



ESTUDO DO POTENCIAL ANTIMUTAGÊNICO DA RUTINA E DO ÁCIDO ROSMARÍNICO SOBRE OS DANOS INDUZIDOS PELO ETIL-METANOSSULFONATO ATRAVÉS DO TESTE SMART – RESULTADOS PARCIAIS

Taiah Rajeh Rosin¹
Renata Schüttz Lemos²
Rodrigo Antonio de Campos²
Juliana Bittencourt Laranjeira¹
Luciano André Assunção Barros³
Mariana do Amaral Flores⁴
Rafael Rodrigues Dihl⁵
Mauricio Lehmann⁶

Resumo: Os compostos fenólicos possuem amplas ações biológicas envolvendo não apenas o papel nutricional, mas também ações terapêuticas. Entres estes encontram-se a rutina (RT) e o ácido rosmarínico (AR). O objetivo do estudo foi avaliar a atividade antimutagênica da RT e do AR sobre os danos genéticos induzidos pelo etil-metanossulfonato (EMS). Para tanto foi utilizado o teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster* nos protocolos de cotratamento e pós-tratamento, nas concentrações de 25; 50 e 100 mg/mL para ambos os compostos, enquanto o EMS foi administrado em duas concentrações, 5 mM no cotratamento e 46 mM no pós-tratamento. Os resultados mostram que a RT, no protocolo de cotratamento, reduziu a frequência de danos genéticos induzidos pelo EMS. Por outro lado, neste mesmo protocolo, o AR não apresentou efeito modulador. No protocolo de pós-tratamento ambos os compostos não foram capazes de alterar significativamente a frequência de danos induzidos pelo EMS. Considerando que o EMS não induz danos oxidativos no DNA, o efeito antimutagênico da RT no protocolo de cotratamento mostra que a atividade antioxidante não é o mecanismo pelo qual este flavonoide atua como agente antimutagênico. A RT parece competir com sítios nucleofílicos celulares (proteínas, RNA e DNA) protegendo-os do ataque pelo agente alquilante. Além disso, a ausência de modulação no protocolo de pós-tratamento indica que este composto não interfere nos mecanismos de reparação do DNA.

Palavras-chave: células somáticas, compostos fenólicos, etil-metanossulfonato, mutação, recombinação.

¹ Acadêmicas do curso de Ciências Biológicas/ULBRA – Bolsista PIBIC/CNPq.

² Egressos do curso de Biomedicina/ULBRA.

³ Egresso do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde -PPGBiosaúde/ ULBRA e Professor no Curso de Medicina da Universidade Estadual do Maranhão.

⁴ Doutoranda do PPGBiosaúde/ULBRA.

⁵ Professor dos cursos de Ciências Biológicas e Biomedicina/ULBRA e do PPGBiosaúde/ULBRA.

⁶ Professor-Orientador dos cursos de Engenharia Ambiental, Ciências Biológicas e Biomedicina/ULBRA e do PPGBiosaúde/ULBRA (mauriciol@ulbra.br).

Abstract: Phenolic compounds have broad biological activities involving not only the nutritional role, but also therapeutic actions. Among these are rutin (RT) and rosmarinic acid (RA). The aim of the study was to evaluate the antimutagenic activity of RT and RA on the genetic damage induced by ethyl methanesulfonate (EMS). For this purpose, the somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster* was used using the co-treatment and post-treatment protocols, in concentrations of 25; 50 and 100 mg/mL for both compounds, while EMS was administered in two concentrations, 5 mM in co-treatment and 46 mM in post-treatment. The results show that RT, in the co-treatment protocol, reduced the frequency of genetic damage induced by EMS. On the other hand, in this same protocol, the AR did not have a modulating effect. In the post-treatment protocol, both compounds were not able to significantly change the frequency of damage induced by EMS. The protective effect observed for RT in the co-treatment protocol indicates that this flavonoid has a broader protective action, than just the antioxidant activity, already described in the literature, since EMS is not able to induce oxidative damage in DNA. In this way, RT appears to compete with cell nucleophilic sites (proteins, RNA and DNA) protecting them from attack by the alkylating agent. In addition, the absence of modulation in the post-treatment protocol indicates that this compound does not interfere with DNA repair mechanisms.

Keywords: ethyl methanesulfonate, mutation, phenolic compounds, recombination, somatic cells.

Introdução

Atualmente existe grande interesse sobre os compostos fenólicos presentes em vegetais, ervas, frutas e também nos chás, vinhos e mel, muito associado à relação entre o consumo desses compostos e um menor risco de desenvolver doenças cardiovasculares (infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico) (BONDONNO et al, 2017; NAWAZ et al., 2017; LUTZ et al., 2019; SANCHES-SILVA et al., 2020), neurodegenerativas (Alzheimer, esclerose) (WANG et al., 2015; HIREMATHAD, 2017; COSME et al., 2020) e câncer (SHARMA et al., 2018; MUTHA; TATIYA; SURANA, 2021). Existem evidências de que a utilização regular e contínua destas substâncias pode auxiliar na terapia destas doenças além de proporcionar maior longevidade (GODOS et al., 2018; RUSSO et al., 2020; PINTO et al., 2021).

Entre as classes de compostos fenólicos de maior interesse científico podemos citar os flavonoides, os ácidos fenólicos e seus ésteres (ZHAO; ZHANG; YANG, 2014). A rutina (RT) é um flavonoide do tipo glicosídico (Figura 1), extensamente encontrado na natureza, usado na indústria farmacêutica em produtos para normalização da resistência e permeabilidade capilar. Além deste efeito, várias ações já foram descritas (antioxidante, anticonvulsivante, anti-inflamatória, analgésica) (BONECHI et al, 2018; BUDZYNSKA et al 2019). Os flavonoides são compostos fenólicos derivados da benzo-g-pirona cuja estrutura básica contém um esqueleto difenil propano

(C₆C₃C₆) formado por três anéis (A, B e C). Os flavonoides podem ocorrer como agliconas, glicosídeos (aglicona + açúcar) e associados a estruturas como proteínas ou lipídeos (KUMAR; PANDEY, 2013).

O ácido rosmarínico (AR) é um composto fenólico natural com diferentes atividades biológicas como ação antitumoral, antibacteriana, anti-inflamatória, hepatoprotetora e antioxidante. Quimicamente o AR é um éster de ácido fenólico (ácido caféico + ácido 3,4-dihidroxifenilacético) (Figura 1) encontrado principalmente nas famílias Lamiaceae e Boraginaceae (PETERSEN; SIMMONDS, 2003; NUNES et al., 2017). Os ácidos fenólicos apresentam um anel benzoico, uma carboxila e hidroxilas, podendo ser classificados como derivados do ácido hidroxibenzóico (C₆C₁) ou do ácido hidroxicinâmico (C₆C₃). Geralmente os ácidos fenólicos encontram-se esterificados, como o AR, e suas propriedades antioxidantes podem estar associadas ao número de hidroxilas e a proximidade do grupo carboxílico com o grupo fenil (LEE; CHAN; MITCHELL, 2017; KHOJASTEH et al., 2020).

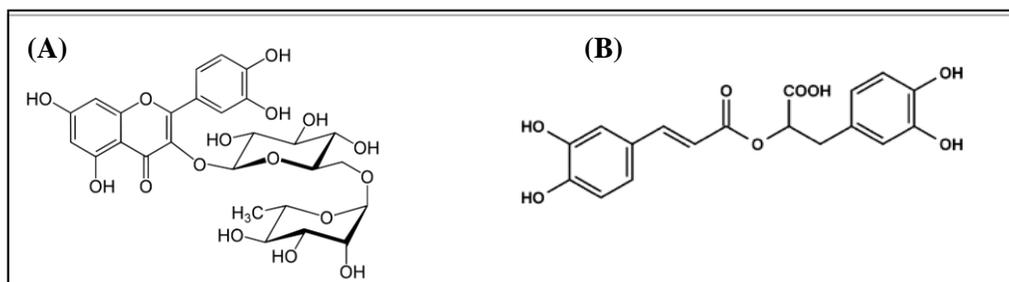


Figura 1: Estrutura química da rutina (A) e ácido rosmarínico (B).

Fonte: Adaptado de Petersen e Simmonds (2003) e Ghorbani (2017).

A maioria dos estudos demonstram que as ações biológicas benéficas dos compostos fenólicos têm relação direta aos seus efeitos antioxidantes. Vários autores descreveram ações de proteção ao DNA graças a capacidade de neutralização ou sequestro de radicais livres gerados a partir do estresse oxidativo (DA SILVA et al., 2002; FURTADO et al., 2008; KUMAR; PANDEY, 2013). No entanto, estudos mais recentes mostram que os efeitos benéficos de RT e AR não se limitam às ações antioxidantes. Entre os outros mecanismos propostos são citados modulação de enzimas de metabolização (indução/inibição do citocromo P450), interações diretas com mutágenos e pró-mutágenos além de estímulo a mecanismos de reparo ao DNA (WU et al., 2017; GUTIÉRREZ-GRIJALVA et al., 2018).

Outro aspecto que tem sido pesquisado é a segurança do elevado

consumo de compostos naturais pois, em determinadas situações e em determinados tecidos, estas substâncias podem comportar-se como pró-oxidantes (BANJARNAHOR; ARTANTI, 2014; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016; GUTIÉRREZ-GRIJALVA et al., 2018). Desta forma, os compostos fenólicos, assim como outros agentes bioativos presentes na dieta alimentar humana podem trazer proteção ou causar danos ao DNA dependendo de fatores como concentração, presença/ausência de metais, tecidos alvo e outros (CHOBOT; HADACEK, 2011; PROCHÁZKOVÁ; BOUSOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011; EGHBALIFERIZ; IRANSHAHI, 2016; ZHANG; TSAO, 2016).

Nos estudos de antimutagênese é necessário utilizar um indutor de danos genéticos. No presente estudo, foi utilizado o etil-metanossulfonato (EMS), um agente alquilante monofuncional capaz de doar grupos alquila como o CH₃ ou CH₃CH₂ para os grupos amino ou cetona dos nucleotídeos (centros nucleofílicos reativos no DNA) formando adutos nos átomos de N e O, especificamente O-6-etilguaninas e N-7-etilações (KONDO et al., 2010). Este tipo de comportamento pode levar a mutações de transição (GC para AT e AT para GC), inserções, deleções e quebras de fitas de DNA (SEGA, 1984; WILLIAMS et al., 2009). Enquanto a alquilação do DNA ocorre principalmente nas posições onde existem moléculas de nitrogênio nas bases nitrogenadas, por conta do caráter SN1 parcial da reação, o EMS também é capaz de produzir níveis significativos de alquilação no oxigênio como O⁶ da guanina e nos grupos fosfato do DNA (SHANTHAMMA; JOSEPH; RAMACHANDRA, 1972; SEGA, 1984).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimutagênica da RT e da AR sobre os danos gerados pelo etil-metanossulfonato (EMS), através do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*.

Materiais e Método

Agentes químicos

O ácido rosmarínico (ácido α -O-cafeoil-3,4-dihidroxifenilático), CAS n° 537-15-5; a rutina (3,3',4',5,7-pnetahidroxiflavona-3-rutinosil), CAS n° 153-18-4; uretano, CAS n° 51-79-6; e o etil-metanossulfonato (EMS), CAS n° 62-50-0, foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, Mo, EUA). Todos os compostos foram dissolvidos em água destilada e deionizada para obtenção das concentrações testadas.

Linhagens

Foram utilizadas as linhagens *flr³* (*flr³/In(3LR)TM3,ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*), *ORR;flr³* (*ORR;flr³/In (3LR)TM3, rⁱ p^p sep l(3)89Aabx^{34e} e Bd^S*) e *mwh* (*mwh/mwh*) de *D. melanogaster* portadoras de genes marcadores específicos localizados no cromossomo 3. Estes marcadores permitem detectar a indução de mutação e recombinação em células somáticas (ANDRADE; REGULY; LEHMANN, 2004). Todas as linhagens utilizadas, assim como os cruzamentos, foram mantidos em frascos de vidros de 1/4 L contendo meio de cultura padrão a 25°C ±1°C e a umidade de 60-70%.

Cruzamento e Tratamento

No presente estudo foi utilizado o cruzamento padrão do teste SMART no qual fêmeas virgens *flr³* foram cruzadas com machos *mwh*, originando larvas portadoras de nível basal de atividade metabólica dependente de citocromo P-450 (ANDRADE; REGULY; LEHMANN, 2004).

A metodologia de tratamento empregada está descrita em Graf et al. (1984; 1989). A atividade antimutagênica dos compostos fenólicos RT e AR foram avaliadas através do cotratamento e do pós-tratamento. Para o cotratamento, as larvas coletadas do meio de ovoposição foram submetidas ao tratamento crônico com água destilada e deionizada (controle negativo), EMS 5 mM (controle positivo) e três diferentes concentrações de RT e AR (25, 50 e 100 mg/L) combinadas com a genotoxina (EMS 5 mM).

No pós-tratamento as larvas coletadas dos meios de ovoposição foram, inicialmente, divididas em dois grupos e submetidas ao tratamento agudo de 3 h com água destilada e deionizada e com EMS 46 mM e, após este período, foram lavadas com água. Posteriormente, as larvas inicialmente tratadas com água, foram submetidas ao tratamento crônico também com água destilada, enquanto as larvas submetidas ao tratamento agudo com EMS foram divididas em grupos e pós-tratadas com água destilada e deionizada e diferentes concentrações de RT e AR (25, 50 e 100 mg/L).

Todas as concentrações utilizadas dos compostos fenólicos e do EMS foram definidas a partir de estudos prévios descritos na literatura científica (RODRIGUES et al., 2017; MLADENOVIC et al., 2013).

Análise microscópica

Após a eclosão, as moscas foram armazenadas em etanol 70% e posteriormente tiveram as asas removidas para a montagem de lâminas usando solução de Faure (goma arábica 30 g, glicerol 20 mL, hidrato de cloral 50 g,

água 50 mL).

Foram analisadas as superfícies dorsal e ventral das asas provenientes de moscas de ambos os sexos para a análise dos fenótipos das cerdas originadas a partir dos discos imaginais de larvas de terceiro estágio que foram expostas aos diferentes tratamentos. Durante o desenvolvimento larval poderão ocorrer alterações no material genético das células, que levarão aparecimento de manchas com os fenótipos cerdas múltiplas e/ou cerdas com a base alargada nas asas dos adultos. Estas manchas mutantes surgem a partir da expressão dos marcadores genéticos, representados pelos genes recessivos *mwh* e/ou *flr³*, respectivamente.

Estes clones de células mutantes foram classificados em três tipos (Figura 1): (1) manchas simples pequenas, consistindo de 1 ou 2 células *mwh* ou *flr³*; (2) manchas simples grandes, consistindo de três ou mais células *mwh* ou *flr³*; e (3) manchas gêmeas, consistindo de células *mwh* e *flr³* adjacentes (GRAF et al., 1984). Enquanto as manchas simples originam-se tanto por eventos mutacionais (mutações pontuais e aberrações cromossômicas) como por recombinação somática, as manchas gêmeas são geradas por eventos recombinacionais (GRAF et al., 1989).

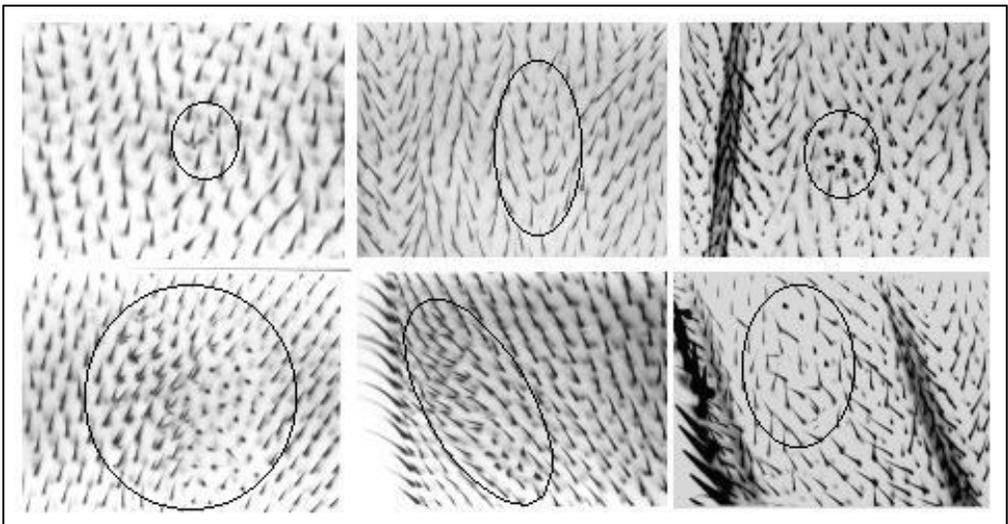


Figura 1: Diferentes tipos de manchas mutantes e suas variações. a. Mancha simples pequena, com duas células expressando o fenótipo *mwh*. b. Mancha simples grande, com 5 células expressando o fenótipo *mwh*. c. Mancha simples grande, com 6 células expressando o fenótipo *flr³*. d., e., f. Manchas gêmeas, com clones adjacentes de células expressando os dois fenótipos – note as diferentes variações na expressão do gene *flr³*.

Fonte: Andrade, Reguly e Lehmann (2004).

Análise estatística

Para a avaliação da atividade antimutagênica, as frequências de manchas mutantes dos grupos tratados com RT e AR combinadas com EMS (co- e pós-tratamento) foram comparadas inicialmente através do teste binominal condicional de Kastenbaum e Bowman (1970), seguindo o procedimento de decisões múltiplas de acordo com Frei e Würgler (1988), com nível de significância de 5% (GRAF et al., 1984; FREI; WURGLER, 1988; FREI et al., 1992). Posteriormente, nos casos em que foram encontradas diferenças significativas, os dados foram também submetidos ao teste-U não paramétrico de Wilcoxon, Mann e Whitney (FREI; WÜRGLER, 1995).

Resultados

Os resultados referentes à atividade antimutagênica mostraram que a RT foi capaz de reduzir a frequência de danos genéticos induzidos pelo EMS no protocolo de cotratamento no genótipo *mwh/flr³*, enquanto o AR não apresentou efeito modulador (Tabela 1). A redução de danos genéticos causada pela RT foi observada sobre a frequência de manchas simples pequenas, nas concentrações de 25 e 100 mg/L, nas manchas simples grandes na concentração de 25 mg/L e sobre o total de manchas nas três concentrações avaliadas (25, 50 e 100 mg/L), com percentuais de inibição de 4,79%, 9,63% e 9,87%, respectivamente.

No protocolo de pós-tratamento (Tabela 2), foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na frequência de manchas gêmeas entre o EMS e o tratamento com RT nas concentrações de 50 e 100 mg/L. Entretanto, não foram verificadas diferenças para o total de manchas em nenhuma das concentrações, sendo este o parâmetro utilizado para caracterizar a ação modulatória dos compostos avaliados.

Tabela 1 - Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* do cruzamento padrão (CP) após exposição crônica de larvas de 3º estágio ao **cotratamento** da RT e do AR com EMS.

Tratamento ^a e genótipo	Nº de moscas (<i>N</i>)	Manchas por mosca (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^b								Total de manchas <i>mwh</i> ^d (<i>n</i>)	Frequência de indução de clones (por 10 ⁵ células por divisão celular) (<i>n/NC</i>) ^e	Inibiçã o (%) ^f		
		Manchas simples pequenas (1-2 células) ^c <i>m</i> = 2		Manchas simples grandes (>2 células) ^c <i>m</i> = 5		Manchas gêmeas <i>m</i> = 5		Total de manchas ^c <i>m</i> = 2						
RT (mg/L) EMS (mM)														
0	0	40	0,45	(18)	0,08	(03)	0,03	(01)	0,55	(22)	22	1,13		
0	5	40	29,38	(1175) *	14,98	(599) *	8,98	(359) *	53,33	(2133) *	2027	103,84	[102,71]	
25	5	40	25,30	(1012) +	12,63	(505) +	7,65	(306) -	45,58	(1823) +	1931	98,92	[97,79]	4,79
50	5	40	27,70	(1108) -	13,30	(532) -	7,10	(284) -	48,10	(1924) +	1834	93,95	[92,82]	9,63
100	5	40	25,78	(1031) +	13,48	(539) -	8,95	(358) -	48,20	(1928) +	1829	93,70	[92,57]	9,87
AR (mg/L) EMS (mM)														
0	0	40	0,50	(20)	0,13	(05)	0,03	(01)	0,65	(26)	26	1,33		
0	5	40	27,63	(1105) *	12,10	(484) *	8,23	(329) *	47,95	(1918) *	1806	92,52	[91,19]	
25	5	40	27,90	(1116) -	11,55	(462) -	6,05	(242) -	45,50	(1820) -	1716	87,91	[86,58]	-
50	5	40	25,63	(1025) -	11,28	(451) -	6,98	(279) -	43,88	(1755) -	1657	84,89	[83,56]	-
100	5	40	28,10	(1124) -	11,35	(454) -	7,80	(312) -	47,25	(1890) -	1790	91,70	[90,37]	-

Legenda: ^aControle negativo, água destilada e deionizada. ^bDiagnóstico estatístico: *, positivo; quando comparado ao controle negativo através do teste binomial condicional. +, positivo; -, negativo quando comparado ao tratamento com EMS através do teste binomial condicional e teste U de Mann, Whitney e Wilcoxon (FREI; WÜRGLER, 1995); *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=\beta=0,05$. ^cInclui manchas simples *flr³* raras. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas. ^eCalculado de acordo com Frei et al. (1992); *C* = 48.000 (aproximadamente o número de células analisadas por mosca); valores entre colchetes representam as frequências de manchas induzidas corrigidas pela incidência espontânea estimada a partir dos controles negativos. ^fCalculado de acordo

com Abraham (1994): % de inibição = [(EMS - EMS mais RT) / EMS] x 100.

Tabela 2 - Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr³* do cruzamento padrão (CP) após exposição aguda de larvas de 3º estágio ao tratamento com EMS seguido do pós-tratamento com RT e AR.

Tratamento ^a	Nº de moscas (N)	Manchas por mosca (nº de manchas) diagnóstico estatístico ^b										
		Manchas simples pequenas (1-2 células) ^c <i>m</i> = 2		Manchas simples grandes (>2 células) ^c <i>m</i> = 5		Manchas gêmeas <i>m</i> = 5		Total de manchas ^c <i>m</i> = 2		Total de manchas <i>mwh</i> ^d (n)		
EMS (mM)	RT (mg/L)											
0	0	40	0,55 (22)		0,05 (02)		0,03 (01)		0,63 (25)		25	
0	0	40	3,05 (122) *		4,70 (188) *		2,75 (110) *		10,50 (420) *		372	
46	25	40	3,83 (153) -		4,78 (191) -		3,53 (141) -		12,13 (485) -		424	
46	50	40	4,30 (172) -		5,30 (212) -		3,60 (144) +		13,20 (528) -		462	
46	100	40	3,08 (123) -		4,95 (198) -		3,70 (148) +		11,73 (469) -		416	
EMS (mM)	AR (mg/L)											
0	0	40	0,70 (28)		0,15 (06)		0,03 (01)		0,88 (35)		35	
0	0	40	4,13 (165) *		6,08 (243) *		4,95 (198) *		15,15 (606) *		516	
46	25	40	3,45 (138) -		5,25 (210) -		4,20 (168) -		12,90 (516) -		435	
46	50	40	3,65 (146) -		5,98 (239) -		4,63 (185) -		14,25 (570) -		488	
46	100	40	4,38 (175) -		5,85 (234) -		4,40 (176) -		14,63 (585) -		507	

Legenda: ^aCN: controle negativo, água destilada e deionizada. ^bDiagnóstico estatístico: *, positivo quando comparado ao CN através do teste binomial condicional; +, positivo; -, negativo quando comparado ao tratamento com EMS através do teste binomial condicional (FREI; WÜRGLER, 1995); *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha=\beta=0,05$. ^cInclui manchas simples *flr³* raras. ^dConsiderando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

Discussão

Este estudo foi desenvolvido para avaliar o potencial antimutagênico dos compostos fenólicos RT e AR sobre os danos genéticos induzidos pelo mutágeno EMS. O mecanismo de ação do EMS se baseia no processo de alquilação de bases nitrogenadas de forma direta e sem a formação de radicais livres evidenciando uma ação protetora mais ampla, do que apenas a atividade antioxidante, já descrita na literatura (JAYAKUMAR; NIRMALA; KUMAR, 2014; FURTADO et al., 2015; BONECHI et al., 2018), visto que o EMS não é capaz de induzir danos oxidativos no DNA.

Os resultados de antimutagenicidade para AR foram negativos no protocolo de cotratamento. O AR é um éster de ácido fenólico com propriedades antioxidantes comprovadas sendo capaz de neutralizar ou adsorver radicais livres. Suas propriedades antioxidantes derivam de sua estrutura química formada por dois anéis aromáticos conjugadas a hidroxilas, especialmente grupo catecol e carboxílico (MLADENOVIC et al., 2013; FURTADO et al., 2015; TAGUCHI et al., 2017).

Além das ações antioxidantes, outros mecanismos de proteção ao DNA por AR são propostos, como ação inibitória ou potencializadora sobre enzimas de metabolização CYP450, prevenção da interação direta entre EMS e DNA e inibição direta do EMS, agindo como um desmutágeno (SŁOCZYŃSKA, 2014; KHAN et al., 2018). Apesar destes mecanismos, no presente estudo, o AR, nas concentrações utilizadas, mostrou-se incapaz de reduzir a formação de manchas mutantes nas asas de *D. melanogaster* induzidas pelo EMS. Por tratar-se de um ensaio *in vivo*, a ausência de efeito antimutagênico pode estar associada ao metabolismo do AR que pode sofrer menor absorção intestinal devido a relativa polaridade da molécula ou mesmo a metabolização por esterases plasmáticas ou teciduais não específicas (ADAM et al., 2002; ZHAO; MOGHADASIAN, 2010).

Em relação à RT, verificou-se que todas as concentrações testadas apresentaram proteção ao DNA contra a alquilação provocada pelo EMS no protocolo de cotratamento. Assim como AR, RT é conhecida por possuir ações antioxidantes diretas e indiretas. E, apesar de ambas serem compostos fenólicos, RT pertence à classe diversa de AR, é um flavonoide glicosídico. Atualmente graças a novas tecnologias, como a docagem molecular, outros mecanismos alternativos às ações antioxidantes dos compostos fenólicos foram propostos. A docagem molecular é um método computacional que encontra formas de interação mais prováveis entre um ligante e um receptor biológico. Mladenovic et al. (2013) demonstraram efeitos antimutagênicos da RT e outros compostos fenólicos contra o EMS em *Drosophila*. Através de docagem

molecular e criação de farmacóforos 3-D, verificou-se que a RT, entre os compostos fenólicos testados, apresentou a ligação mais estável ao DNA ($E = -10,96$ Kcal/mol). Isso significa que a RT reage com o DNA e protege as aminas de sofrerem alquilação.

Outro importante mecanismo de proteção contra agentes mutagênicos químicos está relacionado com a interação química direta entre um composto antimutagênico e um mutágeno antes de causar dano ao DNA. Desta forma, Kaya (2003) avaliou o efeito antimutagênico do ácido ascórbico contra três agentes mutagênicos alquilantes, entre estes o EMS, usando o teste SMART. A concentração testada de ácido ascórbico foi de 17 mM, apenas no protocolo de cotratamento e houve redução significativa de todos os tipos de manchas mutantes induzidas pelo EMS (0,5 mM). Assim como para o ácido ascórbico, a maioria dos estudos sobre a RT, apresentam o efeito antioxidante como o responsável pelos efeitos antimutagênicos. Entretanto, os resultados deste estudo, em concordância com nossos achados, demonstram que tais substâncias podem reagir diretamente com o EMS, neutralizando-o quimicamente ou impedindo sua ligação ao DNA.

Considerações Finais

Os dados do presente estudo, ainda que preliminares, mostram o AR não foi capaz de reduzir os danos genéticos induzidos pelo EMS nos protocolos de cotratamento e pós-tratamento. Por outro lado, a RT, no protocolo de cotratamento, reduziu o número de manchas mutantes geradas pelo EMS em todas as concentrações testadas. Estes resultados demonstram que possivelmente as ações antimutagênicas deste composto não se resumem aos efeitos antioxidantes, visto que, a ação mutagênica do EMS ocorre por ataque direto ao DNA com adição de radicais metil ou etil em regiões como O6-guaninas. Desta forma, especula-se que os mecanismos envolvidos no efeito antimutagênico observado possam estar relacionados à neutralização química direta ou interação com DNA impedindo a ligação com o EMS. Apesar destes achados, mais estudos são necessários para ampliar o conhecimento sobre o mecanismo de ação dos compostos fenólicos encontrados em produtos industrializados e naturais, bem como, obter maiores informações sobre a segurança do consumo destas substâncias pela população humana.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Referências

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

ANDRADE, H. H. R.; REGULY, M. L.; LEHMANN, M. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: HENDERSON, D. S. (Ed.). ***Drosophila Cytogenetics Protocols***. Totowa: Humana Press Inc., 2004. v. 247, p. 389-412.

BANJARNAHOR, S. D. S.; ARTANTI, N. Antioxidant properties of flavonoids. **Med J Indones**, v. 23, n. 4, p. 239-244, 2014.

BONECHI, C. *et al.* Protective effect of quercetin and rutin encapsulated liposomes on induced oxidative stress. **Biophys Chem**, v. 233, p. 55-63, 2018.

BONDONNO, N. P.; BONDONNO, C. P.; WARD, N. C.; HODGSON, J. M.; CROFT, K. D. The cardiovascular health benefits of apples: whole fruit vs. isolated compounds. **Trends Food Sci Technol**, v. 69, p. 243-256, 2017.

BUDZYNSKA, B. *et al.* Rutin as neuroprotective agent: from bench to bedside. **Curr Med Chem**, v. 26, n. 27, p. 5152-5164, p. 1-11, 2019.

CHOBOT, V.; HADACEK, F. Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin. **Redox Reports**, v.16, n. 6, p. 242-247, 2011.

COSME, P. *et al.* Plant phenolics: bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. **Antioxidants** (Basel), v. 9, n. 12, p. 1263, 2020.

DA SILVA, J. *et al.* Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food Chem Toxicol**, v. 40, n. 7, p. 941-947, 2002.

EGHBALIFERIZ, S.; IRANSHAHI, M. Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids: updated review of mechanisms and catalyzing metals. **Phytother Res**, v. 30, n. 9, p. 1379-1391, 2016.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive result. **Mutat Res**, v. 203, n. 4, p. 297-308, 1988.

FREI, H. *et al.* The genotoxicity of the anticancer drug mitoxantrone in somatic and germ-cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutat Res**, v. 279, n. 1, p. 21-33, 1992.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. **Mutat Res**, v. 334, n. 2, p. 247-258, 1995.

FURTADO, M. A. *et al.* Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. **Mutat Res**, v. 657, n. 2, p. 150-154, 2008.

FURTADO, R. A. *et al.* Chemopreventive effects of rosmarinic acid on rat colon carcinogenesis. **Eur J Cancer Prev**, v. 24, n. 2, p. 106-112, 2015.

GHORBANI, A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. **Biomed Pharmacother**, v. 96, p. 305-312, 2017.

GODOS, J. *et al.* Dietary phytoestrogen intake is inversely associated with hypertension in a cohort of adults living in the Mediterranean area. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 368, 2018.

GRAF, U. *et al.* Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environ Mol Mutagen**, v. 6, n. 2, p. 153-188, 1984.

GRAF, U. *et al.* Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutat Res**, v. 222, n. 4, p. 359-373, 1989.

GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P. *et al.* Flavonoids and phenolic acids from oregano: occurrence, biological activity and health benefits. **Plants**, v. 7, n. 1, p. 2, 2018.

HIREMATHAD, A. A review: natural compounds as anti-Alzheimer's Disease agents. **Curr Nutr Food Sci**, v. 13, n. 4, p. 247-258, 2017.

JAYAKUMAR, J. K.; NIRMALA, P.; KUMAR, B. A. P. Evaluation of protective effect of myricetin, a bioflavonoid in dimethyl benzanthracene-induced breast cancer in female Wistar rats. **South Asian J Cancer**, v. 3, n. 2, p. 107-111, 2014.

KASTENBAUM, M. A.; BOWMAN, K. O. Tables to determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutat Res**, v. 9, n. 5, p. 527-549, 1970.

KHOJASTEH, A. *et al.* Powerful plant antioxidants: a new biosustainable approach to the production of rosmarinic acid. **Antioxidants** (Basel), v. 9, n. 12, p.1273, 2020.

KONDO, N. *et al.* DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. **J Nucleic Acids**, v. 2010, n. 543531, 2010.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **ScientificWorldJournal**, v. 7, 162750, 2013. DOI 10.1155/2013/162750. Disponível em: <https://downloads.hindawi.com/journals/tswj/2013/162750.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2021.

LEE, J.; CHAN, B. L. S.; MITCHELL, A. E. Identification/quantification of free and bound phenolic acids in peel and pulp of apples (*Malus domestica*) using high resolution mass spectrometry (HRMS). **Food Chem**, v. 215, p. 301-310, 2017.

LUTZ, M. *et al.* Roles of phenolic compounds in the reduction of risk factors of cardiovascular diseases. **Molecules**, v. 24, n. 2, 366, 2019.

MUTHA, R. E.; TATIYA, A. U.; SURANA, S. J. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. **Futur J Pharm Sci**, v. 7, n. 1, 25, 2021.

NAWAZ, S. *et al.* Lipid lowering effect of synthetic phenolic compound in a high- fat diet (HFD) induced hyperlipidemic mice. **Mat Sc Pharm**, v. 1, n. 1, p. 12-16, 2017. DOI 10.26480/MSP.01.2017.12.16. Disponível em: <https://matrixscpharma.com/archives/1msp2017/1msp2017-12-16.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2021.

NUNES, S. *et al.* Therapeutic and nutraceutical potential of rosmarinic acid—cytoprotective properties and pharmacokinetic profile. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 57, n. 9, p. 1799-1806, 2017.

PANCHE A; DIWAN A; CHANDRA S. Flavonoids: An overview. **J Nutr Sci**. 5: 41-6, 2016.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M. S. J. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 121-125, 2003.

PINTO, T. *et al.* Bioactive (poly)phenols, volatile compounds from vegetables, medicinal and aromatic plants. **Foods**, v. 10, n. 1, p. 106, 2021.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUSOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513-523, 2011.

RODRIGUES, C. R. F. *et al.* Assessment of genotoxic and antigenotoxic activities of artemillin C in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food Chem Toxicol**, v. 101, p. 48-54, 2017.

RUSSO, G. L. *et al.* Mechanisms of aging and potential role of selected polyphenols in extending healthspan. **Biochem Pharmacol**, v. 173, 113719, 2020.

SANCHES-SILVA, A. *et al.* Therapeutic potential of polyphenols in cardiovascular diseases: Regulation of *mTOR* signaling pathway. **Pharmacol Res**, v.152, 104626, 2020.

SEGA, G. A. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. **Mutat Res**, v. 134, n. 2-3, p. 113-142, 1984.

SHANTHAMMA, M. S.; JOSEPH, R.; RAMACHANDRA, R. Quantitative assessment of the mutagenic effect of ethyl methanesulfonate in *Micrococcus glutamicus*. **Folia Microbiol**, v. 17, n. 2, p. 81-87, 1972.

SHARMA, A. *et al.* Polyphenols in food: cancer prevention and apoptosis induction. **Curr Med Chem**, v. 25, n. 36, p. 4740-4757, 2018.

WANG, D. *et al.* Role of intestinal microbiota in the generation of polyphenol-derived phenolic acid mediated attenuation of Alzheimer's disease beta-amyloid oligomerization. **Mol Nut Food Res**, v. 59, n. 6, p. 1025-1040, 2015.

WILLIAMS, R. S. *et al.* Nbs1 flexibly tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to coordinate DNA double-strand break processing and repair. **Cell**, v. 139, n. 1, p. 87-99, 2009.

WU, J. *et al.* Chemopreventive effect of natural dietary compounds on xenobiotic-induced toxicity. **J Drug Drug Anal**, v. 25, n. 1, p. 176-186, 2017.

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Curr Opin Food Sci**, v. 8, p. 33-42, 2016.

ZHAO, H.; ZHANG, H.; YANG, S. Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese jujube. **Food Sci Hum Wellness**, v. 3, n. 3-4, p. 183-190, 2014.