



## AValiação DO POTENCIAL TÓXICO-GENÉTICO E ANTIMUTAGÊNICO DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICOS 3-ACQ e 5-ACQ ATRAVÉS DO TESTE SMART EM *Drosophila melanogaster*

Lucía Paola Facciola González<sup>1</sup>  
Idna de Carvalho Barros<sup>2</sup>  
Rafael Rodrigues Dihl<sup>3</sup>  
Mauricio Lehmann<sup>4</sup>

### Resumo

Estudos epidemiológicos demonstram que o consumo de comidas e bebidas naturais ricas em compostos fitoquímicos reduzem a incidência de câncer e doenças crônico-degenerativas por serem fontes potenciais de substâncias antimutagênicas e anticarcinogênicas. Os ácidos clorogênicos integram o grupo dos fenóis antioxidantes e atua em diversos sistemas biológicos, sendo associados a atividades antitumoral, analgésica, antimicrobiana, antioxidante, antiaterosclerose e antidiabetes. Além de abundantes no café, podem ser encontrados na erva mate, ameixa, maçã e na batata. Estes compostos integram o grupo dos fenóis antioxidantes e atuam em diversos sistemas biológicos, sendo associados a atividades antitumoral, analgésica, antimicrobiana, antioxidante, antiaterosclerose e antidiabetes. O presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade mutagênica e antimutagênica dos ácidos clorogênicos 3-*O*-cafeoilquínico (3-ACQ) e 5-*O*-cafeoilquínico (5-ACQ) através do teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *D. melanogaster*. Para avaliação da atividade antimutagênica foram utilizados os protocolos de co- e pós-tratamento. Os resultados obtidos até o presente momento mostram que: (i) o 3-ACQ e o 5-ACQ não exerceram atividade mutagênica nas concentrações testadas (200, 400 e 800 µM); (ii) reduziram significativamente a atividade genotóxica do EMS (5 mM) no protocolo de co-tratamento nas concentrações de 200 e 800 µM, assim como (iii) foram capazes de reduzir a frequência de danos genéticos induzidos pelo EMS (46 mM) no sistema de pós-tratamento nas três concentrações utilizadas. Os resultados, ainda que preliminares, apontam para um efeito protetor dos ácidos clorogênicos 3-ACQ e 5-ACQ sobre danos químicos induzidos no DNA e que esta proteção pode estar associada não apenas com a atividade antioxidante, já descrita na literatura científica, mas também com a potencialização dos mecanismos de reparação do DNA.

Palavras-chave: antimutagenicidade; mutagenicidade; recombinação.

### INTRODUÇÃO

Ácido clorogênico é a nomenclatura utilizada para identificar o grupo de ésteres mais abundantes contidos na dieta humana. Eles são formados a partir da reação de esterificação entre compostos fenólicos denominados ácidos transcinâmicos (*p*-cumárico, ferúlico e cafeico) com o ácido quínico (ácido 1,3,4,5-tetrahidroxíciclohexano carboxílico) (MILLS et al., 2013).

O ácido clorogênico integra o grupo dos fenóis antioxidantes e atua em diversos sistemas biológicos, sendo associados a atividades antitumoral, analgésica, antimicrobiana, antioxidante, antiaterosclerose e antidiabetes (BURRIS, 2012; MILLS et al., 2013). Este polifenol, além de ser abundante no café, pode ser encontrado ainda na erva mate, bem como

<sup>1</sup> Aluno do curso de graduação em Biologia – Bolsista PIBITI/CNPq – luciapfgonzalez28@gmail.com

<sup>2</sup> Aluna de Doutorado do PPGBIOSAÚDE – idnabarros@gmail.com

<sup>3</sup> Professor do curso de Biologia e PPGBIOSAÚDE – rafael.rodrigues@ulbra.br

<sup>4</sup> Professor do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária e PPGBIOSAÚDE – mauriciol@ulbra.br

na ameixa, maçã e na batata (CAI et al., 2014; KAULMANN et al., 2014; ZAWIRSKA-WOJTASIAK et al., 2014).

Embora muitos estudos apontem para os efeitos antioxidantes e antígenotóxicos dos compostos fenólicos, pouco se sabe sobre a capacidade moduladora dos polifenóis sobre a indução de danos genéticos, especialmente a recombinação mitótica. Soma-se a isto a variedade de resultados controversos descritos, seja em relação ao efeito antimutagênico ou mutagênico destes compostos naturais encontrados em uma grande variedade de alimentos consumidos pela população humana, especialmente o café. Neste sentido, o presente estudo investigou a atividade antimutagênica dos ácidos clorogênicos 3-ACQ e 5-ACQ sobre os danos induzidos pelo mutágeno etilmetanossulfonato (EMS), através do teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *D. melanogaster*.

## METODOLOGIA

O teste SMART foi utilizado conforme descrito em Andrade; Lehmann e Reguly (2004). Foi empregado o cruzamento padrão, com fêmeas de *D. melanogaster* da linhagem *flr<sup>3</sup>* e machos da linhagem *mwh*. Com o objetivo de avaliar a antimutagenicidade dos ácidos clorogênicos foram utilizados dois protocolos de tratamento:

- Co-tratamento, onde as larvas coletadas do meio de ovoposição foram submetidas ao tratamento crônico no qual quatro grupos de tratamento foram utilizados: controle negativo (água destilada e deionizada); controle positivo (EMS 5 mM); três diferentes concentrações de 3-ACQ e 5-ACQ (200, 400 e 800 µM) combinadas com as genotoxinas.

- Pós-tratamento: as larvas coletadas dos meios de ovoposição foram, inicialmente, submetidas ao tratamento agudo por um período de 3 h (EMS) onde quatro grupos de tratamento foram utilizados: (i) água destilada 6 h; (ii) EMS 46 mM (3 h). Posteriormente, estas larvas foram lavadas com água e pós-tratadas com: (i) água destilada e deionizada; (ii) três diferentes concentrações de 3-ACQ e 5-ACQ (200, 400 e 800 µM).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos até o presente momento mostram, inicialmente, que o 3-ACQ e o 5-ACQ são destituídos de atividade mutagênica nas concentrações testadas (200, 400 e 800 µM) (Tabela 1).

A análise dos dados sobre a atividade antimutagênciã mostrou que ambos os compostos reduziram significativamente a atividade genotóxica do EMS (5 mM) no protocolo de co-tratamento nas concentrações de 200 e 800 µM (Tabela 2), assim como foram capazes de reduzir a frequência de danos genéticos induzidos pelo EMS (46 mM) no sistema de pós-tratamento nas duas concentrações mais altas utilizadas (Tabela 3).

Ainda que preliminares, os dados apontam para um efeito protetor dos ácidos clorogênicos 3-ACQ e 5-ACQ sobre danos químicos induzidos no DNA e que esta proteção pode estar associada não apenas com a atividade antioxidante, já descrita na literatura científica (JI et al., 2013; BHATTACHARYYA et al., 2014; XU et al., 2014), mas também com a potencialização dos mecanismos de reparação do DNA, tendo em vista os efeitos observados no sistema de pós-tratamento, no qual os ácidos clorogênicos foram adicionados após a indução dos danos genéticos. Além disso, verificou-se neste cruzamento que o efeito protetor foi bastante evidenciado nas manchas gêmeas (Tabela 3), o que caracteriza atividade antirrecombinogênica, visto que este tipo de mancha é originado exclusivamente por eventos recombinacionais.

Apesar da ausência de dados na literatura científica sobre a atividade mutagênica/antimutagênica do 3-ACQ, alguns estudos prévios mostram que o 5-ACQ não apresentou atividade mutagênica, ao mesmo tempo que reduziu a atividade mutagênica da 4-nitroquinoleína-1-óxido (4NQO) quando avaliado através do teste de micronúcleos em células

pró-mielocíticas humanas HL-60 (ABRAHAM et al., 2007). Utilizando a mesma metodologia utilizada no presente estudo, o teste SMART, Sortibrán et al. (2011) demonstraram que o 5-ACQ não é mutagênico e não foi capaz de reduzir os danos induzidos pelo paraquat, um agente indutor de danos oxidativos no DNA.

Tabela 1: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr<sup>3</sup>* do cruzamento padrão após exposição crônica de larvas de 3º estágio aos compostos 3-ACQ e 5-ACQ nas diferentes concentrações.

Genótipos e Conc. (mM)	Nº de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo ( nº de manchas ) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup> (n)
		MSP (1-2 céls) <sup>b</sup> m = 2	MSG (>2 céls) <sup>b</sup> m = 5	MG m = 5	TM m = 2	
<b>5-ACQ</b>						
Controle negativo	30	0,63 (19)	0,10 (03)	0,07 (02)	0,80 (24)	24
5-ACQ 200 µM	30	0,97 (29) i	0,17 (05) i	0,03 (01) -	1,17 (35) i	35
5-ACQ 400 µM	30	0,50 (15) -	0,10 (03) -	0,03 (01) -	0,63 (19) -	19
5-ACQ 800 µM	30	0,70 (21) -	0,03 (01) -	0,00 (00) -	0,73 (22) -	22
<b>3-ACQ</b>						
Controle negativo	30	0,63 (19)	0,10 (03)	0,07 (02)	0,80 (24)	24
3-ACQ 200 µM	30	0,37 (11) -	0,03 (01) -	0,03 (01) -	0,43 (13) -	13
3-ACQ 400 µM	30	0,43 (13) -	0,00 (00) -	0,10 (03) i	0,53 (16) -	16
3-ACQ 800 µM	30	0,50 (15) -	0,10 (03) -	0,00 (00) i	0,60 (18) -	18

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo, quando comparado ao controle negativo. <sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr3* raras. <sup>c</sup>Foram considerados apenas os clones *mwh* das manchas simples *mwh* e das manchas gêmeas.

Tabela 2: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr3* do cruzamento padrão após exposição crônica de larvas de 3º estágio ao co-tratamento do 3-ACQ e 5-ACQ com EMS (5 mM).

Genótipos e Conc. (mM)	Nº de moscas (N)	Manchas por indivíduo ( nº de manchas ) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup> (n)
		MSP (1-2 céls) <sup>b</sup> m = 2	MSG (>2 céls) <sup>b</sup> m = 5	MG m = 5	TM m = 2	
<b>5-ACQ</b>						
Controle negativo	30	0,63 (19)	0,10 (03)	0,07 (02)	0,80 (24)	24
EMS 5 mM	30	58,63 (1759) *	20,20 (606) *	10,30 (309) *	89,13 (2674) *	2589
EMS 5 mM + 5-ACQ 200 µM	30	55,10 (1653) f+	19,27 (578) -	10,63 (319) -	85,00 (2550) f+	2442
EMS 5 mM + 5-ACQ 400 µM	30	58,97 (1769) -	19,80 (594) -	10,63 (319) -	89,40 (2682) -	2579
EMS 5 mM + 5-ACQ 800 µM	30	53,37 (1601) f+	18,57 (557) -	9,90 (297) -	81,83 (2455) f+	2331
<b>3-ACQ</b>						
Controle negativo	30	0,63 (19)	0,10 (03)	0,07 (02)	0,80 (24)	24
EMS 5 mM	30	58,63 (1759) *	20,20 (606) *	10,30 (309) *	89,13 (2674) *	2589
EMS 5 mM + 3-ACQ 200 µM	30	53,07 (1592) f+	16,60 (498) f+	10,00 (300) -	79,67 (2390) f+	2305
EMS 5 mM + 3-ACQ 400 µM	30	54,47 (1634) f+	20,57 (617) -	11,13 (334) -	86,17 (2585) -	2460
EMS 5 mM + 3-ACQ 800 µM	30	44,23 (1327) f+	20,40 (612) -	13,03 (391) f+	77,67 (2330) f+	2197

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): \*, positivo quando comparado ao controle negativo; -, negativo; f+, fraco-positivo; +, positivo, quando comparado ao tratamento com EMS 5 mM,  $P \leq 0.05$ . <sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr3* raras. <sup>c</sup>Foram considerados apenas os clones *mwh* das manchas simples *mwh* e das manchas gêmeas.

Tabela 3: Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr<sup>3</sup>* do cruzamento padrão após exposição aguda (3 h) de larvas de 3º estágio ao mutágeno EMS (46 mM), seguida do **pós-tratamento** com três concentrações de 3-ACQ e 5-ACQ.

Genótipos e Conc. (mM)	Nº de moscas. (N)	Manchas por indivíduo ( nº de manchas ) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup> (n)
		MSP (1-2 céls) <sup>b</sup> m = 2	MSG (>2 céls) <sup>b</sup> m = 5	MG m = 5	TM m = 2	
<b>5-ACQ</b>						
Controle negativo	30	0,40 (12)	0,03 (01)	0,03 (01)	0,47 (14)	14
EMS 46 mM	30	3,63 (109) *	5,93 (178) *	5,17 (155) *	14,73 (442) *	384
EMS 46 mM + 5-ACQ 200 µM	30	5,83 (175) f+	4,67 (140) f+	3,77 (113) f+	14,27 (428) -	397
EMS 46 mM + 5-ACQ 400 µM	30	5,70 (171) f+	3,57 (107) +	3,33 (100) f+	12,60 (378) f+	344
EMS 46 mM + 5-ACQ 800 µM	30	4,17 (125) -	3,60 (108) +	2,57 (77) +	10,33 (310) f+	275
<b>3-ACQ</b>						
Controle negativo	30	0,40 (12)	0,03 (01)	0,03 (01)	0,47 (14)	14
EMS 46 mM	30	3,63 (109) *	5,93 (178) *	5,17 (155) *	14,73 (442) *	384
EMS 46 mM + 3-ACQ 200 µM	30	6,90 (207) +	4,03 (121) f+	2,87 (86) +	13,80 (414) -	384
EMS 46 mM + 3-ACQ 400 µM	30	5,67 (170) f+	3,87 (116) f+	3,53 (106) f+	13,07 (392) f+	361
EMS 46 mM + 3-ACQ 800 µM	30	5,40 (162) f+	3,13 (94) +	2,97 (89) +	11,50 (345) f+	313

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): \*, positivo quando comparado ao controle negativo; -, negativo; f+, fraco-positivo; +, positivo, quando comparado ao tratamento com EMS 46 mM,  $P \leq 0.05$ .

<sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras. <sup>c</sup>Foram considerados apenas os clones *mwh* das manchas simples *mwh* e das manchas gêmeas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda que preliminares, os dados do presente estudo apontam para um efeito protetor dos ácidos clorogênicos 3-ACQ e 5-ACQ sobre danos químicos induzidos no DNA pelo EMS e que o efeito modulador ocorreu nos protocolos de co- e póstratamento.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. K. et al. Antigenotoxic effects of the phytoestrogen pelargonidin and the polyphenol chlorogenic acid. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 880-7, 2007.
- ANDRADE, H.H.R.; REGULY, M.L.; LEHMANN, M. Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). In: Henderson DS (ed). **Drosophila Cytogenetics Protocols**. Totowa: Human Press Inc., 2004: 389-412.
- BHATTACHARYYA, S. et al. Chlorogenic acid-phospholipid complex improve protection against UVA induced oxidative stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 130, p. 293-8, 2014.
- BURRIS, K. P. et al. Composition and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): a review. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 72, p. 268-75, 2012.
- CAI, Y., et al. Chlorogenic acid increased acrylamide formation through promotion of HMF formation and 3-aminopropionamide deamination. **Journal of Hazardous Materials**, v. 268, p. 1-5, 2014.
- FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203, p. 297-308, 1988.
- JI, L. et al. Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 1911-9, 2013.

- KAULMANN, A. et al. Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of *Brassica oleraceae* and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 155, p. 240-50, 2014.
- MILLS, C. E. et al. The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3335-40, 2013.
- SORTIBRÁN, A. N. C. et al. Antimutagenic activity of two medicinal phytoextracts in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, p. 640-7, 2011.
- XU, D. et al. Tetrachlorobenzoquinone induces acute liver injury, up-regulates HO-1 and NQO1 expression in mice model: The protective role of chlorogenic acid. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, p. 1212-20, 2014.
- ZAWIRSKA-WOJTASIAK R, K. et al. Chlorogenic acid in raw materials for the production of chicory coffee. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 2118-23, 2014.