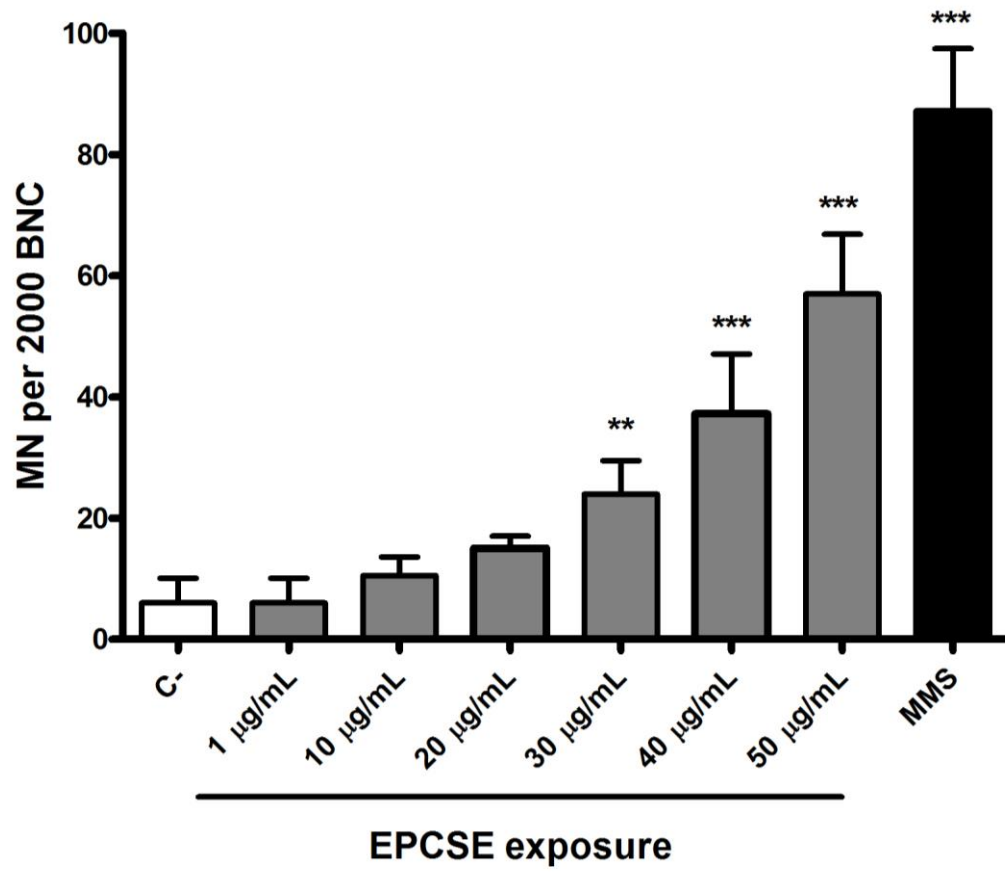


Figure 4

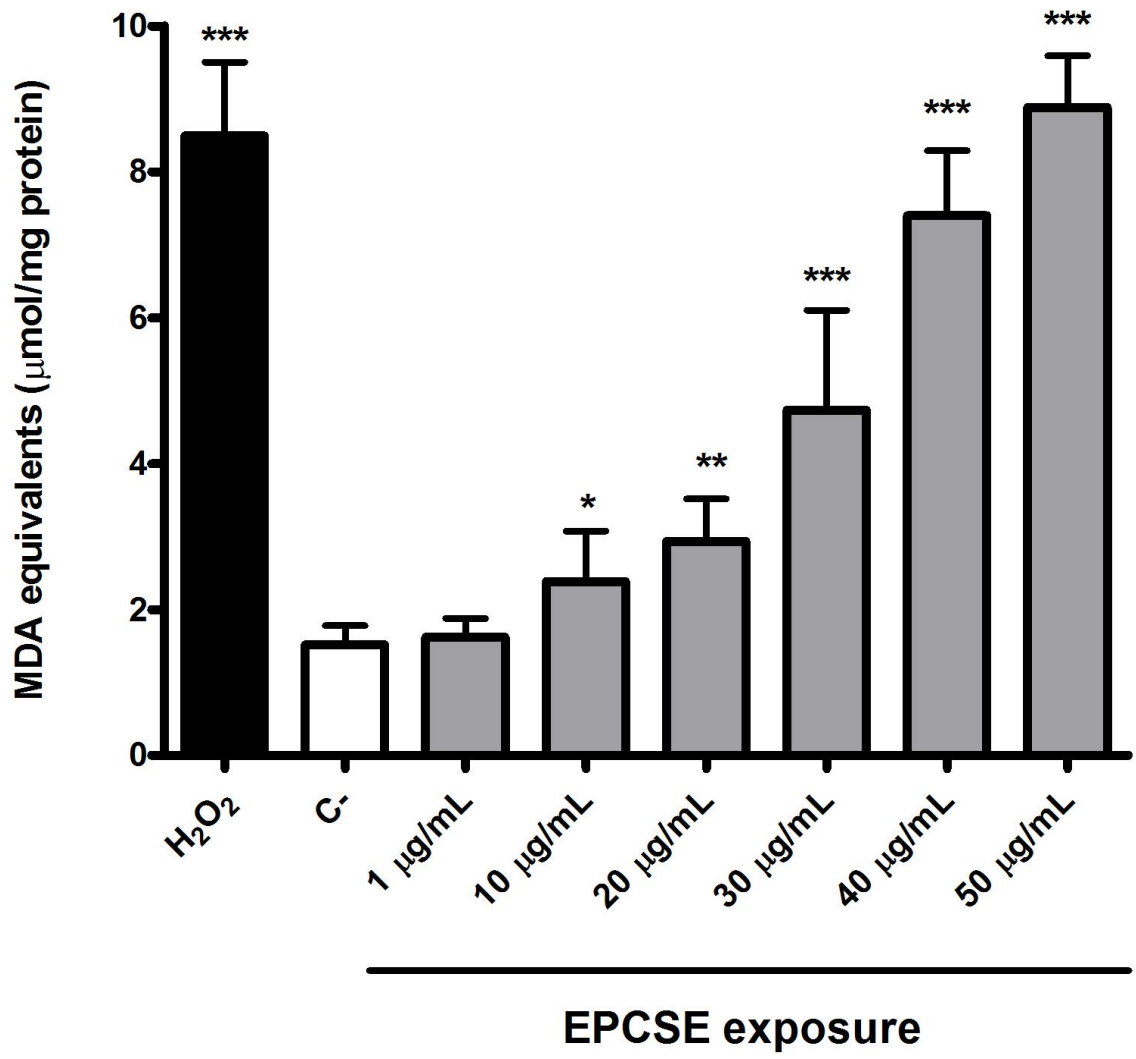


Figure 5



Discussão

DISCUSSÃO

A utilização de plantas com propriedades medicinais constitui uma das formas mais antigas de terapia medicinal. As plantas são uma das principais fontes para a obtenção de novas moléculas com potencial terapêutico, porém, uma pequena parcela dessas plantas apresentam estudos científicos. No entanto, deve haver garantia de segurança e estudos em relação aos efeitos tóxicos e conhecimento sobre os efeitos secundários, interações, contraindicações e toxicidade (Calixto, 2005; Cragg e Newman, 2013; Ngo *et al.*, 2013).

Plantas pertencentes ao gênero *Entada* possuem potencial emprego farmacológico apresentando efeitos biológicos como: atividade antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica, antioxidante e antiproliferativa (Diallo *et al.*, 2001; Cioffi *et al.*, 2006; Teke *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2012; Owona *et al.*, 2013). Portanto, as espécies de *Entada* se apresentam como uma interessante fonte de moléculas com efeitos biológicos com potencial emprego farmacológico, especialmente no que se trata de atividade antiproliferativa (Cioffi *et al.*, 2006). Agregar informação em relação ao potencial tóxico das espécies de *Entada* também é de fundamental importância visto o uso popular que essas plantas do gênero possuem (Da Silva e Parente, 2010; Teke *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2012). Faz-se importante salientar que não há estudos referentes à toxicidade genética dos extratos de plantas deste gênero, sendo este trabalho pioneiro neste sentido. Desta forma, no presente estudo foram realizadas a caracterização química do extrato bruto de sementes de *Entada polystachya* (EBSEP) e a avaliação das propriedades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas do extrato em bactérias e em células de mamíferos em cultura.

Com a finalidade de se identificar os compostos presentes no extrato foi utilizado o método Espectrometria de Massas (EM) e foi identificado alguns aminoácidos e glicose (Tabela 1, Capítulo I). A presença desses compostos em EBSEP é esperado, uma vez que a semente contém quantidades extras de materiais de reserva nutritivas para sustentar a germinação, como carboidratos e proteínas (Lopes *et al.*, 2007). De acordo com esse dado, Siddhuraju e colaboradores (2001) mostraram que sementes das plantas do gênero possuem alto teor de lipídios (ácidos graxos insaturados, ácidos oleico e linoleico), carboidratos, proteínas, principalmente albumina, e aminoácidos essenciais, particularmente aminoácidos contendo enxofre. Também foram identificados outros dois compostos: n° 9 (6-hydroxy-2,6-dimethyl-(2E) -2,7-octadienoyl) e n° 14 (3-deoxysappanchalcone) (Tabela 1, Capítulo I), classificados como por similaridade com moléculas presentes em outras espécies de Entada, como parte de uma saponina e de uma chalcona, respectivamente. Confirmando nossos resultados, Da Silva e Parente (2010) também identificaram a mesma saponina, sendo que a estrutura foi confirmada, no estudo, por ressonância magnética nuclear (RMN). Também foi constatada a presença de outras estruturas de saponinas e flavonoides, inclusive chalconas, em diferentes espécies de Entada (Taponjoui *et al.*, 2005; Cioffi *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2012; Iwamoto *et al.*, 2012; Mo *et al.*, 2013).

O motivo que encontramos apenas uma parte da saponina nas nossas análises pode ser devido ao fato de que em alguns casos a molécula pode ser fragmentada durante o procedimento. Isso pode ocorrer quando durante a ionização uma parte da molécula se torna mais estável do que a molécula inteira, então somente essa parte com maior estabilidade aparece na análise (Vesecchi *et al.*, 2011).

A atividade citotóxicas do extrato em cada modelo biológico foram determinadas e, naturalmente, são diferentes entre si. Essa diferença é normal e inerente

à natureza dos modelos biológicos comparados, uma vez que representam células com diferentes características de permeabilidade e metabolismo. Não foi observada citotoxicidade na linhagem TA100 de *Salmonella thyphimurium* com ou sem metabolização (dados não mostrados). Entretanto, avaliando-se o efeito do extrato na viabilidade celular, pelos teste de MTT e pela sobrevivência clonogênica em células V79, pode-se inferir um perfil citotóxico dose-resposta a partir da concentração 10 µg/mL, em ambos os testes (Figura 1A e 1B, Capítulo I). Outra evidência do efeito citotóxico foi a redução de células binucleadas observada (Tabela 3, Capítulo I).

Os compostos “9” e “14” podem estar contribuindo com a toxicidade do EBSEP. Uma vez que chalconas e saponinas apresentam efeito citotóxico (Batovska e Todorova, 2010; Champelovier *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2013). Em coerência com este raciocínio, Da Silva e Parente (2010) mostraram atividade hemolítica *in vitro* da saponina de *E. polystachya*. Diversas saponinas apresentam citotoxicidade contra células tumorais, interferindo na progressão do ciclo celular, induzindo a apoptose e promovendo a estabilização de microtúbulos (Francis *et al.*, 2002; Sparg *et al.*, 2004; Augustin *et al.*, 2011). Da mesma forma, chalconas apresentam atividade antiproliferativa contra diversas linhagens tumorais, como células de leucemia, gliomas, glioblastomas, carcinoma pancreático, epitelial e prostático, causando morte celular por necrose ou apoptose (Sabzevari *et al.*, 2004; Bandgar *et al.*, 2010; Batovska e Todorova, 2010).

Um dos mecanismos tóxicos de chalconas e saponinas é a interferência no metabolismo redox da célula (Sparg *et al.*, 2004; Guclu-Ustundag e Mazza, 2007; Champelovier *et al.*, 2013). Assim, várias saponinas, tal como a saponina esteroidal isolada de *Allium macrostemon*, macrostemonoside A (MSS.A) suprimiu o crescimento de células de câncer colorretal (Caco2 e SW480), por causar apoptose devido ao acúmulo de ERO (Wang *et al.*, 2013). O mesmo efeito foi visto em células HepG2

câncer de mama humano (MDA-MB-231), quando expostas a saponinas isoladas de *Asparagus* e *Dioscorea zingiberensis*, respectivamente (Ji *et al.*, 2012; Chun *et al.*, 2013). De maneira similar, as chalconas (E)-7-metoxi-4-(3-oxo-3-fenilpropa-1-enil)-2H-croman-2-ona e (E)-7-hidroxi-4-(3-(4-hidroxifenil)-3-oxopropa-1-enil)-2H-croman-2-ona levaram a necrose de células de câncer de cólon (CT26) também devido ao acúmulo de ERO (Bandgar *et al.*, 2010).

O reconhecido efeito de chalconas e saponinas sobre o balanço redox celular motivou avaliar o estado redox das células após a exposição ao EBSEP, que possuem compostos dessas classes.

Ácidos graxos poliinsaturados contêm um ou mais grupos metileno posicionados entre as duplas ligações cis. Esses grupamentos são altamente reativos em relação a agentes oxidantes, atuando como doadores de hidrogênios para radicais centrados em carbono, os quais reagem com o oxigênio formando radicais peroxil, cujo destino pode ser a conversão a hidroperóxidos. Na presença de complexos metálicos e metaloproteínas, ocorre redução dos hidroperóxidos de ácidos graxos produzindo radicais alcóxil, iniciando uma reação em cadeia responsável pela produção de diversos epóxidos, hidroperóxidos e compostos carbonilados, denominada peroxidação lipídica (Halliwell e Gutteridge, 2007). Um dos principais produtos desse processo é o malondialdeído (MDA), cujas repercussões biológicas são estudadas há muito tempo. Três hipóteses são propostas para a origem desse aldeído: (i) em condições de estresse, essa molécula poderia ser formada durante biossíntese de prostaglandinas e tromboxanas, como um produto de decomposição lipídica; (ii) as sucessivas gerações de hidroperóxidos e clivagem da cadeia de ácido graxo no carbono β poderiam produzir hidroperoxialdeído, e a posterior β -cisão liberaria MDA; (iii) por reação final entre o radical hidroxil e a acroleína (Schneider, 2009). Além do MDA, o t-4-hidroxi-2-nonanal

(4-HNE), derivado das reações de peroxidação lipídica, também apresenta potencial de lesar o DNA *in vivo* (Marnett, 1999; Winczura *et al.*, 2012).

O potencial carcinogênico do MDA é conhecido desde 1972, quando sua administração tópica em camundongos induziu tumores de pele. Uma vez que os resultados desse estudo apresentaram-se um pouco controversos, somente alguns anos depois a evidência de carcinogênese em ratos foi realmente confirmada (Levin *et al.*, 1982; Niedernhofer *et al.*, 2003). Na verdade, MDA é mutagênico no teste Ames por possuir capacidade de formar adutos no DNA em resíduos de guanina e conseqüentemente causar deleções gênicas e mutações de deslocamento de quadro de leitura (Levin *et al.*, 1982; Marnett, 1999; Luczaj e Skrzydlewska, 2003; Voulgaridou *et al.*, 2011). As lesões pré-mutagênicas são consistentes estruturalmente com pontes intercadeias formadas por outros agentes e, da mesma forma, são extremamente tóxicas por bloquear a replicação e transcrição. O reparo desses adutos entre DNA e MDA necessita, obrigatoriamente, de um intermediário com quebra dupla na fita, cuja reparação está canalizada para via de recombinação homóloga (Lim *et al.*, 2004; Voulgaridou *et al.*, 2011). Dessa maneira, a participação do MDA, cuja formação ocorre na peroxidação lipídica, nos efeitos genotóxicos do EBSEP auxilia no entendimento dos mecanismos tóxicos de moléculas presente no extrato, como chalconas e saponinas.

A maioria dos ensaios de determinação de MDA foram desenvolvidos com base na sua reação com ácido tiobarbitúrico, em razão da condensação das duas moléculas produzir um aduto de alta absorvidade molar, permitindo um ensaio espectrofotométrico (Del Rio *et al.*, 2005; Hwang e Kim, 2007). Todavia, a especificidade da reação é baixa, uma vez que o ácido tiobarbitúrico pode reagir com vários compostos derivados de oxidação, além do MDA (Dotan *et al.*, 2004).

Com objetivo de avaliar a situação do estado redox celular após tratamento com EBSEP, realizou-se a medida, em células de mamíferos, dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, caracterizando-se o momento oxidante da célula, como mostrado nos resultados do Capítulo I (Fig. 5). Dessa forma, evidenciou-se um aumento na peroxidação lipídica após exposição das células ao EBSEP sugerindo uma importante participação de ERO na toxicidade de moléculas presentes no extrato. Em concordância, o composto Phaseoloidesideo E, uma saponina triterpenóide isolada de *E. phaseoloides* induziu a acumulação ERO em células Ec-109 (Mo *et al.*, 2013).

Sob estresse oxidativo, as células geralmente entram em um processo adaptativo, principalmente através do aumento da atividade de sua defesa antioxidante enzimática, como a catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). A enzima SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Fridovich, 1998). Já a CAT converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Halliwell e Gutteridge, 2007). Assim, verificou-se que EBSEP aumentou significativamente a atividade de SOD celular e CAT nas células V79 (Tabela 4, Capítulo I). Esses dados estão de acordo com Nandi e colaboradores (2004) que observaram a indução de peroxidação lipídica na membrana microssomal de fígados de ratos por duas saponinas triterpenóides de acácia (Acaciasideo A e B), já que a presença de SOD e CAT reduziu o efeito oxidante das saponinas, sugerindo que estas moléculas podem gerar ânions superóxido e iniciar a peroxidação lipídica.

Os resultados deste estudo, de fato, sugerem que compostos presentes no extrato, como o composto (9) e (14) promovem formação de ERO e conseqüentemente podem levar a danos oxidativo às bases nitrogenadas do DNA (Hadi *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011; Stefanisinova *et al.*, 2011). Neste raciocínio, a ação oxidante e o conseqüente dano oxidativo ao DNA, manifesto sob forma de oxidação de bases, foi confirmada, em

células V79, pelo ensaio cometa na versão modificada, empregando as endonucleases de reparação de DNA, EndoIII e Fpg (Fig. 3A e 3B, Capítulo I). A reparação deste tipo de dano, portanto, necessita da participação de enzimas da via de reparo por excisão de bases (BER) que removem as bases danificadas ou errôneas e gera sítiosapurínicos/apirimidínicos (AP). Os sítios AP podem ser convertidos em quebras de DNA (David *et al.*, 2007; Svilar *et al.*, 2011). Essas quebras de DNA também foram verificadas em células V79 por meio do ensaio cometa em condições alcalinas (Fig. 2, Capítulo I) e no teste de micronúcleos (Fig. 4, Capítulo I).

Danos oxidativos também podem induzir um aumento na frequência da substituição de pares de bases (Mortelmans e Zeiger, 2000; Fortini *et al.*, 2003; Imlay, 2013). Entretanto, em *Salmonella typhimurium* na linhagem TA100, que detecta esse tipo de mutação, não houve alteração no índice mutagênico na exposição ao extrato em comparação com o controle negativo (Tabela 2, Capítulo I). Diversas saponinas com atividade citotóxica, quando avaliadas no teste de Ames não induziram mutações *S. typhimurium*, na presença ou ausência de ativação metabólica (Czeczot *et al.*, 1993; Yoshiki *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2011).

Ainda em relação ao ensaio em bactéria, foi observado que o extrato induziu aumento na frequência de indução de mutação *frameshift* (deslocamento de quadro de leitura no DNA) detectada em *S. typhimurium* na linhagem TA98 (Tabela 2, Capítulo I). Assim, aqui se pode sugerir um outro efeito do EBSEP, que seria uma possível capacidade de moléculas presentes no extrato de se intercalar entre as bases do DNA.

As chalconas apresentam arranjo planar devido aos anéis aromáticos presentes em sua estrutura, o que propicia à molécula uma estabilidade química e favorece a atividade biológica (Champelovier *et al.*, 2013). A esse respeito deve-se considerar que compostos químicos com topologia planar e dotados de características eletrofílicas são

potenciais candidatos à intercalação entre as fitas de DNA, uma vez que a existência de um centro eletrofílico nas proximidades das bases do DNA estabelece uma interação capaz de permitir a formação de ligação covalente e por fim, um aduto de DNA (Mukherjee e Sasikala, 2013). Por essa razão, os agentes intercalantes constituem uma das classes de xenobióticos de maior potencial genotóxico, refletindo essa propriedade biológica por meio da indução característica de mutações *frameshift* em microrganismos e quebras cromossômicas em mamíferos (Snyder e Arnone, 2002; Ferguson e Denny, 2007). Assim, o resultado positivo no teste de Ames na linhagem TA98 pode indicar a capacidade de alguns compostos presentes no extrato de intercalarem com o DNA, como chalconas. Neste raciocínio, Stefanisinova e colaboradores (2011) mostraram uma série de chalconas com capacidade de se intercalarem entre as bases do DNA. Ao contrário, uma interação direta entre saponinas e pares de bases de DNA parece improvável, devido ao grande tamanho das moléculas de saponina (Liu *et al.*, 2011).

Desta forma, também é importante mencionar que o tratamento com o extrato possivelmente tenha causado quebras cromossômicas em células V79 em cultivo, avaliada pela ocorrência de micronúcleos (Fig. 4, Capítulo I).

Sabe-se que as mutações de deslocamento de quadro de leitura são causadas pela perda ou adição quando a DNA polimerase realiza uma cópia a partir de um molde contendo resíduos intercalados (Khan *et al.*, 2012). No entanto, além de mutação *frameshift*, a intercalação também pode resultar em quebras da fita de DNA como consequência da inibição da ação de topoisomerases (Snyder e Arnone, 2002; Ferguson e Denny, 2007). A presença de uma substância intercalada na cadeia de DNA pode estabilizar o complexo DNA-topoisomerase e inibir o passo de religação do ciclo catalítico da manipulação topológica dos ácidos nucleicos mediada por topoisomerases (Pommier, 2006; Nitiss, 2009). É possível então compreender o mecanismo pelo qual os

agentes intercalantes capazes de inibir a ação dessas enzimas originam quebras de DNA. Em coerência com esta hipótese, os flavonoides e outros compostos polifenólicos, incluindo chalconas, foram mostradas para inibir as enzimas topoisomerasas humanas I e II, tanto através da inibição da atividade de relaxamento do DNA quanto pela estabilização do complexo de clivagem (Constantinou *et al.*, 1995; Stefanisinova *et al.*, 2011).

O teste de micronúcleos mostra que as lesões geradas pelo extrato em células V79 não são eficientemente reparadas e fixam-se no genoma na forma de quebras cromossômicas, originando o aumento na frequência de micronúcleos observada (Fig. 4, Capítulo I). Liu e colaboradores (2011) constataram a atividade clastogênica/aneugênica, pelo ensaio de micronúcleo, e genotoxicidade, pelo ensaio cometa, de seis saponinas isoladas do extrato hidrometanólico de *Nauclea diderrichii* em células de ovário hamster chinês.

O perfil genotóxico do extrato se altera com presença de ativação metabólica com uso da mistura S9, uma fração microsossomal hepática de ratos. Assim sendo, é possível concluir que moléculas presentes no extrato são inativadas pela metabolização (Tabela 3, Capítulo I). Neste aspecto, é importante ressaltar que há uma correlação estrutura-atividade em relação ao perfil de toxicidade genética em relação à saponinas e chalconas (Czeczot *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2011; Resende *et al.*, 2012). Uma vez que foi demonstrado que os resultados no teste de Ames são altamente influenciados pela estrutura dos flavonoides, sobretudo pelo padrão de hidroxilação, a metabolização pode levar a alterações estruturais alterando a mutagenicidade dos flavonoides no teste de Ames (Resende *et al.*, 2012).

Em síntese, os efeitos do EBSEP são complexos e a possibilidade de interações sinérgicas, aditivas e/ou antagonísticas entre os componentes do extrato devem ser

consideradas. Portanto, mais estudos no sentido de fracionamento do extrato aquoso e isolamento dos compostos tóxicos são necessários. Entretanto, com base nos resultados podemos sugerir que o mecanismo de toxicidade genética do extrato apresenta dois efeitos fundamentais possíveis: oxidante e intercalante. Por ação oxidante de compostos presentes no extrato, como saponinas e chalconas, compostos “9” e “14”, respectivamente, geram peroxidação lipídica e os danos oxidativos podem ser convertidos em quebras no DNA levando a morte celular. Nesse cenário, também se deve considerar a ação intercalante de moléculas presentes, como chalconas, composto “14”, como fator de origem de quebras na fita de DNA (Fig. 7).

Este estudo é de especial importância na prospecção de moléculas com atividade antiproliferativa e conseqüentemente potencial emprego farmacológico e no delineamento dos mecanismos tóxicos destes compostos. Além disso, o conhecimento da toxicidade das espécies do gênero *Entada* é importante pela segurança no emprego popular dos extratos dessas plantas.

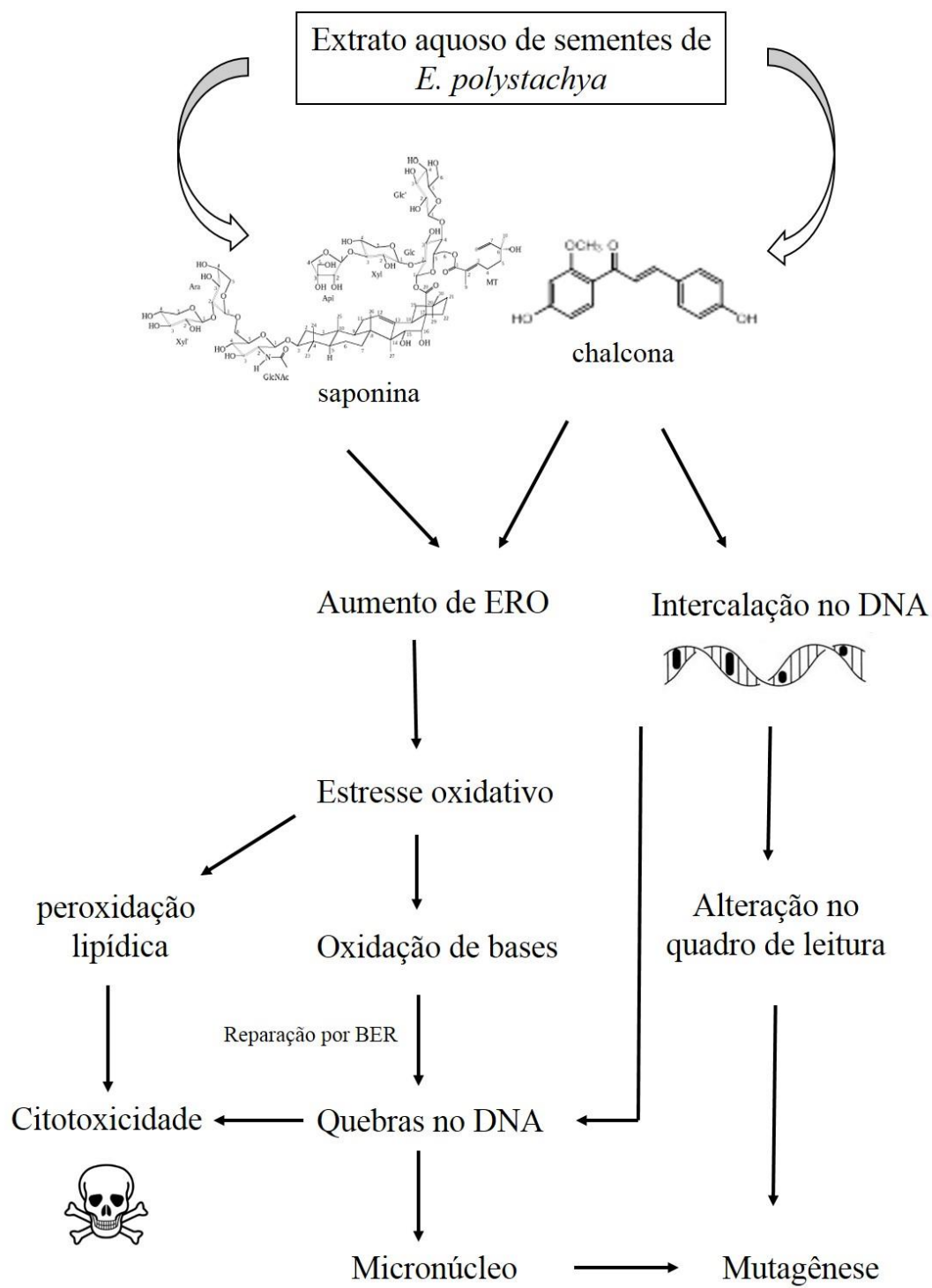


Figura 7: Modelo esquemático proposto para o possível mecanismo de toxicidade do extrato aquoso de sementes de *E. polystachya*, com base nos resultados obtidos neste estudo.



Conclusões

CONCLUSÕES

Conclusão geral

O presente estudo mostrou evidências da composição química e da citotoxicidade do extrato aquoso de sementes de *Entada polystachya*, agregando informação a respeito dos mecanismos tóxicos do extrato. A citotoxicidade e mutagenicidade do extrato em bactéria e células V79 possa ocorrer, possivelmente, por dois mecanismos fundamentais: sua propriedade de perturbar a homeostase redox intracelular, levando a oxidação de bases nitrogenadas, e a capacidade de intercalação entre as bases do DNA. Estes eventos contribuem para a formação de quebras na fita de DNA. Neste cenário, duas moléculas, saponina e chalcona, podem estar contribuindo na modulação da toxicidade do extrato.

Conclusões específicas

- Os grupos químicos presentes no extrato de sementes de *E. polystachya* foram aminoácidos (asparagina, ácido aspártico, ácido glutâmico), carboidratos (glicose e arabinose) e flavonoides (chalcona) e saponinas;
- O extrato apresentou efeito citotóxico em células V79 em cultivo;
- O extrato de *E. polystachya* apresentou perfil genotóxico, uma vez que o ensaio cometa em células V79 em cultivo na versão alcalina mostrou a ocorrência de quebras de DNA após o tratamento.
- A presença de purinas e pirimidinas oxidadas no DNA de células V79 tratadas com o extrato foi confirmada pelo ensaio cometa modificado empregando endonucleases específicas (Fpg e Endo III).

- A ocorrência de quebras cromossômicas em células V79, induzida pelo extrato, foi evidenciada pelo aumento na frequência de micronúcleos;
- O extrato apresentou efeito pró-oxidante em células V79, confirmado pelo aumento da peroxidação lipídica e nas atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT);
- O extrato de *E. polystachya* induziu mutação do tipo erro no quadro de leitura na linhagem TA98 em *Salmonella typhimurium* na ausência de ativação metabólica, sugerindo um possível potencial intercalante;
- A presença de duas moléculas identificadas, uma saponina e uma chalcona, podem estar contribuindo para os efeitos tóxicos do extrato.



Perspectivas

PERSPECTIVAS

Seria de importância para o seguimento do trabalho, complementação dos resultados e progresso do conhecimento a respeito dos efeitos biológicos das sementes de *E. polystachya*, propõem-se algumas abordagens experimentais:

- Proceder o fracionamento do extrato aquoso de *E. polystachya*;
- Realizar o isolamento dos compostos biologicamente ativos presentes nas sementes de *E. polystachya*;
- Utilizar as frações e os isolados em testes para avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em células de mamíferos (V79), na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e na bactéria *Salmonella typhimurium*;
- Investigar o papel do extrato bruto de sementes de *E. polystachya*, as frações e os compostos isolados na indução de apoptose em células normais e tumorais;
- Verificar os efeitos do tratamento com o extrato bruto, frações e os produtos ativos de *E. polystachya* sobre a progressão do ciclo celular e a indução de morte celular por necrose e apoptose em células normais e tumorais;
- Investigar as possíveis vias de reparação de DNA envolvidas nos danos induzidos pelo extrato bruto, frações e as moléculas isoladas de *E. polystachya*;
- Avaliar a ação antioxidante e antimutagênica o extrato bruto, frações e os produtos ativos de *E. polystachya* em células de mamífero e levedura.
- Realizar os estudos dos efeitos biológicos em extrato metanólico e também com outras partes da planta, como caule, raízes e folhas.



Referências

REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A. T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E.; TICE, R.; WATERS, M. D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. **Mutat Res**, v. 463, n. 2, p. 111-72, 2000.
- AUGUSTIN, J. M.; KUZINA, V.; ANDERSEN, S. B.; BAK, S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 72, n. 6, p. 435-57, 2011.
- AYISSI OWONA, B.; NJAYOU, N. F.; LAUFER, S.; MOUNDIPA, P. F.; SCHLUESENER, H. J. A fraction of stem bark extract of *Entada africana* suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 cells. **J Ethnopharmacol**, v. 149, n. 1, p. 162-8, 2013.
- AZQUETA, A.; ARBILLAGA, L.; LOPEZ DE CERAIN, A.; COLLINS, A. Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. **Mutagenesis**, v. 28, n. 3, p. 271-7, 2013.
- BACHRAN, C.; BACHRAN, S.; SUTHERLAND, M.; BACHRAN, D.; FUCHS, H. Saponins in tumor therapy. **Mini Rev Med Chem**, v. 8, n. 6, p. 575-84, 2008.
- BANDGAR, B. P.; GAWANDE, S. S.; BODADE, R. G.; TOTRE, J. V.; KHOBRAGADE, C. N. Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents. **Bioorg Med Chem**, v. 18, n. 3, p. 1364-70, 2010.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 679-688, 2009.
- BATOVSKA, D. I.; TODOROVA, I. T. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. **Curr Clin Pharmacol**, v. 5, n. 1, p. 1-29, 2010.
- BAUER, A.; BRONSTRUP, M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. **Nat Prod Rep**, v. 31, n. 1, p. 35-60, 2014.
- BRADLEY, M. O.; BHUYAN, B.; FRANCIS, M. C.; LANGENBACH, R.; PETERSON, A.; HUBERMAN, E. Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. **Mutat Res**, v. 87, n. 2, p. 81-142, 1981.
- BRAICU, C.; LADOMERY, M. R.; CHEDEA, V. S.; IRIMIE, A.; BERINDAN-NEAGOE, I. The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins. **Food Chem**, v. 141, n. 3, p. 3282-9, 2013.
- BUKHARI, S. N.; JASAMAI, M.; JANTAN, I. Synthesis and biological evaluation of chalcone derivatives (mini review). **Mini Rev Med Chem**, v. 12, n. 13, p. 1394-403, 2012.
- BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Nat Prod Rep**, v. 25, n. 3, p. 475-516, 2008.

- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J Ethnopharmacol**, v. 100, n. 1-2, p. 131-4, 2005.
- CHAMPELOVIER, P.; CHAUCHET, X.; HAZANE-PUCH, F.; VERGNAUD, S.; GARREL, C.; LAPORTE, F.; BOUTONNAT, J.; BOUMENDJEL, A. Cellular and molecular mechanisms activating the cell death processes by chalcones: Critical structural effects. **Toxicol In Vitro**, v. 27, n. 8, p. 2305-15, 2013.
- CHAUNG, W.; MI, L. J.; BOORSTEIN, R. J. The p53 status of Chinese hamster V79 cells frequently used for studies on DNA damage and DNA repair. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 5, p. 992-4, 1997.
- CHEUNG-ONG, K.; GIAEVER, G.; NISLOW, C. DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. **Chem Biol**, v. 20, n. 5, p. 648-59, 2013.
- CHOW, J.; POON, R. Y. DNA damage and polyploidization. **Adv Exp Med Biol**, v. 676, p. 57-71, 2010.
- CHUN, J.; HAN, L.; XU, M. Y.; WANG, B.; CHENG, M. S.; KIM, Y. S. The induction of apoptosis by a newly synthesized diosgenyl saponin through the suppression of estrogen receptor-alpha in MCF-7 human breast cancer cells. **Arch Pharm Res**, 2013.
- CIOFFI, G.; DAL PIAZ, F.; DE CAPRARIIS, P.; SANOGO, R.; MARZOCCO, S.; AUTORE, G.; DE TOMMASI, N. Antiproliferative triterpene saponins from *Entada africana*. **J Nat Prod**, v. 69, n. 9, p. 1323-9, 2006.
- COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Mol Biotechnol**, v. 26, n. 3, p. 249-61, 2004.
- COLLINS, A. R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. **Mutat Res**, v. 681, n. 1, p. 24-32, 2009.
- COLLINS, A. R.; AZQUETA, A. DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. **Mutat Res**, v. 736, n. 1-2, p. 122-9, 2012.
- COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVAO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-51, 2008.
- CONSTANTINOU, A.; MEHTA, R.; RUNYAN, C.; RAO, K.; VAUGHAN, A.; MOON, R. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. **J Nat Prod**, v. 58, n. 2, p. 217-25, 1995.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-95, 2013.
- CZECZOT, H.; RAHDEN-STARON, I.; OLESZEK, W.; JURZYSTA, M. Lack of mutagenic activity of saponins in the Ames test. **Acta Biochim Pol**, v. 40, n. 1, p. 74-6, 1993.

- DA SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. Polystachyasaponin with Adjuvant Activity from *Entada polystachya*. **Zeitschrift Fur Naturforschung Section B-A Journal Of Chemical Sciences**, v. 65, n. 5, p. 7, 2010.
- DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Curr Opin Biotechnol**, v. 23, n. 2, p. 174-81, 2012.
- DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 941-50, 2007.
- DE ZIO, D.; CIANFANELLI, V.; CECCONI, F. New insights into the link between DNA damage and apoptosis. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n. 6, p. 559-71, 2013.
- DEGRANDI, T. H.; DE OLIVEIRA, I. M.; D'ALMEIDA, G. S.; GARCIA, C. R.; VILLELA, I. V.; GUECHEVA, T. N.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. **Mutagenesis**, v. 25, n. 3, p. 257-69, 2010.
- DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 15, n. 4, p. 316-28, 2005.
- DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biol Toxicol**, v. 25, n. 1, p. 5-32, 2009.
- DIALLO, D.; PAULSEN, B. S.; LILJEBACK, T. H.; MICHAELSEN, T. E. Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. **J Ethnopharmacol**, v. 74, n. 2, p. 159-71, 2001.
- DIAMOND, B. J.; BAILEY, M. R. Ginkgo biloba: indications, mechanisms, and safety. **Psychiatr Clin North Am**, v. 36, n. 1, p. 73-83, 2013.
- DIAS, T. A.; DUARTE, C. L.; LIMA, C. F.; PROENCA, M. F.; PEREIRA-WILSON, C. Superior anticancer activity of halogenated chalcones and flavonols over the natural flavonol quercetin. **Eur J Med Chem**, v. 65, p. 500-10, 2013.
- DINDA, B.; DEBNATH, S.; MOHANTA, B. C.; HARIGAYA, Y. Naturally occurring triterpenoid saponins. **Chem Biodivers**, v. 7, n. 10, p. 2327-580, 2010.
- DIZDAROGLU, M. Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. **Cancer Lett**, v. 327, n. 1-2, p. 26-47, 2012.
- DOEHMER, J. V79 Chinese hamster cells genetically engineered for cytochrome P450 and their use in mutagenicity and metabolism studies. **Toxicology**, v. 82, n. 1-3, p. 105-18, 1993.
- DOEHMER, J. The use and value of in vitro technologies in metabolism studies. **Altern Lab Anim**, v. 37 Suppl 1, p. 29-32, 2009.
- DONG, Y.; SHI, H.; YANG, H.; PENG, Y.; WANG, M.; LI, X. Antioxidant phenolic compounds from the stems of *Entada phaseoloides*. **Chem Biodivers**, v. 9, n. 1, p. 68-79, 2012.

- DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Prog Lipid Res**, v. 43, n. 3, p. 200-27, 2004.
- EFFERTH, T. Cancer therapy with natural products and medicinal plants. **Planta Med**, v. 76, n. 11, p. 1035-6, 2010.
- ERDMAN, J. W., JR.; BALENTINE, D.; ARAB, L.; BEECHER, G.; DWYER, J. T.; FOLTS, J.; HARNLY, J.; HOLLMAN, P.; KEEN, C. L.; MAZZA, G.; MESSINA, M.; SCALBERT, A.; VITA, J.; WILLIAMSON, G.; BURROWES, J. Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. **J Nutr**, v. 137, n. 3 Suppl 1, p. 718S-737S, 2007.
- ERSSON, C.; MOLLER, P.; FORCHHAMMER, L.; LOFT, S.; AZQUETA, A.; GODSCHALK, R. W.; VAN SCHOOTEN, F. J.; JONES, G. D.; HIGGINS, J. A.; COOKE, M. S.; MISTRY, V.; KARBASCHI, M.; PHILLIPS, D. H.; SOZERI, O.; ROUTLEDGE, M. N.; NELSON-SMITH, K.; RISO, P.; PORRINI, M.; MATULLO, G.; ALLIONE, A.; STEPNIK, M.; FERLINSKA, M.; TEIXEIRA, J. P.; COSTA, S.; CORCUERA, L. A.; LOPEZ DE CERAIN, A.; LAFFON, B.; VALDIGLESIAS, V.; COLLINS, A. R.; MOLLER, L. An ECVAG inter-laboratory validation study of the comet assay: inter-laboratory and intra-laboratory variations of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in human mononuclear cells. **Mutagenesis**, v. 28, n. 3, p. 279-86, 2013.
- ESCOBAR, P. A.; KEMPER, R. A.; TARCA, J.; NICOLETTE, J.; KENYON, M.; GLOWIENKE, S.; SAWANT, S. G.; CHRISTENSEN, J.; JOHNSON, T. E.; MCKNIGHT, C.; WARD, G.; GALLOWAY, S. M.; CUSTER, L.; GOCKE, E.; O'DONOVAN, M. R.; BRAUN, K.; SNYDER, R. D.; MAHADEVAN, B. Bacterial mutagenicity screening in the pharmaceutical industry. **Mutat Res**, v. 752, n. 2, p. 99-118, 2013.
- EZENYI, I. C.; RANARIVELO, L.; OLUWAKANYINSOLA, S. A.; EMEJE, M. Analgesic, anti-inflammatory, and heme biomineralization inhibitory properties of *Entada africana* ethanol leaf extract with antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum*. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, p. 1-7, 2013.
- FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D. D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bull World Health Organ**, v. 63, n. 6, p. 965-81, 1985.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutat Res**, v. 600, n. 1-2, p. 58-66, 2006.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat Protoc**, v. 2, n. 5, p. 1084-104, 2007.
- FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the

- cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v. 14, n. 6, p. 605-12, 1999.
- FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLES, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-32, 2011.
- FERGUSON, L. R.; DENNY, W. A. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. **Mutat Res**, v. 623, n. 1-2, p. 14-23, 2007.
- FILIPCZAK, P. T.; PIGLOWSKI, W.; GLOWALA-KOSINSKA, M.; KRAWCZYK, Z.; SCIEGLINSKA, D. HSPA2 overexpression protects V79 fibroblasts against bortezomib-induced apoptosis. **Biochem Cell Biol**, v. 90, n. 2, p. 224-31, 2012.
- FORTINI, P.; PASCUCCI, B.; PARLANTI, E.; D'ERRICO, M.; SIMONELLI, V.; DOGLIOTTI, E. 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. **Mutat Res**, v. 531, n. 1-2, p. 127-39, 2003.
- FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H. P.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **Br J Nutr**, v. 88, n. 6, p. 587-605, 2002.
- FREIBURGHHAUS, F.; STECK, A.; PFANDER, H.; BRUN, R. Bioassay-guided isolation of a diastereoisomer of kolavenol from *Entada abyssinica* active on *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **J Ethnopharmacol**, v. 61, n. 3, p. 179-83, 1998.
- FRIDOVICH, I. The trail to superoxide dismutase. **Protein Sci**, v. 7, n. 12, p. 2688-90, 1998.
- GATEHOUSE, D. Critical features of bacterial mutation assays. **Mutagenesis**, v. 2, n. 5, p. 397-409, 1987.
- GHOSH, R.; GIRIGOSWAMI, K.; DIPANJAN, G. Suppression of apoptosis leads to cisplatin resistance in V79 cells subjected to chronic oxidative stress. **Indian J Biochem Biophys**, v. 49, n. 5, p. 363-70, 2012.
- GONZALEZ, R.; BALLESTER, I.; LOPEZ-POSADAS, R.; SUAREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTINEZ-AUGUSTIN, O.; SANCHEZ DE MEDINA, F. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 51, n. 4, p. 331-62, 2011.
- GROSICKA-MACIAG, E.; KURPIOS-PIEC, D.; SZUMILO, M.; GRZELA, T.; RAHDEN-STARON, I. Protective effect of N-acetyl-L-cysteine against maneb induced oxidative and apoptotic injury in Chinese hamster V79 cells. **Food Chem Toxicol**, v. 49, n. 4, p. 1020-5, 2011.
- GUCLU-USTUNDAG, O.; MAZZA, G. Saponins: properties, applications and processing. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 47, n. 3, p. 231-58, 2007.
- GUECHEVA, T.; HENRIQUES, J. A.; ERDTMANN, B. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). **Mutat Res**, v. 497, n. 1-2, p. 19-27, 2001.

- HADI, S. M.; BHAT, S. H.; AZMI, A. S.; HANIF, S.; SHAMIM, U.; ULLAH, M. F. Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties. **Semin Cancer Biol**, v. 17, n. 5, p. 370-6, 2007.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
- HANESSIAN, S. Structure-based organic synthesis of drug prototypes: a personal odyssey. **ChemMedChem**, v. 1, n. 12, p. 1301-30, 2006.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008.
- HATOK, J.; BABUSIKOVA, E.; MATAKOVA, T.; MISTUNA, D.; DOBROTA, D.; RACAY, P. In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. **Clin Exp Med**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2009.
- HEIJINK, A. M.; KRAJEWSKA, M.; VAN VUGT, M. A. The DNA damage response during mitosis. **Mutat Res**, v. 750, n. 1-2, p. 45-55, 2013.
- HO, T. V.; SCHARER, O. D. Translesion DNA synthesis polymerases in DNA interstrand crosslink repair. **Environ Mol Mutagen**, v. 51, n. 6, p. 552-66, 2010.
- HUBSCHER, U.; MAGA, G. DNA replication and repair bypass machines. **Curr Opin Chem Biol**, v. 15, n. 5, p. 627-35, 2011.
- HUEN, M. S.; CHEN, J. Assembly of checkpoint and repair machineries at DNA damage sites. **Trends Biochem Sci**, v. 35, n. 2, p. 101-8, 2010.
- HWANG, E. S.; KIM, G. H. Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research. **Toxicology**, v. 229, n. 1-2, p. 1-10, 2007.
- IDE, H.; SHOULKAMY, M. I.; NAKANO, T.; MIYAMOTO-MATSUBARA, M.; SALEM, A. M. Repair and biochemical effects of DNA-protein crosslinks. **Mutat Res**, v. 711, n. 1-2, p. 113-22, 2011.
- IMLAY, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. **Nat Rev Microbiol**, v. 11, n. 7, p. 443-54, 2013.
- IWAMOTO, Y.; SUGIMOTO, S.; HARINANTENAINA, L.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H. Entadosides A-D, triterpene saponins and a glucoside of the sulphur-containing amide from the kernel nuts of *Entada phaseoloides* (L.) Merrill. **J Nat Med**, v. 66, n. 2, p. 321-8, 2012.
- JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071-8, 2009.
- JI, Y.; JI, C.; YUE, L.; XU, H. Saponins isolated from *Asparagus* induce apoptosis in human hepatoma cell line HepG2 through a mitochondrial-mediated pathway. **Curr Oncol**, v. 19, n. Suppl 2, p. eS1-9, 2012.
- JONES, R. M.; PETERMANN, E. Replication fork dynamics and the DNA damage response. **Biochem J**, v. 443, n. 1, p. 13-26, 2012.

- JONES, W. P.; KINGHORN, A. D. Extraction of plant secondary metabolites. **Methods Mol Biol**, v. 864, p. 341-66, 2012.
- KAWAGUCHI, S.; NAKAMURA, T.; YAMAMOTO, A.; HONDA, G.; SASAKI, Y. F. Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity? **J Nucleic Acids**, v. 2010, p. 541050, 2010.
- KHAN, G. S.; SHAH, A.; ZIA UR, R.; BARKER, D. Chemistry of DNA minor groove binding agents. **J Photochem Photobiol B**, v. 115, p. 105-18, 2012.
- KHOBTA, A.; EPE, B. Interactions between DNA damage, repair, and transcription. **Mutat Res**, v. 736, n. 1-2, p. 5-14, 2012.
- KIRST, H. A. Developing new antibacterials through natural product research. **Expert Opin Drug Discov**, v. 8, n. 5, p. 479-93, 2013.
- KLIEBENSTEIN, D. J. Making new molecules--evolution of structures for novel metabolites in plants. **Curr Opin Plant Biol**, v. 16, n. 1, p. 112-7, 2013.
- KONTOGIORGIS, C.; MANTZANIDOU, M.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Chalcones and their potential role in inflammation. **Mini Rev Med Chem**, v. 8, n. 12, p. 1224-42, 2008.
- KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 162750, 2013.
- LEMOS, A. O.; OLIVEIRA, N. C.; LEMOS, C. T. In vitro micronuclei tests to evaluate the genotoxicity of surface water under the influence of tanneries. **Toxicol In Vitro**, v. 25, n. 4, p. 761-6, 2011.
- LEVIN, D. E.; HOLLSTEIN, M.; CHRISTMAN, M. F.; SCHWIERS, E. A.; AMES, B. N. A new Salmonella tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 79, n. 23, p. 7445-9, 1982.
- LI, K.; XING, S.; WANG, M.; PENG, Y.; DONG, Y.; LI, X. Anticomplement and antimicrobial activities of flavonoids from *Entada phaseoloides*. **Nat Prod Commun**, v. 7, n. 7, p. 867-71, 2012.
- LIM, P.; WUENSCHHELL, G. E.; HOLLAND, V.; LEE, D. H.; PFEIFER, G. P.; RODRIGUEZ, H.; TERMINI, J. Peroxyl radical mediated oxidative DNA base damage: implications for lipid peroxidation induced mutagenesis. **Biochemistry**, v. 43, n. 49, p. 15339-48, 2004.
- LIU, W.; DI GIORGIO, C.; LAMIDI, M.; ELIAS, R.; OLLIVIER, E.; DE MEO, M. P. Genotoxic and clastogenic activity of saponins extracted from *Nauclea* bark as assessed by the micronucleus and the comet assays in Chinese Hamster Ovary cells. **J Ethnopharmacol**, v. 137, n. 1, p. 176-83, 2011.
- LIU, W.; KUGELMAN, M.; WILSON, R.; RAO, K. Crystalline saponin with antitumor activity from *Entada phaseoloides*. **Phytochemistry**, v. 11, n. 1, p. 4, 1972.
- LIVNEH, Z.; ZIV, O.; SHACHAR, S. Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis. **Cell Cycle**, v. 9, n. 4, p. 729-35, 2010.

- LOPES, I. L.; JARDIM, M. A.; MEDEIROS, T. D. Germinação de sementes e desenvolvimento morfológico de plantas oleaginosas: 2. Entada polystachya (L.) DC. (Mimosaceae). **Rev. Bras. Farm.**, v. 88, n. 4, p. 3, 2007.
- LU, M. F.; XIAO, Z. T.; ZHANG, H. Y. Where do health benefits of flavonoids come from? Insights from flavonoid targets and their evolutionary history. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 434, n. 4, p. 701-4, 2013.
- LUCZAJ, W.; SKRZYDLEWSKA, E. DNA damage caused by lipid peroxidation products. **Cell Mol Biol Lett**, v. 8, n. 2, p. 391-413, 2003.
- MA, S.; KOU, J.; YU, B. Safety evaluation of steroidal saponin DT-13 isolated from the tuber of *Liriope muscari* (Decne.) Baily. **Food Chem Toxicol**, v. 49, n. 9, p. 2243-51, 2011.
- MAGASSOUBA, F. B.; DIALLO, A.; KOUYATE, M.; MARA, F.; MARA, O.; BANGOURA, O.; CAMARA, A.; TRAORE, S.; DIALLO, A. K.; ZAORO, M.; LAMAH, K.; DIALLO, S.; CAMARA, G.; TRAORE, S.; KEITA, A.; CAMARA, M. K.; BARRY, R.; KEITA, S.; OULARE, K.; BARRY, M. S.; DONZO, M.; CAMARA, K.; TOTE, K.; BERGHE, D. V.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J.; BALDE, A. M. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. **J Ethnopharmacol**, v. 114, n. 1, p. 44-53, 2007.
- MARNETT, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutat Res**, v. 424, n. 1-2, p. 83-95, 1999.
- MARNETT, L. J.; PLASTARAS, J. P. Endogenous DNA damage and mutation. **Trends Genet**, v. 17, n. 4, p. 214-21, 2001.
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutat Res**, v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.
- MEDEMA, R. H.; MACUREK, L. Checkpoint control and cancer. **Oncogene**, v. 31, n. 21, p. 2601-13, 2012.
- MIRZAYANS, R.; ANDRAIS, B.; SCOTT, A.; MURRAY, D. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 170325, 2012.
- MO, S.; XIONG, H.; SHU, G.; YANG, X.; WANG, J.; ZHENG, C.; XIONG, W.; MEI, Z. Phaseoloideside E, a novel natural triterpenoid saponin identified from *Entada phaseoloides*, induces apoptosis in Ec-109 esophageal cancer cells through reactive oxygen species generation. **J Pharmacol Sci**, v. 122, n. 3, p. 163-75, 2013.
- MOLINARI, G. Natural products in drug discovery: present status and perspectives. **Adv Exp Med Biol**, v. 655, p. 13-27, 2009.
- MORITA, T.; MACGREGOR, J. T.; HAYASHI, M. Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 223-30, 2011.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutat Res**, v. 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000.

- MUKHERJEE, A.; SASIKALA, W. D. Drug-DNA Intercalation: From Discovery to the Molecular Mechanism. **Adv Protein Chem Struct Biol**, v. 92, p. 1-62, 2013.
- MULLER, P. A.; VOUSDEN, K. H. p53 mutations in cancer. **Nat Cell Biol**, v. 15, n. 1, p. 2-8, 2013.
- NGO, L. T.; OKOGUN, J. I.; FOLK, W. R. 21st century natural product research and drug development and traditional medicines. **Nat Prod Rep**, v. 30, n. 4, p. 584-92, 2013.
- NIEDERNHOFER, L. J.; DANIELS, J. S.; ROUZER, C. A.; GREENE, R. E.; MARNETT, L. J. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. **J Biol Chem**, v. 278, n. 33, p. 31426-33, 2003.
- NITISS, J. L. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 5, p. 327-37, 2009.
- NOWSHEEN, S.; YANG, E. S. The intersection between DNA damage response and cell death pathways. **Exp Oncol**, v. 34, n. 3, p. 243-54, 2012.
- NYASSE, B.; NGANTCHOU, I.; TCHANA, E. M.; SONKE, B.; DENIER, C.; FONTAINE, C. Inhibition of both *Trypanosoma brucei* bloodstream form and related glycolytic enzymes by a new kolavic acid derivative isolated from *Entada abyssinica*. **Pharmazie**, v. 59, n. 11, p. 873-5, 2004.
- NZOWA, L. K.; BARBONI, L.; TEPONNO, R. B.; RICCIUTELLI, M.; LUPIDI, G.; QUASSINTI, L.; BRAMUCCI, M.; TAPONDJOU, L. A. Rheediinosides A and B, two antiproliferative and antioxidant triterpene saponins from *Entada rheedii*. **Phytochemistry**, v. 71, n. 2-3, p. 254-61, 2010.
- NZOWA, L. K.; TEPONNO, R. B.; TAPONDJOU, L. A.; VEROTTA, L.; LIAO, Z.; GRAHAM, D.; ZINK, M. C.; BARBONI, L. Two new tryptophan derivatives from the seed kernels of *Entada rheedii*: effects on cell viability and HIV infectivity. **Fitoterapia**, v. 87, p. 37-42, 2013.
- ODA, T. Effects of 2'-demethoxy-2'-propoxygriseofulvin on microtubule distribution in Chinese hamster V79 cells. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 59, n. 2, p. 114-6, 2006.
- OLAJIDE, O. A.; ALADA, A. R. Studies on the anti-inflammatory properties of *Entada abyssinica*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 5, p. 492-6, 2001.
- OLIVE, P. L.; BANATH, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nat Protoc**, v. 1, n. 1, p. 23-9, 2006.
- OSBOURN, A.; GOSS, R. J.; FIELD, R. A. The saponins: polar isoprenoids with important and diverse biological activities. **Nat Prod Rep**, v. 28, n. 7, p. 1261-8, 2011.
- OWONA, B. A.; NJAYOU, N. F.; LAUFER, S. A.; SCHLUESENER, H. J.; MOUNDIPA, P. F. *Entada africana* fraction CH(2)Cl(2)/MEOH 5% inhibits inducible nitric oxide synthase and pro-inflammatory cytokines gene expression induced by lipopolysaccharide in microglia. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, p. 254, 2013.

- PAN, L.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Discovery of new anticancer agents from higher plants. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 4, p. 142-56, 2012.
- PARENT-MASSIN, D. Relevance of clonogenic assays in hematotoxicology. **Cell Biol Toxicol**, v. 17, n. 2, p. 87-94, 2001.
- PASTWA, E.; BLASIAK, J. Non-homologous DNA end joining. **Acta Biochim Pol**, v. 50, n. 4, p. 891-908, 2003.
- PATRA, B.; SCHLUTTENHOFER, C.; WU, Y.; PATTANAIK, S.; YUAN, L. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. **Biochim Biophys Acta**, v. 1829, n. 11, p. 1236-47, 2013.
- POMMIER, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 10, p. 789-802, 2006.
- POURCEL, L.; ROUTABOUL, J. M.; CHEYNIER, V.; LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. **Trends Plant Sci**, v. 12, n. 1, p. 29-36, 2007.
- PROCHAZKOVA, D.; BOUSOVA, I.; WILHELMOVA, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513-23, 2011.
- QUINONES, M.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. **Pharmacol Res**, v. 68, n. 1, p. 125-31, 2013.
- RESENDE, F. A.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A. Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (Ames) test. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 5255-68, 2012.
- ROCHA, C. R.; LERNER, L. K.; OKAMOTO, O. K.; MARCHETTO, M. C.; MENCK, C. F. The role of DNA repair in the pluripotency and differentiation of human stem cells. **Mutat Res**, v. 752, n. 1, p. 25-35, 2013.
- ROMAGNOLO, D. F.; SELMIN, O. I. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. **J Nutr Gerontol Geriatr**, v. 31, n. 3, p. 206-38, 2012.
- ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends Mol Med**, v. 12, n. 9, p. 440-50, 2006.
- ROSA, R. M.; DO NASCIMENTO PICADA, J.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. Cytotoxic, genotoxic, and mutagenic effects of diphenyl diselenide in Chinese hamster lung fibroblasts. **Mutat Res**, v. 628, n. 2, p. 87-98, 2007.
- ROSA, R. M.; HOCH, N. C.; FURTADO, G. V.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide. **Mutat Res**, v. 633, n. 1, p. 35-45, 2007.
- SABZEVARI, O.; GALATI, G.; MORIDANI, M. Y.; SIRAKI, A.; O'BRIEN, P. J. Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydroxychalcones. **Chem Biol Interact**, v. 148, n. 1-2, p. 57-67, 2004.
- SAHU, N. K.; BALBHADRA, S. S.; CHOUDHARY, J.; KOHLI, D. V. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: a review. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 2, p. 209-25, 2012.

- SAHU, N. P.; BANERJEE, S.; MONDAL, N. B.; MANDAL, D. Steroidal saponins. **Fortschr Chem Org Naturst**, v. 89, p. 45-141, 2008.
- SALE, J. E. Translesion DNA synthesis and mutagenesis in eukaryotes. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 3, p. a012708, 2013.
- SAMANTA, S.; DEY, P. Micronucleus and its applications. **Diagn Cytopathol**, v. 40, n. 1, p. 84-90, 2012.
- SANOGO, R.; GERMANO, M. P.; D'ANGELO, V.; GUGLIEMO, M.; DE PASQUALE, R. Antihepatotoxic properties of *Entada africana* (Mimosaceae). **Phytotherapy Research**, v. 12, p. S157-S159, 1998.
- SATHEESHKUMAR, N.; NISHA, N.; SONALI, N.; NIRMAL, J.; JAIN, G. K.; SPANDANA, V. Analytical profiling of bioactive constituents from herbal products, using metabolomics--a review. **Nat Prod Commun**, v. 7, n. 8, p. 1111-5, 2012.
- SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiol**, v. 7, n. 8, p. 979-90, 2012.
- SAWLE, P.; MOULTON, B. E.; JARZYKOWSKA, M.; GREEN, C. J.; FORESTI, R.; FAIRLAMB, I. J.; MOTTERLINI, R. Structure-activity relationships of methoxychalcones as inducers of heme oxygenase-1. **Chem Res Toxicol**, v. 21, n. 7, p. 1484-94, 2008.
- SCHNEIDER, C. An update on products and mechanisms of lipid peroxidation. **Mol Nutr Food Res**, v. 53, n. 3, p. 315-21, 2009.
- SHIN, J. S.; KANG, K. A.; KIM, E. S.; ZHANG, R.; PIAO, M. J.; KO, D. O.; WANG, Z. H.; MAENG, Y. H.; EUN, S. Y.; CHAE, S.; CHUNG, H. S.; HYUN, J. W. Cytoprotective activity of annphenone against oxidative stress-induced apoptosis in V79-4 lung fibroblast cells. **Cell Biol Int**, v. 32, n. 9, p. 1099-107, 2008.
- SIDDHURAJU, P.; BECKER, K.; MAKKAR, H. Chemical composition, protein fractionation, essential amino acid potential and antimetabolic constituents of an unconventional legume, gila bean (*Entada phaseoloides* Merrill) seed kernel. **J Sci Food Agric**, v. 82, n. 2, p. 10, 2002.
- SILVA, M. F.; SOUZA, L. A. G. Levantamento das Leguminosas do arquipélago das Anavilhanas, baixo rio Negro, Amazonas. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi**, v. 18, n. 1, p. 3-35, 2002.
- SNYDER, R. D.; ARNONE, M. R. Putative identification of functional interactions between DNA intercalating agents and topoisomerase II using the V79 in vitro micronucleus assay. **Mutat Res**, v. 503, n. 1-2, p. 21-35, 2002.
- SOLOMON, V. R.; LEE, H. Anti-breast cancer activity of heteroaryl chalcone derivatives. **Biomed Pharmacother**, v. 66, n. 3, p. 213-20, 2012.
- SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **J Ethnopharmacol**, v. 94, n. 2-3, p. 219-43, 2004.
- SPERKA, T.; WANG, J.; RUDOLPH, K. L. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 9, p. 579-90, 2012.

- STEFANISINOVA, M.; TOMECKOVA, V.; KOZURKOVA, M.; OSTRO, A.; MAREKOVA, M. Study of DNA interactions with cyclic chalcone derivatives by spectroscopic techniques. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 81, n. 1, p. 666-71, 2011.
- STEWART, F. A.; DORR, W. Milestones in normal tissue radiation biology over the past 50 years: from clonogenic cell survival to cytokine networks and back to stem cell recovery. **Int J Radiat Biol**, v. 85, n. 7, p. 574-86, 2009.
- STONE, M. P.; HUANG, H.; BROWN, K. L.; SHANMUGAM, G. Chemistry and structural biology of DNA damage and biological consequences. **Chem Biodivers**, v. 8, n. 9, p. 1571-615, 2011.
- SUGIMOTO, S.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H. Medicinal plants of Thailand. I structures of rheedeiosides A-D and cis-entadamide A beta-D-glucopyranoside from the seed kernels of *Entada rheedei*. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 59, n. 4, p. 466-71, 2011.
- SUGIMOTO, S.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H. Medicinal plants of Thailand. II: chemical studies on the seed kernels of *Entada rheedei* Sprengel. **J Nat Med**, v. 66, n. 3, p. 552-7, 2012.
- SUMANTRAN, V. N. Cellular chemosensitivity assays: an overview. **Methods Mol Biol**, v. 731, p. 219-36, 2011.
- SVILAR, D.; GOELLNER, E. M.; ALMEIDA, K. H.; SOBOL, R. W. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. **Antioxid Redox Signal**, v. 14, n. 12, p. 2491-507, 2011.
- TANGNEY, C. C.; RASMUSSEN, H. E. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. **Curr Atheroscler Rep**, v. 15, n. 5, p. 324, 2013.
- TAPONDJOU, A. L.; MIYAMOTO, T.; MIRJOLET, J. F.; GUILBAUD, N.; LACAILLE-DUBOIS, M. A. Pursaethosides A-E, triterpene saponins from *Entada pursaetha*. **J Nat Prod**, v. 68, n. 8, p. 1185-90, 2005.
- TEKE, G. N.; LUNGA, P. K.; WABO, H. K.; KUIATE, J. R.; VILAREM, G.; GIACINTI, G.; KIKUCHI, H.; OSHIMA, Y. Antimicrobial and antioxidant properties of methanol extract, fractions and compounds from the stem bark of *Entada abyssinica* Steud ex A. Satabie. **BMC Complement Altern Med**, v. 11, p. 57, 2011.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, n. 3, p. 206-21, 2000.
- TILMANT, K.; GERETS, H. H.; DE RON, P.; COSSU-LEGUILLE, C.; VASSEUR, P.; DHALLUIN, S.; ATIENZAR, F. A. The automated micronucleus assay for early assessment of genotoxicity in drug discovery. **Mutat Res**, v. 751, n. 1, p. 1-11, 2013.
- TRAN, T. D.; NGUYEN, T. T.; DO, T. H.; HUYNH, T. N.; TRAN, C. D.; THAI, K. M. Synthesis and antibacterial activity of some heterocyclic chalcone analogues alone and in combination with antibiotics. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6684-96, 2012.

- VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods Mol Biol**, v. 731, p. 237-45, 2011.
- VAN VUGT, M. A.; YAFFE, M. B. Cell cycle re-entry mechanisms after DNA damage checkpoints: giving it some gas to shut off the breaks! **Cell Cycle**, v. 9, n. 11, p. 2097-101, 2010.
- VEITCH, N. C. Isoflavonoids of the leguminosae. **Nat Prod Rep**, v. 30, n. 7, p. 988-1027, 2013.
- VESSECCHI, R.; ZOCCOLO, G. J.; GOUVEA, D. R.; HUBNER, F.; CRAMER, B.; DE MARCHI, M. R.; HUMPF, H. U.; LOPES, N. P. Re-examination of the anion derivatives of isoflavones by radical fragmentation in negative electrospray ionization tandem mass spectrometry: experimental and computational studies. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 25, n. 14, p. 2020-6, 2011.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 337-362, 2011.
- VILLELA, I. V.; DE OLIVEIRA, I. M.; DA SILVA, J.; HENRIQUES, J. A. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutat Res**, v. 605, n. 1-2, p. 78-86, 2006.
- VILLELA, I. V.; DE OLIVEIRA, I. M.; SILVEIRA, J. C.; DIAS, J. F.; HENRIQUES, J. A.; DA SILVA, J. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. **Mutat Res**, v. 628, n. 2, p. 76-86, 2007.
- VINCKEN, J. P.; HENG, L.; DE GROOT, A.; GRUPPEN, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. **Phytochemistry**, v. 68, n. 3, p. 275-97, 2007.
- VOULGARIDOU, G. P.; ANESTOPOULOS, I.; FRANCO, R.; PANAYIOTIDIS, M. I.; PAPPA, A. DNA damage induced by endogenous aldehydes: current state of knowledge. **Mutat Res**, v. 711, n. 1-2, p. 13-27, 2011.
- WANG, Y.; TANG, Q.; JIANG, S.; LI, M.; WANG, X. Anti-colorectal cancer activity of macrostemonoside A mediated by reactive oxygen species. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 441, n. 4, p. 825-30, 2013.
- WINCZURA, A.; ZDZALIK, D.; TUDEK, B. Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability. **Free Radic Res**, v. 46, n. 4, p. 442-59, 2012.
- WINK, M. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 12771-91, 2012.
- WOODS, D.; TURCHI, J. J. Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways. **Cancer Biol Ther**, v. 14, n. 5, p. 379-89, 2013.
- YANG, C. Q.; FANG, X.; WU, X. M.; MAO, Y. B.; WANG, L. J.; CHEN, X. Y. Transcriptional regulation of plant secondary metabolism. **J Integr Plant Biol**, v. 54, n. 10, p. 703-12, 2012.

- YASURAOKA, K.; IRIE, Y.; TAKAMURA, K.; SHIMOMURA, H.; HASHIGUCHI, J.; SANTOS, M. J.; SANTOS, A. T., JR. Laboratory and field assessment of the molluscicidal activity of gogo (*Entada phaseoloides*) against the amphibious snail intermediate host of *Schistosoma japonicum*. **Jpn J Exp Med**, v. 47, n. 6, p. 483-7, 1977.
- YOO, K. M.; HWANG, I. K.; PARK, J. H.; MOON, B. Major phytochemical composition of 3 native Korean citrus varieties and bioactive activity on V79-4 cells induced by oxidative stress. **J Food Sci**, v. 74, n. 6, p. C462-8, 2009.
- YOSHIKI, Y.; KUDOU, S.; OKUBO, K. Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 62, n. 12, p. 2291-9, 1998.
- YOUN, U. J.; NAM, K. W.; KIM, H. S.; CHOI, G.; JEONG, W. S.; LEE, M. Y.; CHAE, S. 3-Deoxysappanchalcone inhibits tumor necrosis factor- α -induced matrix metalloproteinase-9 expression in human keratinocytes through activated protein-1 inhibition and nuclear factor- κ B DNA binding activity. **Biol Pharm Bull**, v. 34, n. 6, p. 890-3, 2011.
- ZHAO, Z. X.; JIN, J.; LIN, C. Z.; ZHU, C. C.; LIU, Y. M.; LIN, A. H.; LIU, Y. X.; ZHANG, L.; LUO, H. F. Two new chalcone glycosides from the stems of *Entada phaseoloides*. **Fitoterapia**, v. 82, n. 7, p. 1102-5, 2011.
- ZHENG, T.; SHU, G.; YANG, Z.; MO, S.; ZHAO, Y.; MEI, Z. Antidiabetic effect of total saponins from *Entada phaseoloides* (L.) Merr. in type 2 diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v. 139, n. 3, p. 814-21, 2012.



Curriculum Vitae



Juliane Cristina Bugs de Carvalho

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6420426454353097>
Última atualização do currículo em 06/02/2014

Possui graduação em Biomedicina pela Universidade Luterana do Brasil (2009), com habilitação em Análises Clínicas e Imagenologia. Especialista em Biomedicina Estética pela Universidade Gama Filho. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome Juliane Cristina Bugs de Carvalho
Nome em citações bibliográficas CARVALHO, J. C. B.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2011 Mestrado em andamento em Biologia Celular e Molecular (Conceito CAPES 6).
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
Título: Caracterização da Genotoxicidade de Extratos de Sementes de Plantas da Amazônia e do Rio Grande do Sul: Prospecção de Novos Compostos com Efeitos Biológicos., Orientador: João Antonio Pêgas Henriques.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2012 - 2013 Especialização em Estética. (Carga Horária: 360h).
Universidade Gama Filho, UGF, Brasil.
Título: Radiofrequência no Envelhecimento Cutâneo.
Orientador: Mônica Descalzo Kuplick.

2006 - 2009 Graduação em Biomedicina.
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.
Título: Impacto da Tuberculose Resistente na Saúde Pública.
Orientador: Márcia Susana Nunes Silva.
Bolsista do(a): Universidade para Todos.

Atuação Profissional

SIDI Medicina por Imagem, SIDI, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - 2011 Vínculo: Celetista formal, Enquadramento Funcional: Biomédica, Carga horária: 36

Outras informações Trabalho com Ressonância Magnética.

Áreas de atuação

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. Papel do Profissional Biomédico na Ressonância Magnética, Metodologia e Aplicação de Imagens.Papel do Profissional Biomédico na Ressonância Magnética, Metodologia e Aplicação de Imagens. 2011. (Seminário).
2. Papel do Profissional Biomédico na Ressonância Magnética.Papel do Profissional Biomédico na Ressonância Magnética. 2011. (Outra).
3. Curso de Análise Genética da Investigação de Paternidade. 2009. (Seminário).
4. II Simpósio de Tecnologia em Radiologia da Faculdade de tecnologia Saint Pastous. 2009. (Seminário).
5. Semana Acadêmica do Curso de Biomedicina ULBRA. 2007. (Seminário).
6. Curso de Coleta de Sangue à Vácuo. 2007. (Outra).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 27/02/2014 às 5:00:55