



# Estudo da atividade antimutagênica dos ácidos clorogênicos 3-ACQ e 5-ACQ em células somáticas de *Drosophila melanogaster*

<sup>1,3,4</sup>Lucas Petitemberte de Souza; <sup>2</sup>Idna de Carvalho Barros; <sup>1</sup>Rafael R. Dohl e <sup>1</sup>Maurício Lehmann

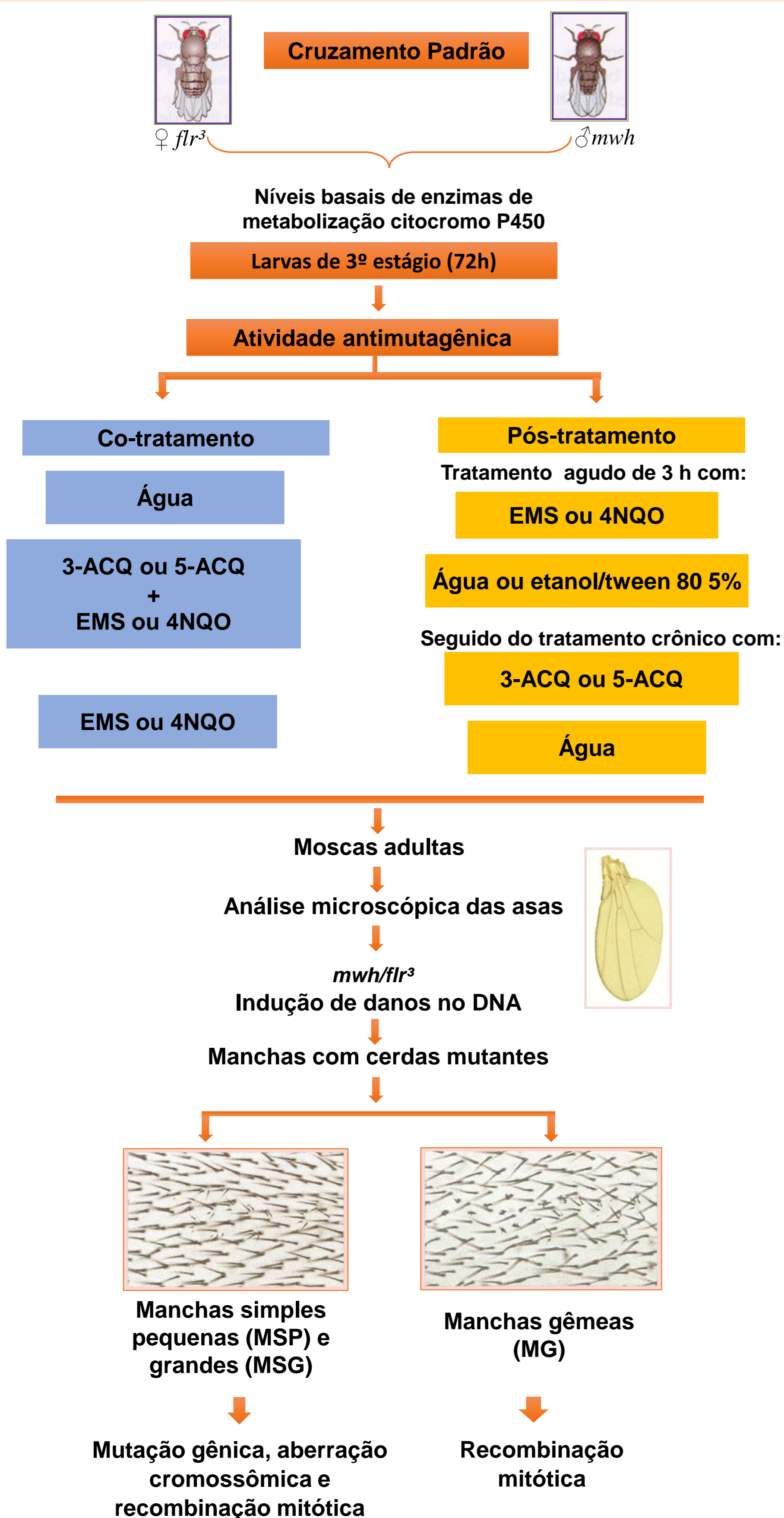
<sup>1</sup>Laboratório de Toxicidade Genética (TOXIGEN), ULBRA Canoas; <sup>2</sup>Aluna de Doutorado do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde (PPGBioSaúde); <sup>3</sup>Bolsista de IC PROBIC/FAPERGS-ULBRA; <sup>4</sup>Aluno do Curso de Biologia, ULBRA Canoas. mauricio@ulbra.br

## Introdução

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 (Kremr et al., 2016). Este polifenol além de ser abundante no café, pode ser encontrado ainda na erva mate, bem como na ameixa, maçã e na batata (Kremr et al., 2016). A sua isomeria encontra-se na posição 3 é denominado de ácido 3-O-cafeoilquinico (3-ACQ); se a isomeria situar-se na posição 4, este é especificado como ácido 4-O-cafeoilquinico (4-ACQ); já a isomeria na posição 5 denomina-o como ácido 5-O-cafeoilquinico (5-ACQ), conforme nomenclatura sistematizada pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (Kremr et al., 2016).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimutagênica dos ácidos clorogênicos 3-ACQ e 5-ACQ sobre os danos genéticos induzidos pelo etil-metano-sulfonato (EMS) e pela 4-nitroquinoleína-1-óxido (4NQO) através do teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em *D. melanogaster*.

## Teste SMART



## Discussão

Os dois compostos não apresentaram atividade modulatória sobre os danos induzidos pelo EMS tanto no protocolo de co-tratamento como no pós-tratamento (Tabelas 1 e 2). Não foram observadas diferenças significativas na frequência de todos os tipos de manchas nas três concentrações avaliadas.

Os resultados parciais referentes à investigação da atividade antimutagênica do 3-ACQ e 5-ACQ sobre os danos induzidos pelo mutágeno 4NQO estão descritos nas Tabelas 3 e 4.

No protocolo de co-tratamento o 3-ACQ reduziu a frequência total de manchas apenas na concentração de 400  $\mu\text{M}$  (Tabela 3), quando comparado ao tratamento como o 4NQO isolado. Nesta concentração também houve redução significativa na frequência de manchas simples pequenas e grandes. Apesar da redução observada na frequência de manchas simples pequenas na concentração de 800  $\mu\text{M}$ , não houve alteração no total de manchas, que é utilizado como parâmetro para a análise final do potencial modulador. Por outro lado, o 5-ACQ reduziu a frequência total de manchas em relação ao tratamento com 4NQO em todas as concentrações utilizadas (Tabela 3). Decréscimos significativos também foram observados nas manchas simples pequenas e grandes na concentração de 400  $\mu\text{M}$ .

No protocolo de pós-tratamento, não foram observadas alterações significativas nas frequências de todos os tipos de manchas quando se comparou o pós-tratamento de 3-ACQ ou 5-ACQ com o 4NQO isolado, com exceção das manchas gêmeas na concentração de 400  $\mu\text{M}$  (Tabela 4).

Tendo em vista estas diferenças, principalmente envolvendo o fato de que apenas o 4NQO produz danos no DNA causados por lesões oxidativas, acredita-se que os resultados relacionados à proteção de ambos os ácidos clorogênicos estejam associados à sua ação antioxidante, amplamente descrita na literatura (Aseervatham et al., 2016; Gul et al., 2016).

## Referências bibliográficas

- ASEERVATHAM, G. S. B., et al. Expression pattern of NMDA receptors reveals antiepileptic potential of apigenin 8-C-glucoside and chlorogenic acid in pilocarpine induced epileptic mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 82, p. 54-64, 2016.
- 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.
- 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*. *Mutation Research*, v. 334, p. 247-48, 1995.
- GUL, Z., et al. Protective Effects of Chlorogenic Acid and its Metabolites on Hydrogen Peroxide-Induced Alterations in Rat Brain Slices: A Comparative Study with Resveratrol. *Neurochemistry Research*, v. 41, p. 2075-85, 2016.
- KREMER, D., et al. Unremitting problems with chlorogenic acid Nomenclature: A review. *Química Nova*, v.39, p. 530-3, 2016.

## Resultados

**Tabela 1.** Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr3* do cruzamento padrão após exposição crônica de larvas de 3º estágio ao 3-ACQ e 5-ACQ e ao co-tratamento do 3-ACQ e 5-ACQ com EMS.

Tratamento <sup>a</sup>	N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. estatístico <sup>b</sup>				Total de Manchas mwh <sup>d</sup> (n)	
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) <sup>c</sup> m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) <sup>c</sup> m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de Manchas m = 2		
CN	60	0,50 (30)	0,10 (06)	0,03 (02)	0,63 (38)	38	
EMS 5 mM	60	55,82 (3349) *	19,17 (1150) *	10,93 (656) *	85,92 (5155) *	4986	
<b>3-ACQ</b> $\mu\text{M}$							
EMS (mM)							
200	5	60	53,95 (3237) -	19,02 (1141) -	12,70 (762) -	85,67 (5140) -	4935
400	5	60	51,13 (3068) -	18,82 (1129) -	11,25 (675) -	81,20 (4872) -	4632
800	5	60	47,27 (2836) -	17,97 (1078) -	11,05 (663) -	76,28 (4577) -	4343
<b>5-ACQ</b> $\mu\text{M}$							
EMS (mM)							
200	5	60	54,45 (3267) -	17,58 (1055) -	10,05 (603) -	82,08 (4925) -	4722
400	5	60	51,28 (3077) -	18,32 (1099) -	10,92 (655) -	80,52 (4831) -	4622
800	5	60	58,00 (3480) -	19,73 (1184) -	11,07 (664) -	88,80 (5328) -	5095

<sup>a</sup>CN: controle negativo, água destilada e deionizada. <sup>b</sup>Diagnóstico estatístico: \*, positivo; quando comparado ao CN através do teste binomial condicional; -, negativo quando comparado ao tratamento com EMS através do teste binomial condicional e teste U de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würzler, 1995); m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância  $\alpha = \beta = 0,05$ . <sup>c</sup>Inclui manchas simples *flr3* raras. <sup>d</sup>Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

**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 (46 mM) seguido do pós-tratamento com três concentrações de 3-ACQ e 5-ACQ.

Tratamento <sup>a</sup>	N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. estatístico <sup>b</sup>				Total de Manchas mwh <sup>d</sup> (n)	
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) <sup>c</sup> m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) <sup>c</sup> m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de Manchas m = 2		
CN	60	0,43 (26)	0,08 (05)	0,03 (02)	0,55 (33)	33	
EMS 46 mM	60	7,12 (427) *	7,88 (473) *	6,75 (405) *	21,75 (1305) *	1151	
<b>3-ACQ</b> $\mu\text{M}$							
EMS (mM)							
200	46	60	9,15 (549) -	7,18 (431) -	6,02 (361) -	22,35 (1341) -	1199
400	46	60	9,37 (562) -	6,90 (414) -	6,15 (369) -	22,42 (1345) -	1236
800	46	60	8,45 (507) -	6,77 (406) -	5,25 (315) -	20,47 (1228) -	1115
<b>5-ACQ</b> $\mu\text{M}$							
EMS (mM)							
200	46	60	8,80 (528) -	7,02 (421) -	6,10 (366) -	21,92 (1315) -	1196
400	46	60	9,53 (572) -	8,25 (495) -	6,73 (404) -	24,52 (1471) -	1323
800	46	60	7,62 (457) -	6,85 (411) -	5,90 (354) -	20,37 (1222) -	1072

<sup>a</sup>CN: controle negativo, água destilada e deionizada. <sup>b</sup>Diagnóstico estatístico: \*, positivo; quando comparado ao CN através do teste binomial condicional; -, negativo quando comparado ao tratamento com EMS através do teste binomial condicional e teste U de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würzler, 1995); m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância  $\alpha = \beta = 0,05$ . <sup>c</sup>Inclui manchas simples *flr3* raras. <sup>d</sup>Considerando os clones *mwh* e para as manchas gêmeas.

**Tabela 3.** Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr3* do cruzamento padrão (CP) após exposição crônica de larvas de 3º estágio ao co-tratamento do 3-ACQ e 5-ACQ com 4NQO.

Tratamento <sup>a</sup>	N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. estatístico <sup>b</sup>				Total de Manchas mwh <sup>d</sup> (n)	
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) <sup>c</sup> m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) <sup>c</sup> m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de Manchas m = 2		
CN	30	0,40 (12)	0,13 (04)	0,00 (00)	0,53 (16)	16	
4NQO 2 mM	30	1,10 (33) +	0,97 (29) +	0,43 (13) +	2,50 (75) +	70	
<b>3-ACQ</b> $\mu\text{M}$							
4NQO (mM)							
200	2	30	0,77 (23) -	0,90 (27) -	0,60 (18) -	2,27 (68) -	66
400	2	30	0,67 (20) +	0,47 (14) +	0,40 (12) -	1,53 (46) +	44
800	2	30	0,60 (18) +	0,90 (27) -	0,40 (12) -	1,90 (57) -	53
<b>5-ACQ</b> $\mu\text{M}$							
4NQO (mM)							
200	2	30	0,93 (28) -	0,47 (14) +	0,30 (09) -	1,70 (51) +	59
400	2	30	0,47 (14) +	0,60 (18) +	0,63 (19) -	1,70 (51) +	49
800	2	30	0,87 (26) -	0,73 (22) -	0,17 (05) -	1,77 (53) +	48

<sup>a</sup>CN: controle negativo, etanol 5% + Tween 80 5%. <sup>b</sup>Diagnóstico estatístico: \*, positivo; -, negativo quando comparado ao CN através do teste binomial condicional; +, positivo; -, negativo quando comparado ao tratamento com 4NQO através do teste binomial condicional e teste U de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würzler, 1995); m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância  $\alpha = \beta = 0,05$ . <sup>c</sup>Inclui manchas simples *flr3* raras. <sup>d</sup>Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

**Tabela 4.** 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 4NQO (30 mM) seguido do pós-tratamento com três concentrações de 3-ACQ e 5-ACQ.

Tratamento <sup>a</sup>	N. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. estatístico <sup>b</sup>				Total de Manchas mwh <sup>d</sup> (n)	
		Manchas simples pequenas (1-2 céls) <sup>c</sup> m = 2	Manchas simples grandes (>2 céls) <sup>c</sup> m = 5	Manchas gêmeas m = 5	Total de Manchas m = 2		
CN	30	0,40 (12)	0,00 (00)	0,03 (01)	0,43 (13)	13	
4NQO 30 mM	14	0,36 (05) *	0,79 (11) *	1,29 (18) *	2,43 (34) *	31	
<b>3-ACQ</b> $\mu\text{M}$							
4NQO (mM)							
200	30	26	0,69 (18) -	1,12 (29) -	0,81 (21) -	2,62 (68) -	60
400	30	21	0,67 (14) -	0,71 (15) -	0,76 (16) -	2,14 (45) -	40
800	30	24	0,54 (13) -	0,75 (18) -	0,58 (14) -	1,88 (45) -	37
<b>5-ACQ</b> $\mu\text{M}$							
4NQO (mM)							
200	30	15	0,07 (01) -	0,67 (10) -	0,60 (09) -	1,33 (20) -	16
400	30	24	0,58 (14) -	0,67 (16) -	0,50 (12) +	1,75 (42) -	39
800	30	28	0,71 (20) -	1,18 (33) -	0,93 (26) -	2,82 (79) -	70

<sup>a</sup>CN: controle negativo, etanol 5% + Tween 80 5%. <sup>b</sup>Diagnóstico estatístico: \*, positivo; -, negativo quando comparado ao CN através do teste binomial condicional; +, positivo; -, negativo quando comparado ao tratamento com 4NQO através do teste binomial condicional e teste U de Mann, Whitney e Wilcoxon (Frei e Würzler, 1995); m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância  $\alpha = \beta = 0,05$ . <sup>c</sup>Inclui manchas simples *flr3* raras. <sup>d</sup>Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.