

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Bioatividade de extrato de folhas de *Corema album* L. em *Drosophila melanogaster*:  
um estudo de genotoxicidade e stresse oxidativo**

Tese de Mestrado em Biologia Clínica e Laboratorial

Bruno Ricardo Ramos Loureiro

Orientadora: Prof. Doutora Isabel O'Neill De Mascarenhas Gaivão  
Coorientador Prof. Doutor Francisco Manuel Pereira Peixoto



Vila Real, 2013

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Bioatividade de extrato de folhas de *Corema album* L. em *Drosophila melanogaster*: um estudo de genotoxicidade e stresse oxidativo**

Dissertação de Mestrado em Biologia Clínica e Laboratorial

Bruno Ricardo Ramos Loureiro

Orientador: Professora Doutora Isabel O'Neill De Mascarenhas Gaivão  
Coorientador: Professor Doutor Francisco Manuel Pereira Peixoto

Composição do Júri:

Professora Doutora Ana Cristina Ramos Sampaio

Professora Doutora Paula Filomena Martins Lopes

Professora Doutora Isabel O'Neill De Mascarenhas Gaivão

Professor Doutor Francisco Manuel Pereira Peixoto

Vila Real, 2013

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer aos orientadores e pilares deste trabalho agradeço de uma forma sincera, à Professora Doutora Isabel O'Neill De Mascarenhas Gaivão pelo acompanhamento, empenho e preocupação constantes, pelas palavras de incentivo, pela disponibilidade demonstrada e, sobretudo, pela confiança em mim depositada além da enorme paciência que demonstrada durante as várias fases deste trabalho e ao Professor Doutor Francisco Manuel Pereira Peixoto, pela franqueza com me que tratou, pela ajuda que me disponibilizou e pela crítica que me ajudou a melhorar e também queria realçar a paciência demonstrada.

A Professora Doutora Maria Teresa Rangel Figueiredo pela disponibilidade demonstrada, e pela ajuda desenvolvida durante o tempo que passei na análise dos dados ao microscópio de fluorescência.

A todos os colegas dos vários laboratórios que frequentei durante todo o trabalho pela inestimável ajuda e camaradagem prestadas.

À Mónica e à Sofia pelo apoio dado e pela crítica construtiva que permitiu melhorar constantemente, assim como a todos os outros amigos e amigas por todo o apoio demonstrado e palavras de incentivo.

Um agradecimento especial aos meus pais por todos os esforços despendidos por eles para que eu pudesse ter a oportunidade de realizar este trabalho e à minha irmã pelo seu grande apoio.

A todos os que não estão aqui mencionados mas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado a todos.

## Resumo

Os radicais que derivam do O<sub>2</sub>, conceptualmente chamados de espécie reativas de oxigênio (ROS), podem conduzir a um saldo negativo entre oxidantes e antioxidantes, provocando desta forma o stresse oxidativo. O stresse oxidativo pode causar vários danos como a peroxidação lipídica e está associado a processos cancerígenos e genotóxicos. Utilizando *Drosophila melanogaster* Oregon K como organismo modelo, analisamos o efeito que os extratos foliares de *Corema álbum* provocam nesse organismo modelo e foram considerados vários aspetos: i) a toxicidade revelada pelos número de mutações e recombinações somáticas; ii) a capacidade antioxidante dos extratos foliares; iii) o nível de danos basais em neuroblastos; iiiii) e o papel do stresse oxidativo, avaliando as atividades da Superóxido Dismutase, da Catalase, da Glutathione-S-Transferase e a peroxidação lipídica. Os extratos mostraram-se bastante antioxidantes, em 1 g de folha existem 7,3 mg de equivalentes de GAE ou 36,9 micromoles de equivalentes de Trolox, mas em concentrações mais elevadas não se conseguiu a obtenção de qualquer descendência. Os danos basais detetados sofrem reduções à medida que a concentração do extrato vai diminuindo ocorrendo o inverso nas atividades antioxidante e na peroxidação lipídica. Nos tratamentos onde temos o controlo positivo (paraquato), em conjunto os extratos foliares o comportamento observado continua existir e a ocorrer da mesma forma. No caso do tratamento da concentração mais baixa de extrato observa-se uma resposta antioxidante mais elevada que em qualquer outro tratamento na Superóxido Dismutase e na Glutathione-S-Transferase. Verificou-se nesse mesmo tratamento uma das maiores percentagens de mutação e recombinação somática mas verificou-se também o mais baixo nível de danos basais. Embora os extratos tenham uma grande capacidade antioxidante eles mostram um efeito dual pois para além de promoverem o stresse oxidativo, também causaram toxicidade e genotoxicidade independentemente da relação oxidante/antioxidante.

Palavras-chave: Stresse oxidativo; *Corema album*; Genotoxicidade; *Drosophila melanogaster*; Antioxidantes

## Abstract

The radicals deriving from O<sub>2</sub>, known as reactive oxygen species (ROS), can lead to a negative balance between oxidants and antioxidants, thereby causing oxidative stress. Oxidative stress can cause damages like lipid peroxidation and is also associated with genotoxic and carcinogenic processes. Using *Drosophila melanogaster* Oregon K as a model organism, we analyzed the effect of *Corema album* leaf extracts and considered the following aspects: i) the toxicity revealed by the number of somatic mutations and recombinations, ii) the antioxidant capacity of the plant extracts; iii) the basal level of damage in neuroblasts; iiiii) and the role of oxidative stress, assessing the activities of Superoxide Dismutase of Catalase, Glutathione-S-transferase and lipid peroxidation. The antioxidant capacity of the extracts was substantial with 1 g of leaf extract equivalent to 7.3 mg of GAE or to 36,9 micromoles Trolox equivalents. At higher concentrations it was not able to obtain offsprings. The observed basal damage decreased as the concentration of the extract decreased and the opposite was true in relation to the antioxidant activities and lipid peroxidation. In the treatments where the positive control (paraquat) was applied in addition to the plant extract, the observed behaviour still existed and occurred in the same way. In the case of the treatment with lower concentrations of extract, the antioxidant response is higher than any other treatment in the superoxide dismutase and glutathione-S-transferase. This same treatment caused one of the highest percentages of somatic mutation and recombination but showed the lowest level of basal damage.

Although the extracts have a great antioxidant capacity they show a dual effect because they promoted oxidative stress as well as a toxic and genotoxic effect that was independent of the oxidant / antioxidant ratio..

Key words: Oxidative stress; *Corema album*; Genotoxicity; *Drosophila melanogaster*; Antioxidants.

# Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	II
Abstract .....	III
Índice.....	IV
Índice De Tabelas.....	VI
Índice De Gráficos .....	VII
Glossário e Abreviaturas .....	VIII
1 Introdução .....	1
1.1 Stresse Oxidativo.....	1
1.2 Genotoxicidade.....	2
1.3 Proteção antioxidante .....	3
1.4 Enzimas antioxidantes.....	4
1.4.1 Superóxido dismutase .....	4
1.4.2 Catalase .....	4
1.4.3 Glutationa-S-Transferase .....	5
1.5 Antioxidantes .....	6
1.6 Camarinha ( <i>Corema album</i> ).....	6
1.7 <i>Drosophila melanogaster</i> .....	9
2 Objetivos .....	11
3 Material e Métodos.....	12
3.1 Metodologia Geral.....	12
3.1.1 Material Biológico.....	12
3.1.2 Preparação dos extratos.....	12
3.1.3 Método .....	13
3.1.4 Método alternativo .....	14
3.2 SMART .....	14
3.3 Ensaio do cometa .....	14
3.4 Atividade Antioxidante .....	16
3.4.1 Método de descoloração do radical ABTS.....	16
3.4.2 Método do radical DPPH .....	17
3.5 Quantificação da proteína.....	18
3.6 Stresse Oxidativo.....	18

3.6.1	Superóxido dismutase .....	18
3.6.2	Catalase .....	19
3.6.3	Glutathione S-transferase .....	19
3.6.4	Avaliação da peroxidação lipídica pelo método dos TBARS .....	19
3.7	Análise estatística.....	20
4	Resultados .....	22
4.1	Frutos de <i>Corema album</i> .....	22
4.2	Toxicidade.....	22
4.3	Genotoxicidade e mutagenicidade.....	24
4.3.1	Ensaio do Cometa.....	24
4.3.2	Teste SMART .....	32
4.4	Stresse oxidativo e atividade antioxidante .....	33
4.4.1	TBARS .....	34
4.4.2	Atividade antioxidante .....	36
5	Discussão.....	41
6	Conclusões .....	46
7	Perspetivas futuras.....	47
8	Bibliografia .....	48

## Índice De Tabelas

Tabela 1: Valores de <i>p</i> da comparação dos resultados do ensaio do cometa entre os diferentes grupos, obtidos pelo teste Mann-Whitney bilateral.....	25
Tabela 2: Valores de <i>p</i> da comparação resultados do ensaio do cometa entre os grupos com a FPG, obtidos pelo teste Mann-Whitney bilateral .....	27
Tabela 3: Valores de <i>p</i> da comparação resultados do ensaio do cometa entre os grupos do ensaio teste, obtidos pelo teste Mann-Whitney bilateral.....	29
Tabela 4: Valores de <i>p</i> da comparação resultados do ensaio do cometa entre os grupos do ensaio teste com a FPG, obtidos pelo teste Mann-Whitney bilateral .....	31
Tabela 5: Resultados obtidos pelo teste SMART w/w <sup>+</sup> com os 11 tratamentos diferentes .....	33
Tabela 6: Resultado do teste do X <sup>2</sup> de dupla decisão. + Positivo; - Negativo; i Inconclusivo; W <sup>+</sup> Fracamente positivo .....	33
Tabela 7: P value obtido pelo teste Mann-Whitney bilateral do cruzamento dos resultados do teste dos TBARS .....	35
Tabela 8: P value obtido pelo teste Mann-Whitney bilateral do cruzamento dos resultados dos níveis de Catalase.....	37
Tabela 9: P value obtido pelo teste Mann-Whitney bilateral do cruzamento dos resultados dos níveis da Superóxido dismutase .....	39
Tabela 10: P value obtido pelo teste Mann-Whitney bilateral do cruzamento dos resultados dos níveis Glutathiona-S-Transferase .....	40

## Índice De Gráficos

Gráfico 1: <i>Números de adultos eclodidos em cada tratamento com extratos das folhas no ensaio teste</i> .....	23
Gráfico 2: <i>Números médios de adultos eclodidos em cada tratamento com extratos das folhas</i> .....	23
Gráfico 3: <i>Níveis de dano basais médios e respetivo desvio padrão nos vários tratamentos em neuroblastos em unidades arbitrárias. Visualizado ao microscópio de fluorescência e medido pelo número e tipo de cometas.</i> .....	25
Gráfico 4: <i>Níveis de dano basais médios e respetivo desvio padrão nos vários tratamentos na presença de FPG em neuroblastos em unidades arbitrárias. Visualizado ao microscópio de fluorescência e medido pelo número e tipo de cometas.</i> .....	27
Gráfico 5: <i>Níveis de dano basais médios e respetivo desvio padrão nos vários tratamentos do ensaio teste em neuroblastos em unidades arbitrárias. Visualizado ao microscópio de fluorescência e medido pelo número e tipo de cometas.</i> .....	29
Gráfico 6: <i>Níveis de dano basais médios e respetivo desvio padrão nos vários tratamentos no ensaio teste em neuroblastos em unidades arbitrárias. Visualizado ao microscópio de fluorescência e medido pelo número e tipo de cometas.</i> .....	31
Gráfico 7: <i>Reta de calibração da atividade antioxidante pelo teste do DPPH e localização do nível antioxidante do extrato foliar nessa mesma reta</i> .....	34
Gráfico 8: <i>Reta de calibração da atividade antioxidante pelo teste do ABTS e localização do nível antioxidante do extrato foliar nessa mesma reta</i> .....	34
Gráfico 9: <i>Níveis de MDA em <math>\mu\text{M}/\text{mg}</math> obtidos pelo teste dos TBARS nos vários grupos testados</i> .....	35
Gráfico 10: <i>Níveis de atividade da Catalase medida com um eléctrodo de oxigénio (Hansatech) tipo Clark</i> .....	37
Gráfico 11: <i>Níveis de atividade da Superóxido dismutase medida com por espectrofotometria utilizando o sistema xantina-xantina oxidase</i> .....	39
Gráfico 12: <i>Níveis de atividade da Glutathiona S-transferase medida com por espectrofotometria medindo a formação de conjugado de CDNB</i> .....	40

## **Glossário e Abreviaturas**

**ABTS<sup>•+</sup>** - 2,2'Azinobis (3- Etilbenzotiazolina -6- Sulfónico)

**BHT** –Hidroxitolueno Butilado

**BSA** - Soro de Albumina Bovina

**Camarinha** – *Corema album* L.

**CAT** – Catalase

**CDNB** - 1-Cloro-2,4-Dinitrobenzeno

**Cu** – Cobre

**CuSO<sub>4</sub>** . Sulfato de Cobre (II)

**DAPI** - 4',6-Diamidino-2-Fenilindole

**ADN** - Ácido Desoxirribonucleico

**DPPH** - 2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazilo

**ECSOD** – Extra celular Superóxido Dismutase

**ECVAM** - Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos

**EDTA** - Ácido Etilenodiamina Tetraacetico

**HCl** - Ácido Clorídrico

**HEPES** – Ácido 4-2-Hidroxietil Piperazinaetanosulfonico

**Fe** - Ferro

**FPG** - Formamidopirimidina-DNA Glicosilase

**G** – força G

**GAE** – Equivalente de Ácido Gálico

**GR** - Glutathiona Redutase

**GSH** – Glutathiona Reduzida

**GSHpx** - Glutathione Peroxidase

**GST** - Glutathione-S-Transferase

**K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>** - Persulfato De Potássio

**KCl** - Cloreto de Potássio

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** - Fosfato Monopotássico

**KOH** - Hidróxido de Potássio

**LMP** – Baixo Ponto de Fusão

**M** – Molar

**MDA** – Malondialdeído

**Min** – Minutos

**mM** – Milimolar

**Mn** - Manganês

**NBT** – Cloreto Nitroblue tetrazolium

**PBS** – Tampão Fosfato Salino

**RCF** - Força Centrifuga Relativa

**ROS** – Espécies Reativas de Oxigênio

**SDS** - Dodecil Sulfato De Sódio

**SMART** - Teste de verificação de Mutações e Recombinações Somáticas

**SOD** - Superóxido Dismutase

**TBA** - Ácido Tiobarbiturico

**TBARS** - Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbiturico

**Triton X-100** - Polietileno Glicol Octilfenol Eter

**Tris** - Trisaminometano

**Trolox** - Ácido 6- Hidroxi- 2,5,7,8- Tetrametilcromano- 2- Carboxílico

**TCA** –Ácido Tricloroacético

**Zn** - Zinco

# 1 Introdução

À medida que na atmosfera e nos oceanos as concentrações de O<sub>2</sub> aumentavam foram surgindo seres vivos aeróbios que além de utilizarem este composto para a sua sobrevivência foram ainda capazes de obter vantagens energéticas.

Os organismos aeróbios, incluindo o ser humano, têm de conviver com a realidade da dependência do oxigénio. Esta dependência não seria um problema se este não pudesse apresentar repercussões negativas para o organismo. Estes efeitos têm vindo a ser estudados desde à algumas décadas devido ao facto de radicais que derivam do O<sub>2</sub> poderem tornar-se altamente reativas, concetualmente chamadas de espécies reativas de oxigénio (ROS).

Estes radicais podem ter um efeito nefasto caso não sejam contrapostos por ação de antioxidantes, podendo ser tóxicos e perigosos para a sobrevivência do individuo, daí que durante a evolução os seres vivos tenham desenvolvido sistemas de defesa. Na defesa contra os agentes oxidantes é também importante a obtenção de antioxidantes pela alimentação.

## 1.1 Stresse Oxidativo

O stresse oxidativo resulta do saldo negativo entre oxidantes e antioxidantes, mas este saldo negativo pode ser fruto de causas exógenas que provocam uma diminuição nas defesas antioxidantes ou um aumento na produção de ROS endógeno. O termo “stresse oxidativo” apareceu pela primeira vez numa publicação em 1970, mas já em 1954 Rebecca Gerschman observou que a toxicidade do oxigénio era de alguma forma semelhante à encontrada aquando a utilização de raios X [1]. Um trabalho realizado por Beutler em 1970 sobre a glutathione redutase de glóbulos vermelhos, em que a hemólise era provocada por condições oxidantes, realçou também a problemática do stresse oxidativo [2].

Em 1985 foi lançado o livro intitulado “ Oxidative stress ” por Sies H. em que o autor define como stresse oxidativo “*o balanço entre oxidantes e antioxidantes favorável aos oxidantes, potencialmente capaz de causar dano*”. A possibilidade do stresse oxidativo causar danos tem sido suportada por numerosos trabalhos já publicados e que deram em parte origem à definição do termo stresse oxidativo. Desde a

altura em que foi descrito e até mesmo antes, o stresse oxidativo tem sido relacionado com várias teorias entre as quais a teoria do envelhecimento. Essa teoria, apoiada na hipótese oxidativa, foi parcialmente colocada em 1958 por Denham Harman, tendo sido revista e modificada em 1972 [3].

O interesse pelo estudo do stresse oxidativo tem crescido também em parte pelo facto de este estar envolvido em algumas etiologias do cancro. Segundo vários investigadores o stresse oxidativo pode ser o primeiro causador dos erros e mutações na regulação do ciclo celular que levam ao aparecimento de células cancerígenas [4,6,7]. Desta forma, atualmente o estudo do stresse oxidativo está intimamente ligado ao estudo do aparecimento e progressão cancerígena. Alguns estudos demonstram que os alvos primários das ROS são os ácidos gordos polinsaturados presentes nas membranas celulares conduzindo assim à peroxidação lipídica, processo que pode causar danos celulares ao nível estrutural e funcional. A peroxidação lipídica tem como um dos produtos resultantes o malondialdaído (MDA), tendo este um papel importante como indicador dos níveis de stresse oxidativo [5]

## **1.2 Genotoxicidade**

A palavra “tóxico” é uma palavra que tem tido ao longo dos tempos várias definições. Na língua portuguesa, tóxico ou substância tóxica é aquela que produz efeitos nocivos no organismo [8]. Os diversos tipos de tóxicos podem ser divididos quanto ao seu modo de ação ou origem. Devido à importância do estudo dos tóxicos foi necessária a criação de uma ciência que os estuda, a toxicologia. Tal como acontece com o seu objeto de estudo, a toxicologia tem também tido várias definições ao longo do tempo. Segundo a Sociedade de toxicologia (SOT) *“A Toxicologia é o estudo dos efeitos adversos de agentes químicos, físicos e biológicos em organismos vivos e no ecossistema, incluindo a prevenção e melhoria de tais efeitos adversos”* [9].

Existem várias divisões para a toxicologia, sendo que a toxicologia moderna é constituída por quatro disciplinas principais: clínica, forense, reguladora e de investigação. Em função da área de atividade adotam-se as seguintes subdivisões: Ecotoxicologia, Toxicologia Alimentar, Toxicologia Clínica, Toxicologia Experimental, Toxicologia Forense, Toxicologia Industrial, Toxicologia dos Medicamentos, Toxicologia Ocupacional, Toxicologia Regulamentadora e Toxicologia Genética [10]

Um genotóxico é todo o composto que é tóxico para o ADN. Substâncias que são genotóxicas podem ligar-se diretamente ao ADN ou podem também atuar indiretamente, provocando danos no ADN por afetarem enzimas envolvidas na sua replicação. Assim os genotóxicos podem provocar mutações que podem dar origem a defeitos congênitos (danos hereditários) ou cancro [11]. Apesar do efeito das substâncias genotóxicas estar correlacionado com a carcinogénese, não podemos dizer taxativamente que uma substância genotóxica é cancerígena [12,13].

A avaliação da genotoxicidade de um composto ou extrato é de extrema importância, pelo que existe uma grande panóplia de testes que podem ser utilizados para a avaliação da genotoxicidade. Os parâmetros fenotípicos são ainda uma forma de deteção de genotóxicos, sendo normalmente complementados por outros processos que permitem obter informações mais específicas sobre os danos. Os genotóxicos podem atuar no ADN causando danos ao nível da estrutura e do número de cromossomas bem como na estrutura da própria cadeia de ADN, podendo ser algumas alterações facilmente detetada por técnicas citogenéticas. No entanto, a informação dada por estes marcadores individualmente pode ser limitada e restrita às sequências de nucleótidos avaliadas. De forma a contrariar este problema dever-se-ia utilizar uma bateria de técnicas o mais alargada possível. Além destas técnicas moleculares existem outras técnicas como é o caso do ensaio do cometa e o teste SMART que são muito utilizadas para a deteção genotoxicidade.

Segundo alguns estudos a genotoxicidade pode estar correlacionada, em alguns casos, com os níveis elevados de ROS e o stresse oxidativo [14-17].

### **1.3 Proteção antioxidante**

A proteção antioxidante pode dividir-se em duas grandes vertentes, a enzimática e a não enzimática. A proteção enzimática é encontrada em seres vivos eucariontes e procariontes permitindo que estes tenham capacidade de transformar ROS em espécies menos reativas. Entre os sistemas não enzimáticos temos como exemplo algumas vitaminas [18,19] e polifenóis [19,20]. Entre as enzimas antioxidantes temos a catalase, peroxidases, superóxido dismutase, glutathione s-transferase, glutathione reductase, entre outras. [19]

## 1.4 Enzimas antioxidantes

Há várias enzimas antioxidantes que entram na defesa dos organismos contra os ROS. Entre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do ser humano destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSHpx), que constituem a primeira defesa endógena de neutralização das ROS. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxido de hidrogénio, evitando assim a formação do radical hidroxilo OH. [21] Além destas enzimas destacam-se ainda a glutathione reductase (GR) e a glutathione-S-transferase (GST).

O estudo da atividade antioxidante enzimática pode envolver o estudo de todas estas enzimas referidas ou de apenas algumas dependendo do objeto de estudo onde o trabalho irá ser realizado.

### 1.4.1 Superóxido dismutase

A primeira isoforma de SOD foi descoberta em 1969 por J. McCord e I. Fridovich [22]. As superóxido dismutase são metaloenzimas amplamente distribuídas pelas células tanto de organismos eucariontes como procariontes. Esta família de enzimas catalisa o aníon superóxido a peróxido de hidrogénio,  $O_2^- + H_2O \rightarrow H_2O_2 + O_2$ . Foram até agora encontradas três isoformas de SOD em eucariontes, conhecidas como SOD1, SOD2 e SOD3 ou CuZnSOD, MnSOD e a superóxido dismutase extra celular (ECSOD) respetivamente. E em procariontes apenas duas isoformas, MnSOD e a FeSOD foram encontradas. A ECSOD foi a mais recentemente descoberta encontrando-se no meio extracelular [23]. Os genes que dão origem a síntese das superóxido dismutase são encontrados em cromossomas diferentes, sendo regulados de formas diferentes e tendo uma percentagem de homologia de aminoácidos baixa, 40% entre CuZnSOD e ECSOD, ou inexistente, MnSOD não tem qualquer homologia com as CuZnSOD e ECSOD [24].

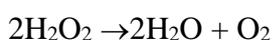
### 1.4.2 Catalase

Nos peroxissomas dá-se um grande consumo de  $O_2$  não existindo produção de ATP nesse processo, conduzindo a que a energia livre seja libertada na forma de calor. Esse facto associado a processos metabólicos que contribuem para a formação de  $H_2O_2$  nos

peroxissomas, como a  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos e as reações enzimáticas das flavinas oxidases, tornam os peroxissomas num organelo produtor de ROS [25]. Para manter o equilíbrio entre produção e degradação dessas espécies reativas, os peroxissomas possuem vários mecanismos de defesa antioxidante, sendo a CAT a enzima mais expressa.

Apesar da atividade da CAT estar localizada em grande quantidade nos peroxissomas esta pode também ser na mitocôndria (coração) e no retículo endoplasmático [21]. O peróxido de hidrogénio é removido pela ação da CAT que reage com duas moléculas de  $H_2O_2$  formando duas moléculas de  $H_2O$  e uma de  $O_2$  [26].

Reação catalisada pela CAT:



### 1.4.3 Glutathione-S-Transferase

Estas enzimas pertencem a uma ampla família de enzimas multifuncionais, envolvidas na desintoxicação de uma variedade de compostos incluindo os inseticidas [27]. Há duas classes de GSTs, classificadas de acordo com sua localização na célula, no retículo endoplasmático ( <5% ) ou citoplasma ( >95% ) [28], sendo que os seus substratos são normalmente hidrofóbicos [29]. Estas enzimas desempenham importante função no stresse fisiológico, estando também implicadas no transporte intracelular e cascatas biossintéticas [30].

A desintoxicação enzimática de xenobióticos pode ser classificada em três fases distintas mas relacionadas: fase I, II e III. Nas fases I e II, observa-se a transformação do xenobiótico numa espécie mais hidrossolúvel e geralmente com uma menor toxicidade. Na fase III, estes metabolitos são transportados para o exterior da célula e então excretados. A fase II do metabolismo de xenobióticos é um importante passo para a eliminação destas espécies do meio celular, podendo em alguns casos envolver a participação de transportadores como os transportadores dos conjugados de glutathione/xenobióticos [31]. Assim a GST tem a capacidade de conjugar a glutathione reduzida (GSH) com grupos bioativos, e que resultam por exemplo da ação da monooxigenase em biotransformação de xenobióticos,  $RH + O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow ROH + H_2O$  [32-35].

A importância desta classe de enzimas é enorme tendo em vista o conjunto de reações de defesa onde elas intervêm, estando ela bem ilustrada nos estudos feitos em insetos que relacionam a resistência a inseticidas a uma alta concentração de uma ou mais enzimas GSTs [36,28].

Na atualidade a maior parte dos produtos agrícolas consumidos pela espécie humana advêm de uma agricultura que utiliza um leque variado de químicos para aumento da produção e proteção das culturas. Assim a importância destas enzimas acresce visto que foram estudados, por exemplo, vários mecanismos de defesa envolvendo-as na resistência a organofosforados, carbamatos, piretróides, Organoclorados entre outros xenobióticos [37-39].

## 1.5 Antioxidantes

Os antioxidantes fornecidos pela alimentação têm um papel muito relevante na saúde e bem-estar nos animais, nomeadamente no ser humano, pois estes podem reduzir os riscos resultantes do stresse oxidativo.

Os antioxidantes estão presentes em grande parte dos alimentos presentes na alimentação humana, nomeadamente nos de origem vegetal [40,41], alimentos ricos em vitaminas e minerais. Deste modo o estudo de possíveis fontes de antioxidantes tem interesse do ponto de vista científico, médico, nutricional e comercial. Estes factos tornam a obtenção de antioxidantes em grandes quantidades, sem a necessidade de ingestão de grandes quantidades de alimento, de elevada importância e utilidade no dia-a-dia do ser humano.

Há vários estudos sobre antioxidantes em vários alimentos, principalmente nos que constituem a base da alimentação humana, cereais, leguminosas e frutas. Existe, no entanto, uma grande variedade de plantas que podem ter um fator antioxidante interessante e que ainda não foram muito investigadas, como por exemplo a *Corema album*.

## 1.6 Camarinha (*Corema album*)

O género *Corema* compreende apenas duas espécies com uma distribuição disjunta; *Corema conradii* nos sistemas dunares de rochas ígneas da costa NE

(Nordeste) dos Estados Unidos e SE (Sudeste) do Canadá e *Corema album* (*C. album*)[42].

*Corema album* é um arbusto dioico endêmica da Península Ibérica, cresce em áreas costeiras de areia do Norte da Galiza a Gibraltar [43,44] existindo uma subespécie nas areias vulcânicas dos Açores [42], *Corema album azoricum*, é também possível encontrar a *C. album* em França [45].

É um arbusto com flores pequenas cuja polinização é anemófila, os seus ramos estendem-se lateralmente, podendo atingir vários metros de comprimento e raramente ultrapassa 1 metro de altura [44]. O número de flores por inflorescência varia conforme os sexos, não excedendo, no entanto, as 20 [42]. As flores masculinas, com 3 estames de cor avermelhada, dispõem-se em inflorescências terminais, as flores femininas estão agrupadas no mesmo tipo de inflorescência tendo 3 ovulos, com pétalas de 1mm e o estigma trífido saliente.

As folhas da *C. album* são muito reduzidas, ericoides, com uma cutícula muito espessa na página superior, enrolando-se sobre a página inferior de modo a proteger os estomas, evitando desta forma grandes perdas de água por transpiração permitindo assim uma melhor adaptação aos habitats costeiros que ocupa, onde a mobilidade das areias e a falta de água e nutrientes reduzem drasticamente a competição.[46]

Apesar de ser uma espécie dioica têm já sido observados indivíduos hermafroditas [43]. O "papel" destes indivíduos hermafroditas e o seu número nas populações biogeográficas ainda não está bem explicado [43]. Tem no entanto sido discutida a relação entre a reprodução e o crescimento vegetativo nas três formas sexuais de *C. album*. Os frutos maduros dos hermafroditas são substancialmente menos carnudos que os de plantas femininas, sendo que o "esforço" reprodutivo desenvolvido pelas plantas do sexo feminino é maior do que o das plantas masculinas ou hermafroditas [43].

As plantas apresentam diferenças quanto ao potencial hídrico, dependendo do sexo que têm, neste aspeto os machos apresentam valores menos negativos do que as fêmeas ou os hermafroditas, no início do verão. Isto pode ser explicado pelo facto de os machos não terem necessidades hídricas acrescidas causadas pelos frutos [43].

Após a floração (entre fevereiro e abril) as plantas femininas e hermafroditas produzem frutos tipo baga, que envolvem entre duas a nove sementes [43,46]. Estas pequenas bagas de forma esférica (5-8 mm de diâmetro) cor branca, rosa e até

avermelhada iniciam a sua formação em meados de abril, a sua maturação começa no fim do verão e perdura até novembro/dezembro [42].



**Fig. 1** Fotografia de *Corema album*, com frutos em evidência, em Ovar, Portugal

São bagas comestíveis (Fig.1), ricas em açúcares e água e representam uma fonte alimentar importante para as comunidades animais. As sementes possuem um endocarpo lenhoso e elevada dormência [47], que pode ir até 4 anos [48]. No Noroeste de Espanha *C. album* é ingerida e disseminada por vários géneros de aves, incluindo a gaivota-de-patas-amarelas (*Larus cachinnans* Pallas) [49,50], o melro (*Turdus merula* Linnaeus) e pequenos passeriformes, assim como por pequenos répteis e pelo coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus). Na costa atlântica portuguesa *C. album* é também dispersa pelo coelho-bravo e ainda por raposas (*Vulpes vulpes* Linnaeus) [51] a *C. album* constitui ainda parte da dieta do texugo (*Meles meles* Linnaeus) no Sul de Espanha [52].

Apesar de ser uma das espécies mais características dos sistemas dunares em Portugal e de apresentar uma importância considerável para alguns animais, os limites de distribuição da *Corema album* encontram-se claramente em regressão [51,53,54] e algumas das suas populações encontram-se envelhecidas. Em Portugal *Corema album* integra um habitat nas Dunas litorais com *Juniperus* spp., o qual é considerado prioritário pela sua distribuição restrita e elevada vulnerabilidade. Ao longo da sua distribuição, algumas das populações apresentam-se envelhecidas e sem regeneração,

outras extinguíram-se localmente [51,53]. Esta regressão deve-se principalmente à destruição dos sistemas dunares para fins urbanísticos e recreativos, e à plantação e avanço de espécies exóticas como os pinheiros (*Pinus pinaster* Aiton), as retamas (*Retama monosperma* (L.) Boiss.), as acácias e o chorão [51,54]. Isto tem levado a um aumento da competição pelo mesmo nicho ecológico além da diminuição dos seus vetores de propagação

Vários estudos realizados sobre a regeneração de *C. album* indicam que esta está inteiramente dependente de agentes animais para a sua dispersão e para a germinação das suas sementes [49,51]. Os frutos são ingeridos e posteriormente as sementes são dispersas via defecação ou regurgitação, destes processos resulta uma escarificação física e química da casca da semente, que deste modo se torna mais permeável à passagem de água e gases, e à perceção de sinais exteriores necessários ao início do processo germinativo [55-57].

A redução da sua população aliada à importância dos seus frutos e à sua localização geográfica restrita, torna esta planta num objeto de estudo interessante, tanto do ponto de vista ecológico, de preservação, comercial e de análise da bioatividade de alguns dos seus metabolitos secundários.

## **1.7 *Drosophila melanogaster***

O estudo realizado em linhas celulares tem a vantagem de os testes serem feitos em células que podem ser humanas. Estes estudos permitem avaliar a toxicidade, o efeito protetor ou reparador, etc. No entanto, apesar dos resultados serem obtidos em células humanas estes não podem ser extrapolados diretamente para o ser humano, pois o ser humano é um organismo complexo com uma dinâmica intercelular enorme, sendo redutor uma simples transferência das informações recolhidas pelos resultados obtidos nas linhas celulares [58]. Assim para o estudo e compreensão dos efeitos de substâncias antioxidantes é importante a utilização de organismos modelo com um sistema de defesa antioxidante semelhante ao humano [59,60], onde a *Drosophila melanogaster* tem um papel importante pois é um modelo bem estabelecido para doenças humanas e toxicologia apesar de não ser um mamífero [61]

A *Drosophila melanogaster* é um inseto da família Drosophilidae, sendo uma das mais de 1300 que esta família tem [62]. As drosófilas alimentam-se de leveduras em

frutos já caídos em início de decomposição [62]. Esta espécie é um dos modelos animais mais utilizados em experiências de genética, sendo dos mais importantes organismos modelo em Biologia. O uso de drosófila tem sido recomendado pelo Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos (ECVAM), que tem o objetivo de promover e regulamentar a aceitação científica a métodos que cumpram os 3Rs (*reduce, refine and replace*) do uso de animais de laboratório [63,64].

Na natureza a forma de *Drosophila melanogaster* dominante tem o corpo cinzento, olhos vermelhos e asas longas e é designada por forma selvagem. No entanto, também existem outras formas com características alternativas como, por exemplo olhos brancos, corpo preto ou asas vestigiais [65]. É costume representar-se a constituição genética das formas alternativas pela letra inicial da palavra inglesa que expressa a característica que elas manifestam. Por exemplo, o alelo para olhos brancos representa-se por *w* (de *white*). Quando este *locus* é ocupado pelo alelo da forma selvagem, este representa-se pela mesma letra afetada do sinal + ( $w^+$ ).

Na drosófila, como na maioria dos animais, a diferenciação sexual depende de um par de cromossomas sexuais. Os indivíduos que apresentam dois cromossomas sexuais idênticos dizem-se homogaméticos e os que apresentam dois cromossomas sexuais diferentes entre si dizem-se heterogaméticos. As fêmeas de drosófila possuem dois cromossomas X, ao passo que os machos possuem os mesmos autossomas mas um cromossoma X e um cromossoma Y. O sexo heterogamético é, pois, o sexo masculino [66,67].

A drosófila é um modelo tão popular pelo facto devido a sua facilidade de manutenção e manuseamento em laboratório: ciclo de vida curto (aproximadamente duas semanas a 25°C) com várias fases durante o mesmo, as fêmeas têm uma alta taxa de postura, fácil de cruzar, resistente, prolífica, desenvolve-se à temperatura ambiente, poucas exigências alimentares, pequeno espaço de cultura, cromossomas politenos no estado larvar, existência de coleções de mutantes depositadas em bases de dados de livre acesso [68,69]. O facto de estas terem cromossomas politenicos (gigantes) nas glândulas salivares ajudam a fornecer uma maior informação estrutural que os cromossomas normais. A possibilidade de vê-los por microscopia ótica durante na interfase permite-nos obter mais informações sobre o comportamento dos cromossomas durante o ciclo celular [70,71]. Além destas vantagens como organismo modelo, a drosófila devido às suas características tem sido também utilizada como organismo modelo em estudos toxicológicos [72-80] sendo assim um organismo interessante e útil em investigação.

## 2 Objetivos

- Avaliar a possível existência de capacidade antioxidante do extrato metanólico de folhas de *Corema album*
- Verificar se o extrato metanólico de folhas de *Corema album* revela alguma influência no número de adultos eclodidos no modelo animal *Drosophila melanogaster*.
- Verificar se o extrato metanólico de folhas de *Corema album* revela genotoxicidade no modelo animal *Drosophila melanogaster*
- Observar a relação entre o extrato metanólico de folhas de *Corema album* e um agente agressor, paraquato, no modelo animal *Drosophila melanogaster*.

## 3 Material e Métodos

### 3.1 Metodologia Geral

#### 3.1.1 Material Biológico

- *Drosophila melanogaster* Oregon K, descendência heterozigótica ( $w/w^+$ ) obtida através do cruzamento de machos recessivos ( $w/0$ ) com fêmeas virgens homozigoticamente dominantes ( $w^+/w^+$ )

- Folhas e frutos de *Corema álbum* recolhidos em julho de 2011 na região de Ovar

#### 3.1.2 Preparação dos extratos

##### -Extratos dos Frutos

O processo de obtenção do extrato dos frutos foi através de maceração de três amostras de camarinhas com 3 g em almofarizes diferentes. Posteriormente adicionou-se 5 ml de água ultra pura a cada macerado e a depositou-se o mesmo em tubos Falcon devidamente identificados. Após este passo homogeneizou-se a solução nos tubos Falcon no vortex durante 5 min e centrifugou-se a mesma a 4000 G de modo a depositar e separar os restos das sementes e das membranas. O sobrenadante resultante foi posto em novos tubos Falcon devidamente identificados.

##### -Extratos das Folhas

A extração foliar teve de ser feita através de um solvente orgânico devido a concentração de compostos orgânicos existentes nelas. Assim usou-se de uma solução com metanol, 50%, e com água ultra pura, os outros 50% da solução. Depois da recolha de 3 g folhas de camarinhas divididas em 3 amostras separadas de 1g cada, desprezando aquelas presentes nas zonas meristemais, com o auxílio de Azoto líquido promoveu-se a maceração das mesmas em 3 almofarizes diferentes, um para cada amostra. Depois cada macerado foi

colocado num tubo Falcon devidamente identificado no qual se procedeu à extração com a solução de metanol/água, obtida anteriormente. Procedeu-se homogeneização de cada macerado com 5 ml da solução de metanol/água, agitando em vórtice durante 4 min. Seguidamente decantou-se a fase sólida e transferiu-se o sobrenadante de cada tubo Falcon para um novo tubo, no qual se procedeu a uma centrifugação a 4000 G. O sobrenadante obtido é sujeito aos passos descritos anteriormente até se obter um sobrenadante sem qualquer sólido e só então é filtrado num filtro de 0,45µm.

### 3.1.3 Método

Procedeu-se à introdução de 10 machos recessivos ( $w/0$ ) e de 10 fêmeas virgens homocigoticamente dominantes ( $w^+/w^+$ ) de *D. melanogaster*, numa primeira fase em 17 frascos com 10 ml cada com meios diferentes durante 56h. Um de controlo negativo (N) e um positivo com paraquato [5 mM] (PQ) em tampão fosfato (PBS) 1X. Foram testadas cinco diluições do estrato das folhas, diluição de 20X (C1), de 30X (C2), de 40X (C3), de 45X (C4) e uma diluição de 50X (C5). Foram testados cinco tratamentos contendo PQ em conjunto com as diferentes concentrações C1, C2, C3, C4, C5. Ainda foram testadas, cinco diluições de metanol/água 50/50 da solução mãe com que se procedeu à extração dos compostos nas folhas. Uma diluição de 20X (MET1), de 30X (MET2), de 40X (MET3), de 45X (MET4) e uma diluição de 50X (MET5). Após as 56h referidas a geração parental era retirada para o mortório.

Aquando da chegada das larvas de *D. melanogaster* ao terceiro estadio (ultimo estado antes de formarem a pupa para a metamorfose), 25, de cada um dos 17 tratamentos diferentes, foram retiradas para eppendorfs com 500 µl de PBS 1X, devidamente etiquetados com o nome do tratamento de origem. Estas larvas sofreram um processamento posterior à medida que eram necessárias para os ensaios bioquímicos. Este processamento consistiu numa maceração mecânica, com uma vareta de vidro. Seguidamente o homogeneizado obtido foi submetido a ultrassons, tendo as amostras sido mantidas em gelo de modo a evitar o sobreaquecimento. Este processo de ultrassons consistiu em 3 pulsos com a duração total de 30 s, sendo que a duração de cada pulso de 10 s e o intervalo entre pulsos de 20 s.

Durante o terceiro estadió das larvas, de 3 a 5 de cada tratamento foram retiradas para serem utilizadas no ensaio do cometa. As restantes completavam o seu ciclo até ao final da metamorfose sendo depois utilizadas no teste para verificação de mutações e recombinações somáticas (SMART).

#### **3.1.4 Método alternativo**

Foi também feito um ensaio pequenas modificações dos passos referidos anteriormente. O facto de se utilizar uma PQ [100 mM], e extratos foliares nos quais se procedeu a uma evaporação do metanol em vácuo a 40°C num sistema rotacional. Este ensaio foi denominado *ensaio teste*.

### **3.2 SMART**

#### **Linhas Utilizadas**

Foram utilizados indivíduos da seguinte linha de *Drosophila melanogaster*: *Oregon K*. Estas a fim de se obter descendência heterozigótica  $w/w^+$ , foram cruzados machos  $w/0$  (gene encontra-se no cromossoma X) com fêmeas (virgens)  $w^+/w^+$ . Este é o princípio genético deste teste pois permite no caso de se tentar induzir mutações que estas se expressem nos olhos revelando a informação relativa ao alelo recessivo  $w$ . Os testes SMART permitem com uma grande rapidez, sensibilidade, especificidade e precisão detetar mutações nos discos imaginais. Cada par de discos dá origem a uma estrutura no adulto, um par dá origem aos olhos, outro as asas etc. [81-83].

Assim estes testes podem revelar mutações ocorridas nos discos imaginais durante a fase larvar através da observação dos órgãos do adulto. Assim existem algumas variantes de testes SMART sendo que a metodologia utilizada foi o teste *white/white*<sup>+</sup> inicialmente descrita por Vogel e Zijlstra [84]

### **3.3 Ensaio do cometa**

#### **Tecido utilizado**

## Neuroblastos de *Drosophila melanogaster*

### **Metodologia utilizada**

A preparação das amostras segue o procedimento modificado do descrito inicialmente por Ostling e Johanson [85].

Após a obtenção de 4 cérebros de drosófila, estes são colocados em 20 µl de Solução de Ringer para insetos em eppendorfs. Após de recolhidos os cérebros são centrifugados a 1,7 x 1000 RCF, durante 5min formando-se um *pellet* que seguidamente é macerado de modo a libertar as células dos neuroblastos. Seguidamente adiciona-se a cada tubo com as células em suspensão na solução de Ringer par insetos, o mesmo volume de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) a 2% sendo depois adicionado o restante volume agarose LMP 1% até se perfazer 240 µl, pondo esse volume em banho-maria a 40°C. Esse volume é disposto por 4 gotas duas em cada lâmina com pontas opacas já com o *pré-coating* de 1,5% de agarose devidamente identificadas. Nessas mesmas gotas (com 70 µl cada) são postas em cima lamelas de 18x18 mm que através da força da gravidade espalham as gotas pela área dessas mesmas lamelas . Após esse paço as lâminas são colocadas no frio durante 6 min, após esse tempo retiram-se as lamelas com cuidado [86] e põe-se as lâminas em *copllers* com tampão de lise (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, pH 10) durante uma hora. Após estes passos, o processo experimental entre as lâminas que irão ter tratamento enzimático e aquelas que não irão torna-se distinto. Na ou nas *copllers* que contém as lâminas para serem adicionado enzima, retira-se o tampão de lise e promove-se duas lavagens dessas lâminas substituindo o tampão de lise nos *copllers* por tampão F (40 mM HEPES, 0,1 M KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/ml de soro de albumina bovina, pH 8 obtido com auxilio de KOH 6M ), tendo intervalos 5 min no frio entre cada lavagem. Seguidamente retira-se as lâminas e a cada gel existente nelas adicionando-se 40 µl de solução de FPG em tampão F ( alíquota de 10 µl de FPG para 200 µl de tampão F) recobrando os géis em que se adicionou a enzima com lamelas de 22 mm pondo as lâminas a incubar às escuras câmara húmida na estufa a 37 °C durante 30 min.

Após estes 30 min retiram-se as lamelas e põe-se as todas as lâminas, as que tiveram o tratamento com a enzima e as que se encontravam na solução de lise, na tina de eletroforese adicionando-se depois lentamente e de forma cuidadosa o tampão de eletroforese (300 mM NaOH / 1 mM EDTA ) até as lâminas estarem totalmente recobertas por uma fina camada deste. A eletroforese é feita a 300 Miliamperes e a 25 Volts

durante 30 min sendo depois as lâminas retiradas colocadas em *copllers* outra vez com tampão PBS 1x no frio durante 10 min retirando-se em seguida o PBS e substituindo-o por H<sub>2</sub>O destilada também durante 10 min no frio. Após este tempo retiram as lâminas e deixam se secar ao ar serem utilizadas para a observação ou microscópio de fluorescência, aí a cada gel existente adiciona-se 20 µl de DAPI recobre-se com uma lamela de 22 mm e observa-se no microscópio de fluorescência no filtro adequado as células coradas e o dano correspondente de cada uma de modo a fazer o teste Cometa. A análise dos cometas observados, e a forma que classes de dano foram atribuídas seguiram o exemplo dado por Juliana da Silva *et al* [87].

### **3.4 Atividade Antioxidante**

#### **3.4.1 Método de descoloração do radical ABTS**

Este método consiste na descoloração do radical ABTS<sup>•+</sup>. A formação do radical ocorre pela reação de oxidação do ABTS com o persulfato de potássio [88] formando um cromóforo de cor verde-azulado que tem um valor de absorvância aproximadamente igual a 0,7 a um comprimento de onda de 734 nm. Apesar de o radical apresentar uma absorção máxima a 414 nm, 645 nm e 734 nm é escolhido o comprimento de onda a 734 nm porque desta forma são minimizados os riscos de interferência por parte de outros compostos. [89] Este é reduzido devido á presença de compostos dadores de elétrões ou hidrogénios que é o caso de um composto antioxidante.

Inicialmente preparou-se uma solução aquosa de ABTS (7 mM) e 1 ml de uma solução aquosa de Persulfato De Potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (140 mM). O catião radical ABTS foi produzido por mistura da solução de ABTS (5 mL) com 88 µL da solução de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>. Esta mistura ficou cerca de 16 horas no escuro e à temperatura ambiente. A solução de trabalho foi preparada por adição de 1 mL da mistura feita anteriormente, 88 mL de uma solução de tampão acetato a pH 4,4 e 100 mM. Antes de iniciar os ensaios verificamos se a absorvância da solução de trabalho era de 0,7 a 734 nm. Para os padrões utilizamos um antioxidante de referência, o Trolox a 0,11 mM, com o qual preparamos padrões nas concentrações de 0 a 10 µM. Os tubos, contendo cada um deles 2 mL da solução de trabalho do radical ABTS<sup>•+</sup>, diferentes volumes para os padrões de Trolox ou os volumes de extrato a testar perfazendo o volume final de 2,2 mL com água. A absorvância foi lida a 734 nm num espectrofotómetro UV-Vis (Varian, Cary 50)

ao fim de 10 minutos de reação e à temperatura ambiente. O branco do aparelho foi feito com tampão acetato. Os resultados foram apresentados em equivalentes de ácido gálico (GAE).

### **3.4.2 Método do radical DPPH**

O DPPH é um radical livre estável, muito utilizado na determinação da atividade antioxidante de espécies vegetais, esta molécula aceita um eletrão ou um radical hidrogénio de modo a tornar-se uma molécula diamagnética estável [90]. Apresenta uma coloração púrpura com um máximo de absorção a 517 nm.

Neste ensaio o DPP é reduzido por ação de compostos antioxidantes presentes nas amostras formando um composto denominado difenil-picril-hidrazilo, que apresenta uma coloração amarela. A capacidade de eliminação do radical pelos antioxidantes é seguida através da diminuição da absorvância até um valor em que depois permanece constante e é fortemente influenciada pelo solvente e pelo pH do meio reacional [90].

Um dos fatores mais importantes na reação é a acessibilidade estereoquímica ao DPPH, pelo que moléculas mais pequenas têm melhor acesso ao local ativo consequentemente apresentam maior capacidade de eliminação do radical [90].

Existem alguns antioxidantes que apesar de reagirem bem e rapidamente com outros radicais não reagem na presença de DPPH• ou então reagem numa menor escala do que seria esperado. Os carotenoides (cor amarela) são compostos que podem interferir na leitura da absorvância por absorverem ao mesmo comprimento de onda. Apesar de algumas das limitações apresentadas o método de DPPH é considerado simples, muito útil na determinação da capacidade antioxidante e o radical está disponível comercialmente [90].

A mistura reacional foi incubada à temperatura ambiente e no escuro e ao fim de 30 minutos foi lida a absorvância num espectrofotómetro UV-Vis (Varian, Cary 50) a 517 nm. O zero do aparelho foi feito com metanol. Para os padrões utilizamos o Trolox a 10 mM e preparamos padrões com concentrações de 0 a 600 µM. Os resultados foram apresentados em equivalentes de Trolox.

### **3.5 Quantificação da proteína**

A quantificação da proteína foi determinada pelo método colorimétrico do Biureto [91]. Este método baseia-se na reação de Sulfato de cobre (II) ( $\text{CuSO}_4$ ) em solução alcalina (reagente de Biureto) com as ligações peptídicas das proteínas, originando um complexo de cor violeta. A densidade ótica deste complexo, isto é, a sua absorvância, vai ser depois determinada a um comprimento de onda específico (540 nm). Foram preparados padrões de soro de albumina bovina (BSA) a 0,4% (0, 200, 400 e 600  $\mu\text{L}$ ) com as concentrações de 0; 0,8; 1,6 e 2,4 mg de proteína, com água desionizada (volume ajustável), dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% (100  $\mu\text{L}$ ), e no final reagente de Biureto (2000  $\mu\text{L}$ ) perfazendo um volume total de 4 mL. As amostras foram preparadas nas mesmas condições sendo que o volume de amostra a quantificar adicionado foi de 20  $\mu\text{L}$  e 40  $\mu\text{L}$  e o volume de água desionizada de 1880 e 1860  $\mu\text{L}$  respetivamente. No fim da adição do reagente de Biureto as amostras e os padrões estiveram a incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente em ambiente escuro e em seguida foram lidas as absorvâncias a 540nm num espectrofotómetro UV-Vis (Spectronic® Genesys™ 2PC).

### **3.6 Stresse Oxidativo**

#### **3.6.1 Superóxido dismutase**

A atividade da enzima SOD foi determinada espectrofotometricamente (Varian Cary 50 – UV-Vis) de acordo com o método descrito por McCord e Fridovich [92], utilizando o sistema xantina-xantina oxidase. A molécula que utilizamos para a deteção em substituição do citocromo c foi o NBT. O meio de reação para a determinação da atividade desta enzima contém tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50 mM e EDTA 1 mM a  $\text{pH}=7,4$ ) (930  $\mu\text{L}$ ), NBT 10 mM (10  $\mu\text{L}$ ), hipoxantina 10 mM (10  $\mu\text{L}$ ) e 40  $\mu\text{L}$  de amostra. Colocamos o meio de reação a incubar durante dois minutos a 25°C e a 20 segundos de completar o tempo de incubação adicionamos xantina oxidase (10  $\mu\text{L}$ ), perfazendo um volume total de 1 mL, homogeneizamos o meio de reação e procedemos

à leitura espectrofotométrica. A cinética da reação foi acompanhada ao longo de 3 minutos a 25°C e a 560 nm.

A análise da cinética obtida fez-se através de unidades de atividade de SOD que corresponde à quantidade de SOD que inibe 50% da redução de NBT. As unidades desta atividade foram expressas em  $U \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ .

### **3.6.2 Catalase**

A atividade da CAT, por sua vez, foi medida com um eletrodo de oxigénio (Hansatech) tipo Clark [93]. O meio de reação utilizado para esta medição é constituído por tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM a  $\text{pH}=7$ ) (683  $\mu\text{L}$ ) e peróxido de hidrogénio

( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 4M (17  $\mu\text{L}$ ). Na câmara de reação foram colocados 15  $\mu\text{L}$  de amostra, e foram incubados durante 5 minutos a 25°C. No final do tempo de incubação foi adicionado o peróxido de hidrogénio dando-se início à reação. A cinética da reação foi acompanhada ao longo de 3 minutos e meio e a atividade da catalase foi expressa em  $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ .

### **3.6.3 Glutathione S-transferase**

A atividade da enzima GST foi determinada espectrofotometricamente (Varian Cary 50 – UV-Vis) usando um método descrito por Chikezie e colaboradores em 2009 [94]. O meio de reação utilizado para a avaliação da atividade enzimática é composto por tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM a  $\text{pH}=7$ ) (1840  $\mu\text{L}$ ), CDNB 100 mM (20  $\mu\text{L}$ ), GSH 100 mM (40  $\mu\text{L}$ ) e 100  $\mu\text{L}$  de amostra, perfazendo um volume final de 2 mL. A mistura reacional foi incubada durante dois minutos a 25°C e a reação inicia-se com a adição de GSH um minuto após a incubação. A cinética da reação foi acompanhada a 340 nm a 25°C durante 3 minutos e a atividade enzimática expressa em  $\mu\text{M}$  de CDNB conjugado  $\text{min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ , recorrendo-se ao seu coeficiente de extinção molar de  $9,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **3.6.4 Avaliação da peroxidação lipídica pelo método dos TBARS**

O método utilizado foi baseado no descrito por Ottolenghi em 1959 [95]. O método de quantificação de níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é,

provavelmente, o método mais utilizado para a quantificação da peroxidação lipídica *in vitro*. Este método quantifica MDA formado, um produto final da peroxidação de ácidos gordos da membrana, e baseia-se na reação deste biomarcador de stresse oxidativo com o ácido tiobarbitúrico. Da reação entre ambos resulta um composto de cor amarela, mensurável por análise espectrofotométrica, o qual é diretamente proporcional à concentração de MDA resultante da peroxidação lipídica. Apresenta como vantagens: o baixo custo e a facilidade de execução, é sensível para a quantificação da peroxidação lipídica, porém, não é muito específico.

O meio de reação é constituído por 100  $\mu\text{L}$  de amostra, 500  $\mu\text{L}$  de tampão – Tris-HCl (10mM) em cloreto de potássio (KCl) (175mM) e 100 $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 0,38% TBA (p/v), 37,5% ácido tricloroacético (TCA) (v/v) e 0,015% hidroxitolueno butilado (BHT) (p/v). Após agitação vigorosa, os tubos tapados com esferas de vidro, foram colocados num banho de água a ferver durante cerca de 15 minutos e arrefecidos por imersão em gelo. Foram posteriormente centrifugados durante 10 minutos a 3000 r.p.m. para sedimentação de proteínas e membranas. De cada tubo foram retirados 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante para uma microplaca de 96 poços e a absorvância foi lida a 530nm num leitor de microplacas (Power Wave XS2 BioTek). O resultado foi expresso em  $\mu\text{M}$  MDA/mg de proteína utilizando o coeficiente de extinção molar de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **3.7 Análise estatística**

Para análise estatística de significância existem maioritariamente dois tipos de teste os paramétricos e os não-paramétricos. Estes testes servem para confirmar se a nossa hipótese (H1) é válida e/ou se a hipótese nula (H0) pode ser rejeitada. Para a escolha do teste temos de conhecer alguns dos pressupostos que cada teste implica. Assim não podemos usar um teste paramétrico se a nossa amostra não seguir uma distribuição normal ou próxima da normal ao se a mesma tiver uma dimensão (n) inferior a 30. Quando isto acontece, ou quando não sabemos que tipo de distribuição tem a amostra, devemos usar um teste não paramétrico.

Assim para a análise estatística dos dados obtidos pelo ensaio do cometa, dos níveis antioxidantes na folha, dos níveis dos TBARS e das enzimas antioxidantes (SOD,CAT e

GST) usamos o teste de Mann-Whitney U. Este teste permite-nos saber as seguintes hipóteses estatísticas:

$H_0: F(X_1) = F(X_2)$  vs.  $H_1: F(X_1) \neq F(X_2)$  no teste bilateral;  $H_0: F(X_1) \leq F(X_2)$  vs.  $H_1: F(X_1) > F(X_2)$  para um teste unilateral à direita e  $H_0: F(X_1) \geq F(X_2)$  vs.  $H_1: F(X_1) < F(X_2)$  para um teste unilateral à esquerda. As hipóteses do teste de Mann-Whitney são também frequentemente escritas em função das medianas populacionais [96]. No caso do teste SMART a análise estatística foi feita através de um modelo de qui-quadrado(x2), de dupla decisão com um fator de multiplicação de 4 [97].

## 4 Resultados

### 4.1 Frutos de *Corema album*

Os frutos de corema álbum não se encontravam no estado de maturação adequado, por esse motivo não se realizaram as metodologias experimentais que inicialmente tinham sido projetadas. Devido a esse facto não existem resultados sobre os frutos a ser relatados.

### 4.2 Toxicidade

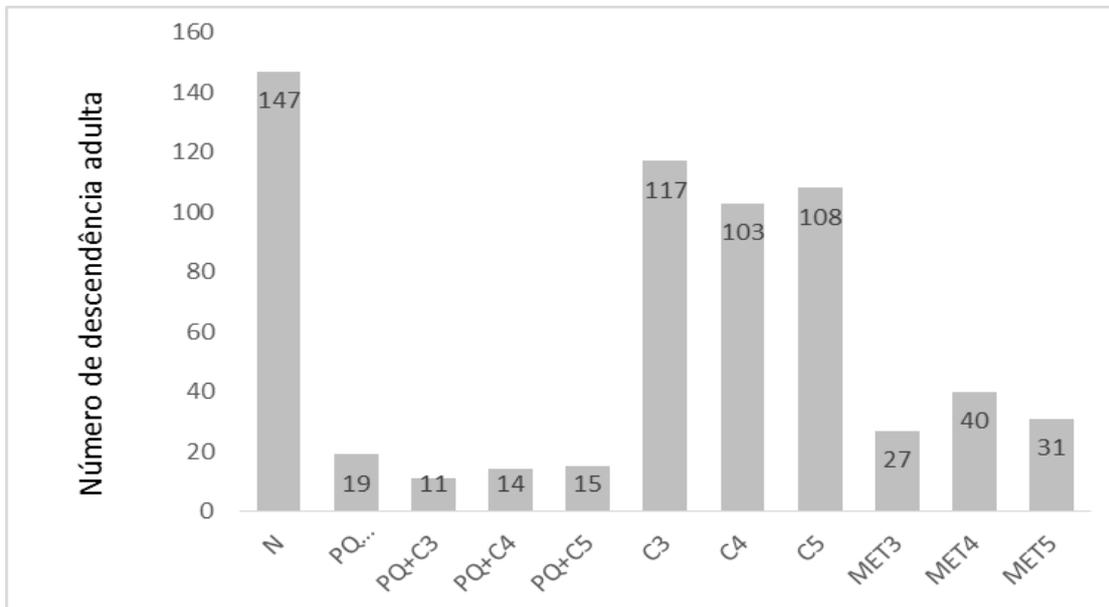
O número de adultos eclodidos registados ao longo do trabalho prático estão expressos no Gráfico 1 e o 2. Devido a não se terem obtido descendentes nos tratamentos C1, C2, PQ+C1, PQ+C2, MET1 e MET2 não foi possível fazer as metodologias não tendo assim quaisquer resultados.

Nestes dois Gráficos podemos observar que existem discrepâncias nos vários tratamentos. Através da observação dos mesmos gráficos observa-se que o controlo negativo demonstra ter um maior número de adultos eclodidos que os outros tratamentos. Também se denota diferenças ao nível de adultos eclodidos entre os tratamentos C3 do ensaio teste e os tratamentos C3 dos outros ensaios, sendo que nos extratos foliares do ensaio teste, C3, C4 e C5, têm números semelhantes de adultos eclodidos.

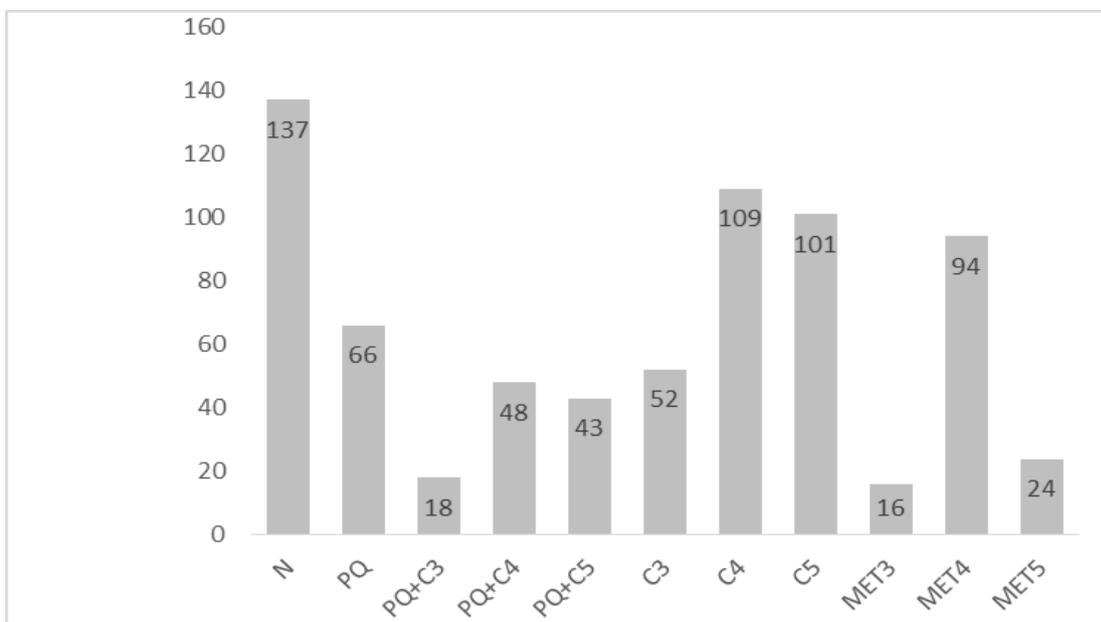
Os tratamentos que contém apenas metanol, MET3, MET4 e MET5, apresentam, em ambos os gráficos, um maior número de eclodidos. No tratamento MET4 comparativamente aos tratamentos MET3 e MET5 não é demonstrada uma relação de retroação positiva ou negativa entre a concentração de metanol e o número de descendência.

Os tratamentos com o PQ a 100 mM, serviram para se observar o potencial efeito nocivo do paraquato na descendência e nos danos genéticos. Deste modo através da comparação do Gráfico 1 com o Gráfico 2 podemos perceber que todos os tratamentos com o paraquato a 100 mM mostram sempre uma descendência baixa sendo que o

tratamento com paraquato que tem maior número de adultos eclodidos é o controlo positivo, PQ 100 mM. Os resultados dos dois gráficos mostram que independentemente da concentração de paraquato o número de adultos eclodidos é sempre menor nos tratamentos em que o paraquato está associado aos extratos das folhas, PQ+C3, PQ+C4 e PQ+C5, seja com concentração de paraquato a 100 mM ou 5 mM.



**Gráfico 1:** *Números de adultos eclodidos em cada tratamento com extratos das folhas no ensaio teste*



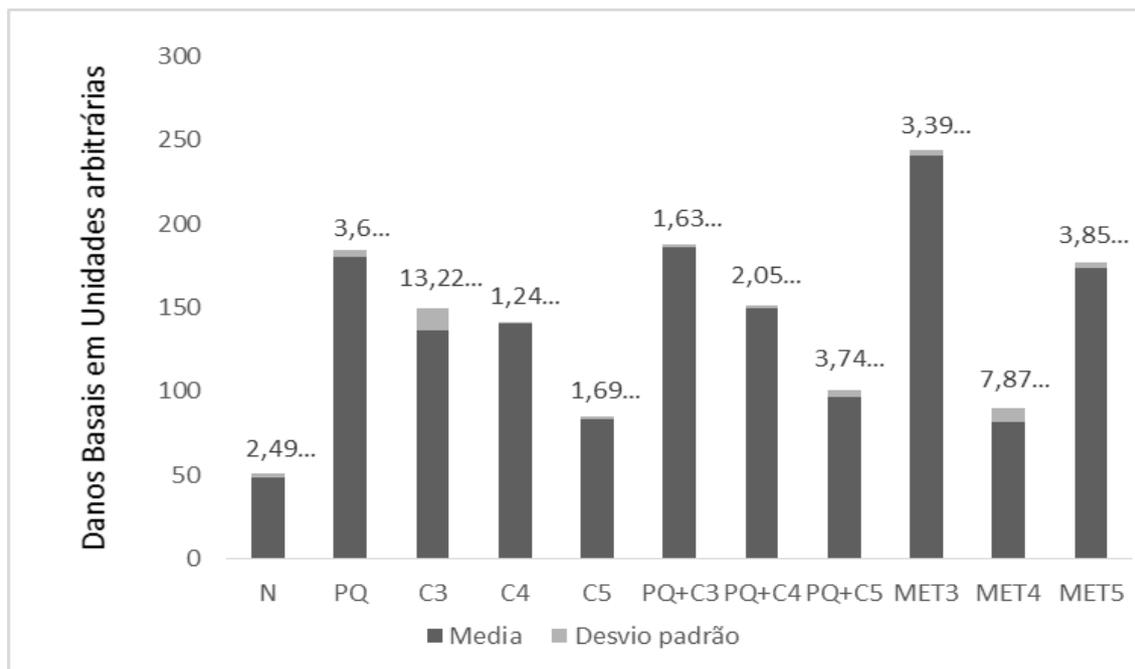
**Gráfico 2:** *Números médios de adultos eclodidos em cada tratamento com extratos das folhas*

### **4.3 Genotoxicidade e mutagenicidade**

Os resultados obtidos dos ensaios do cometa e SMART  $w/w^+$  demonstram um efeito nocivo no DNA dos neuroblastos e dos discos imaginais das larvas, por parte dos extratos das folhas.

#### **4.3.1 Ensaio do Cometa**

Nos ensaios cometa sem a enzima formamidopirimidina-DNA glicosilase (FPG) onde podemos detetar roturas basais, constatamos através do Gráfico 3, que os valores do nível dos danos basais são bastante elevados nos neuroblastos dos indivíduos provenientes dos tratamentos com paraquato, extratos foliares e metanol. Os tratamentos com extratos foliares, isolados ou em conjunto com paraquato, provocam um menor dano à medida que a concentração dos extratos é menor.



**Gráfico 3:** Níveis de dano basais médios e respetivo desvio padrão nos vários tratamentos em neuroblastos em unidades arbitrárias. Visualizado ao microscópio de fluorescência e medido pelo número e tipo de cometas.

P (estatístico)	N	PQ	C3	C4	C5	PQ+C3	PQ+C4	PQ+C5	MET3	MET4	MET5
N		0,001	0,001	0,002	0,004	0,002	0,037	0,002	0,001	0,009	0,001
PQ			0,001	0,002	0	1	0,298	0,002	0,001	0,002	0,398
C3				0,603	0	0,002	0,298	0,002	0,001	0,002	0,003
C4					0,001	0,004	0,332	0,004	0,002	0,004	0,002
C5						0,001	0,275	0,513	0	0,513	0
PQ+C3							0,332	0,004	0,002	0,004	0,118
PQ+C4								0,394	0,002	0,332	0,431
PQ+C5									0,002	0,106	0,002
MET3										0,002	0,001
MET4											0,002
<b>P-Value</b>	<b>&lt;0,05</b>										
P-Value	>0,05										

**Tabela 1:** Valores de p da comparação dos resultados do ensaio do cometa entre os diferentes grupos, obtidos pelo teste Mann-Whitney bilateral

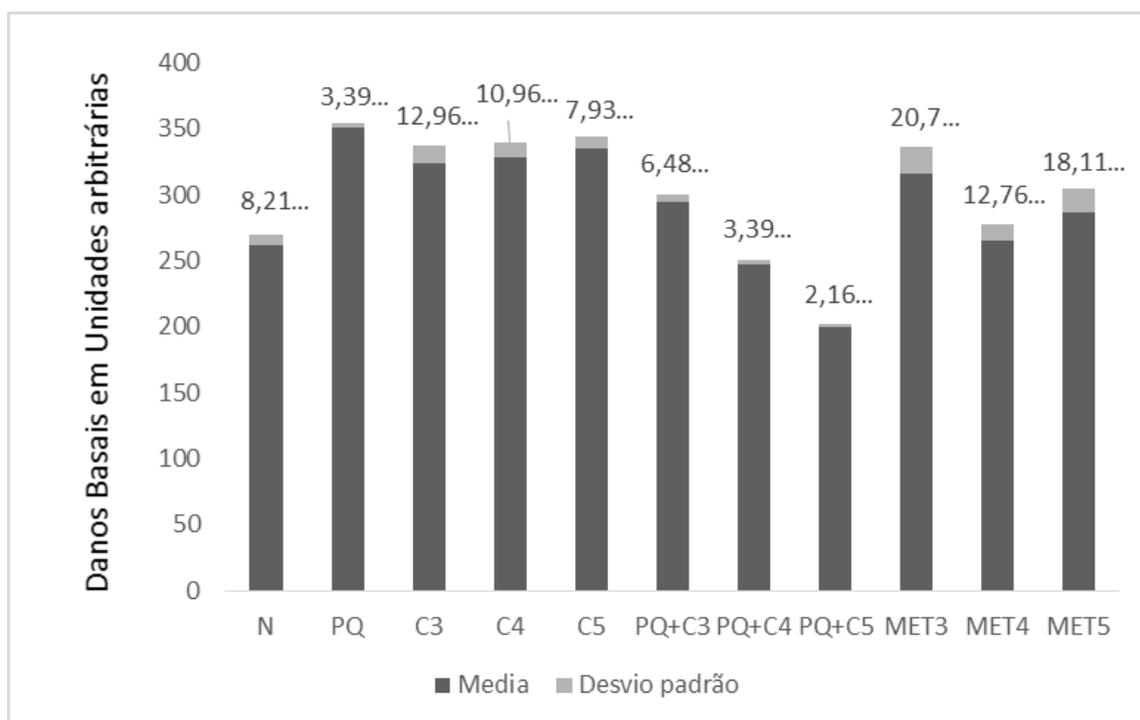
O facto de não haver grandes diferença entre C3 e C4 podendo haver várias causas para esse facto. Devido ao facto que há uma relação de retroação negativa presente entre C4 e C5 em princípio aplicar-se-ia o mesmo em relação a C3 e C4. É de referir que os valores de dano encontrados no grupo C5 são bastante baixos, com níveis inferiores a 100 UA como pode ser confirmado no Gráfico 1.

Analisando os efeitos dos tratamentos, podemos verificar que os extratos de folha têm um efeito dual; por um lado causam danos no ADN mas por outro mostram uma capacidade protetora em baixas concentrações em relação aos danos provocados pelo PQ.

Os danos obtidos nos grupos PQ e PQ+C3 são muito semelhantes e elevados chegando a quase 4x mais que os danos no controlo negativo (N). No entanto, nos grupos PQ+C4 e PQ+C5 o dano diminuí chegando a ser, no último caso, quase metade do obtido em PQ e em PQ+C3. Estes dados são reveladores dos efeitos positivos na inibição da ação do paraquato. Obtendo-se valores não muito díspares nos tratamentos C5 e PQ+C5, apesar de estes serem estatisticamente diferentes.

Nos resultados dos tratamentos com metanol nas suas diferentes concentrações encontramos níveis de dano bastante elevados principalmente na concentração MET3 e na MET5, sendo que na concentração MET4 deu-se uma redução drástica e atípica do nível de dano. Como podemos observar na Tabela 1, os dados de MET3, MET4 e MET5 são estatisticamente diferentes.

Nos ensaios de cometa em que se utilizou a FPG, como esperado, os danos formam mais elevados em todos os diferentes grupos, uma vez que a enzima converte os danos oxidativos em roturas. No Gráfico 4 podemos observar que as diferenças ao nível das concentrações dos extratos C3, C4 e C5 mostram um comportamento distinto, havendo diferenças estatísticas entre C3 e C5, e entre C4 e C5. No entanto, devido ao facto da diferença no comportamento ser ligeira e dos valores serem bastante altos, pode-se admitir que o nível de dano provocado nas 3 concentrações na presença de FPG seja semelhante.



**Gráfico 4:** Níveis de dano basais médios e respetivo desvio padrão nos vários tratamentos na presença de FPG em neuroblastos em unidades arbitrárias. Visualizado ao microscópio de fluorescência e medido pelo número e tipo de cometas.

P (estatístico)	N	PQ	C3	C4	C5	PQ+C3	PQ+C4	PQ+C5	MET3	MET4	MET5
N		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,016	0,001	0,074	0,028	0,001
PQ			0,004	0,004	0,049	0,004	0,004	0,004	0,009	0,004	0,004
C3				0,189	0,004	0,004	0,004	0,004	0,298	0,004	0,023
C4					0,004	0,004	0,004	0,004	1,0	0,004	0,023
C5						0,004	0,004	0,004	0,118	0,004	0,004
PQ+C3							0,004	0,004	0,118	0,004	0,004
PQ+C4								0,004	0,118	0,004	0,004
PQ+C5									0,118	0,004	0,004
MET3										1	0,118
MET4											0,004
<b>P-Value &lt;0,05</b>											
P-Value >0,05											

**Tabela 2:** Valores de p da comparação resultados do ensaio do cometa entre os grupos com a FPG, obtidos pelo teste Mann-Whitney bilateral

Nas concentrações de metanol mantem-se o comportamento observado nos ensaios sem a FPG, mas na presença de FPG as diferenças entre o nível de dano entre as concentrações ficou mais esbatida, sendo que as diferenças só são estatisticamente significativas entre o MET4 e o MET5 como podemos observar na Tabela 2.

No entanto, o comportamento nos grupos PQ+C3, PQ+C4 e PQ+C5 pode ser considerado semelhante ao visualizado com a FPG, as diferenças entre os grupos PQ+C3, PQ+C4 e PQ+C5 encontram-se bem definidas com os danos no grupo PQ+C5 a serem mais reduzidos do que no controlo negativo, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

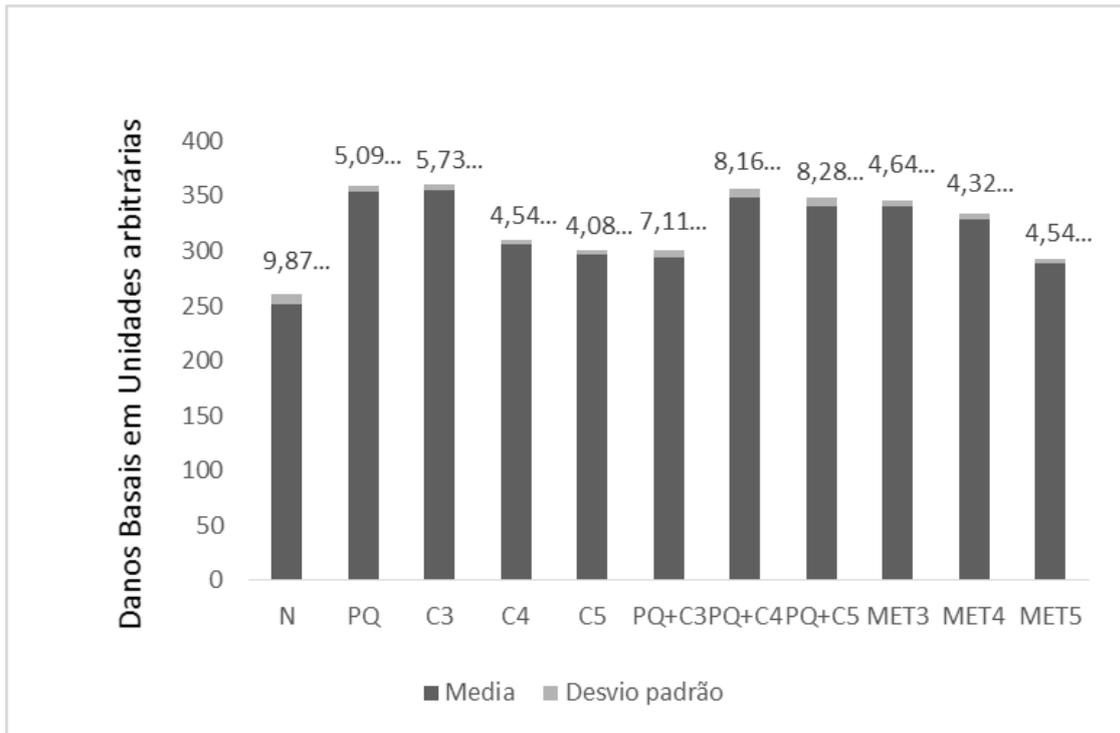
Os resultados do ensaio do cometa, no ensaio teste, nos extratos das folhas sem a FPG não demonstraram grandes diferenças. Continuando no entanto a haver uma retroação negativa entre a concentração dos extratos das folhas e o dano provocado sendo que nestes ensaios essa retroação é bem demonstrada e as diferenças entre os danos nos três diferentes meios são estatisticamente significativas. No Gráfico 5 também denotamos que apesar de se aumentar a concentração de paraquato em 20x, esse aumento não é proporcional ao nível de dano. Ao observar os danos de PQ+C3, PQ+C4 e PQ+C5 verificamos que a redução do dano provocado pelo extrato acontece com grande intensidade.

Comparando os resultados entre o grupo PQ e os PQ+C3, PQ+C4 e PQ+C5 através da Tabela 3 vemos que estes são significativos, apresentando validade estatística.

No comportamento dos grupos com as diferentes concentrações de metanol observa-se um comportamento semelhante ao que foi obtido nos outros ensaios. Como podemos observar no Gráfico 3, os danos provocados pelo metanol têm uma retroação negativa em relação às concentrações



concentração no meio é menor, sendo esta tendência validada estatisticamente pelo facto dos meios C3, C4, C5 e MET3, MET4, MET5 serem diferentes entre eles como está demonstrado na Tabela 4. Para além disso, os extratos demonstram um efeito protetor contra o paraquato, sendo o dado PQ+C3 do Gráfico 6 o único grupo que contraria as tendências encontradas. As diferenças entre o PQ+C4 e o PQ+C5 mostram-se estatisticamente relevantes corroborando os dados dos outros ensaios de cometa.



**Gráfico 6:** Níveis de dano basais médios e respetivo desvio padrão nos vários tratamentos no ensaio teste em neuroblastos em unidades arbitrárias. Visualizado ao microscópio de fluorescência e medido pelo número e tipo de cometas.

P (estatístico)	N	PQ	C3	C4	C5	PQ+C3	PQ+C4	PQ+C5	MET3	MET4	MET5
N		<b>0,004</b>									
PQ			0,511	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,023</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>
C3				<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	0,332	<b>0,009</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>
C4					<b>0,023</b>	0,106	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>
C5						0,189	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	1
PQ+C3							<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>	0,332
PQ+C4								<b>0,023</b>	<b>0,009</b>	<b>0,004</b>	<b>0,004</b>
PQ+C5									0,746	<b>0,023</b>	<b>0,004</b>
MET3										<b>0,004</b>	<b>0,004</b>
MET4											<b>0,004</b>
<b>P-Value</b>	<b>&lt;0,05</b>										
P-Value	>0,05										

**Tabela 4:** Valores de p da comparação resultados do ensaio do cometa entre os grupos do ensaio teste com a FPG, obtidos pelo teste Mann-Whitney bilateral

### 4.3.2 Teste SMART

Os resultados do teste SMART  $w/w^+$  encontram-se expressos na Tabela 5 e Tabela 6. Podemos observar as proporções de olhos com clones por número de olhos totais e respetiva estatística de acordo com o teste do  $X^2$  de dupla decisão.

Na Tabela 5 podemos observar que as percentagens de danos genéticos encontradas foram mais baixas no controlo negativo, 0,5%, tendo como outro extremo a percentagem obtida nos dados referentes a concentração de metanol mais elevada, 50%, sendo que devido ao baixo número de olhos analisados não se possa inferir uma relação direta entre o tratamento e o dano. Os resultados obtidos demonstram um nível de mutação visível superior nos meios com extratos à encontrada no controlo positivo, PQ, com a exceção de C4 que deu uma percentagem de olhos com mosaico mais baixa quando comparada com o controlo negativo. Por estes dados observamos um efeito cumulativo entre o efeito do PQ e das várias concentrações de extratos, havendo uma redução da percentagem de olhos encontrados com mosaicos de PQ+C3 para PQ+C4 e deste para PQ+C5.

Na Tabela 6 podemos analisar a decisão estatística obtida através do teste do  $X^2$  de dupla decisão entre os vários tratamentos. Os resultados mostram que maioria dos tratamentos provocaram mais dano que o controlo negativo apesar de só nos meios PQ, PQ+C5 e MET4 os resultados são estatisticamente significativos, sendo que em apenas num meio, o C4, as diferenças são estatisticamente inconclusivas.

No caso do meio com o controlo positivo, PQ, vemos que existem meios que demonstraram um nível de mutações superior e estatisticamente validadas, como os meios C3, C5, PQ+C3 e MET3, sendo que no último o resultado estatístico é menos potente que nos outros.

Nos resultados referentes ao meio C3 comparado com PQ+C3 e MET3, e a comparação do C4 com PQ+C4 e MET4 e C5 comparado com PQ+C5 e MET5 demonstraram ser inconclusivos na sua maioria o que parece indicar que os extratos nas concentrações utilizadas provocam mais ou menos o mesmo número de mutações que os meios correspondentes de paraquato à concentração de 5 mM, a exceção é o C5 que demonstrou uma capacidade de dano fortemente mais positiva que o PQ+C5 como se pode confirmar pelas Tabelas 5 e 6. Na comparação entre os extratos e os meios com

metanol apenas o MET1 têm um efeito mutagénico superior e estatisticamente positivo em relação a C3.

Tratamento	Olhos com mosaico por número total de olhos	Valores expressos em %
N	4/800	0,5
PQ	7/322	2,174
C3	30/408	7,353
C4	7/502	1,394
C5	20/360	5,556
PQ+C3	8/144	5,556
PQ+C4	8/236	3,389
PQ+C5	5/234	2,137
MET3	9/18	50
MET4	7/334	2,096
MET5	4/80	5

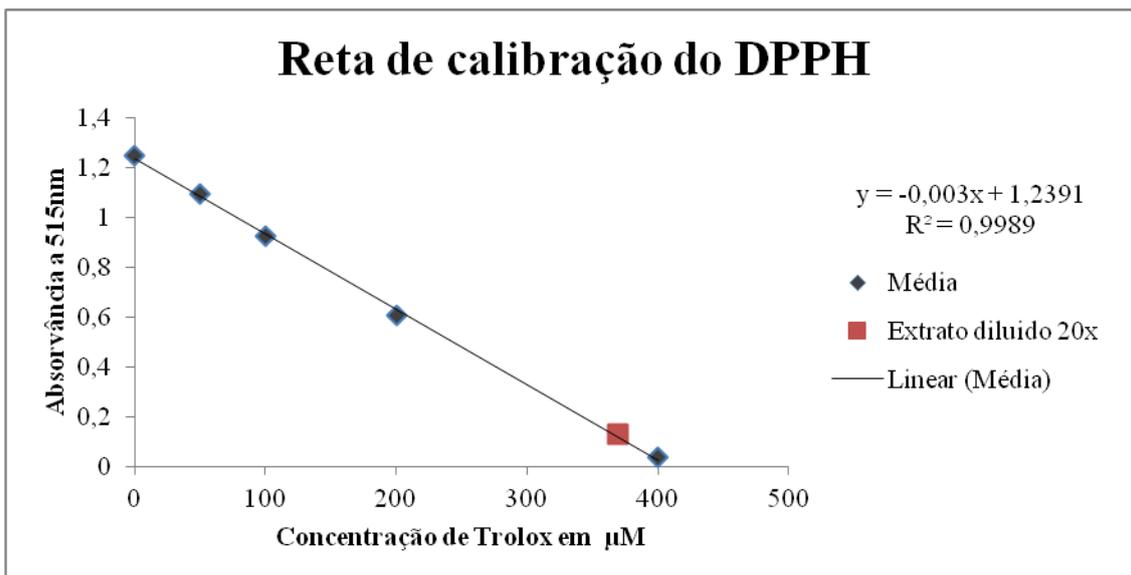
Tabela 5: Resultados obtidos pelo teste SMART w/w<sup>+</sup> com os 11 tratamentos diferentes

Resultados	N	PQ	C3	C4	C5	PQ+C3	PQ+C4	PQ+C5	MET3	MET4	MET5
N		+	W+	i	W+	W+	W+	+	W+	+	W+
PQ			+	-	+	+	i	i	W+	i	-
C3						i			W+		
C4							i			i	
C5								+			i

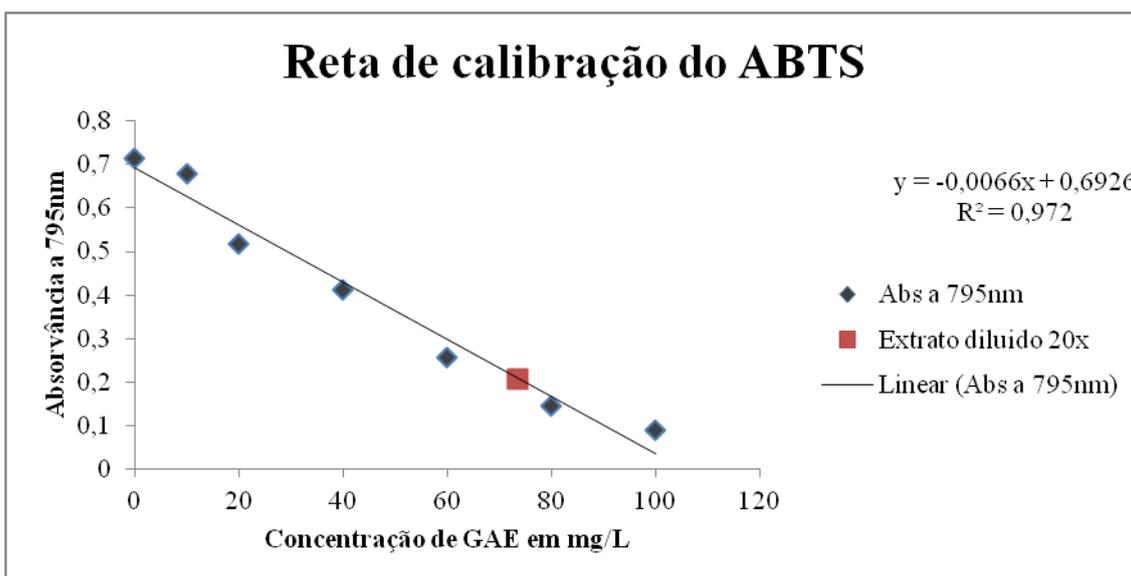
Tabela 6: Resultado do teste do X<sup>2</sup> de dupla decisão. + Positivo; - Negativo; i Inconclusivo; W<sup>+</sup> Fracamente positivo

#### 4.4 Stresse oxidativo e atividade antioxidante

Os resultados sobre a atividade antioxidante do extrato foliar de *Corema album* demonstram uma grande capacidade antioxidante, como se pode verificar através dos gráficos 7 e 8. A capacidade antioxidante registada no teste do DPPH tem valores equivalentes a 369,2 µM de Trolox e no ABTS tem valores correspondentes a 73,4 equivalentes de GAE como se pode observar no Gráfico 5 e 6 respetivamente. Assim em 1 g de folha existem 7,3 mg de Eq de GAE ou 36,9 micromoles de Eq de Trolox dependendo da metodologia utilizada.



**Gráfico 7:** Reta de calibração da atividade antioxidante pelo teste do DPPH e localização do nível antioxidante do extrato foliar nessa mesma reta



**Gráfico 8:** Reta de calibração da atividade antioxidante pelo teste do ABTS e localização do nível antioxidante do extrato foliar nessa mesma reta

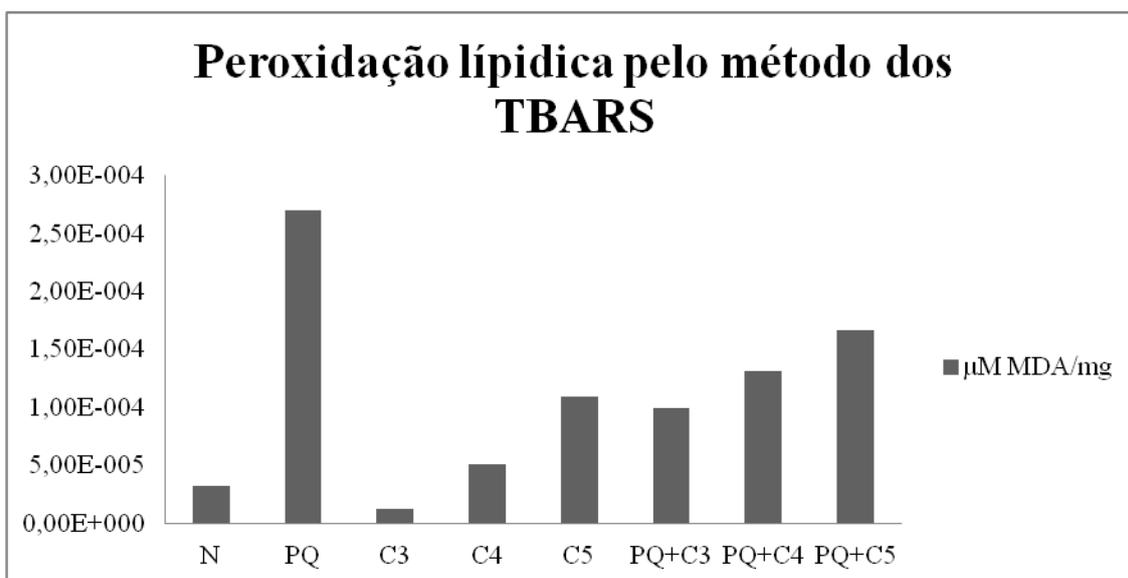
#### 4.4.1 TBARS

Os resultados obtidos pelo método dos TBARS demonstram a existência de stresse oxidativo bem definido entre os vários tratamentos, sendo relevante o potencial de redução antioxidante observado nos extratos assim como o potencial dos mesmos em reduzir o stresse provocado pelo paraquato.

No Gráfico 9 podemos observar que o conteúdo em MDA têm o seu valor máximo no grupo PQ, sendo que têm o ponto mais baixo no grupo C3, demonstrando

assim o seu potencial antioxidante. Nos meus C4 e C5 observa-se um aumento dos níveis de MDA observados, este comportamento de aumento dos níveis de MDA aquando da presença de concentrações menos elevados de extrato é patente nos grupos PQ+C3, PQ+C4 e PQ+C5.

Como se pode observar pela Tabela 7 todos os grupos apresentam diferenças significativamente diferentes do controlo negativo, N e do grupo com extrato de folhas C3. O grupo PQ, controlo positivo, apesar das diferenças expressas no Gráfico 5, não demonstra diferenças significativas entre os grupos C4, C5, PQ+C3 , PQ+C4 e PQ+C5.



**Gráfico 9:** Níveis de MDA em μM/mg obtidos pelo teste dos TBARS nos vários grupos testados

P (estatístico)	N	PQ	C3	C4	C5	PQ+C3	PQ+C4	PQ+C5
N		<b>0,037</b>	<b>0,001</b>	<b>0,014</b>	<b>0,007</b>	<b>0,037</b>	<b>0,037</b>	<b>0,037</b>
PQ			<b>0,034</b>	0,083	0,064	0,121	0,121	0,121
C3				<b>0,013</b>	<b>0,005</b>	<b>0,034</b>	<b>0,034</b>	<b>0,034</b>
C4					<b>0,034</b>	0,083	0,083	0,083
C5						0,064	0,064	0,064
PQ+C3							0,121	0,121
PQ+C4								0,121
<b>P-Value &lt;0,05</b>								
P-Value >0,05								

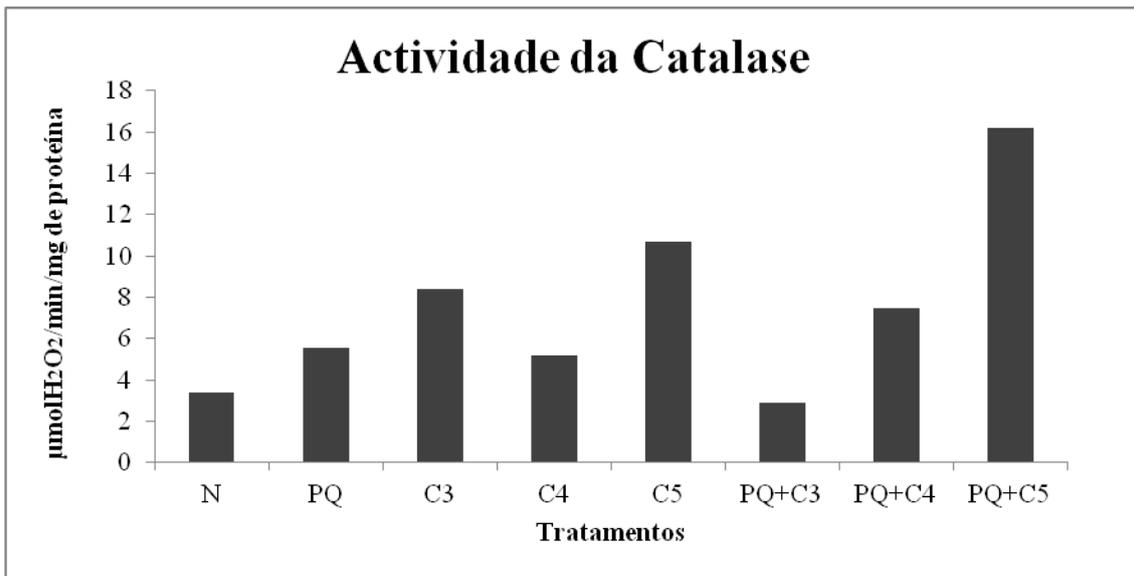
**Tabela 7:** P value obtido pelo teste Mann-Whitney bilateral do cruzamento dos resultados do teste dos TBARS

#### 4.4.2 Atividade antioxidante

Nos resultados sobre as enzimas antioxidantes podemos ver através dos Gráficos 10, 11 e 12 que os comportamentos das enzimas seguem um padrão, em que nos tratamentos do controlo positivo e onde têm uma maior concentração de extrato foliar, a resposta das enzimas verificada é mais baixa que nos meio em que existe uma concentração de extrato foliar menor. Este padrão repete-se nos tratamentos conjuntos de PQ e extratos, PQ+C3, PQ+C4 e PQ+C5.

No caso específico da Catalase podemos observar através do gráfico 10 que no tratamento C4 há uma quebra do padrão descrito anteriormente. No gráfico 10 também se verifica que o tratamento PQ+C3 ter uma resposta de atividade de catalase menos intensiva que o controlo negativo e que o tratamento PQ+C5 tem a maior resposta.

Através da análise da Tabela 8 podemos observar que todos os tratamentos têm resultados estatisticamente diferentes do controlo negativo à exceção do tratamento C4 e PQ+C3. Na mesma tabela também é possível visualizar que o resultado do tratamento PQ é estatisticamente diferente do PQ+C3 e do PQ+C5 e que comparando tratamentos apenas com extrato foliar com o homólogo que tem paraquato, observamos que apenas o resultado entre C4 e PQ+C4 não são estatisticamente significativos.

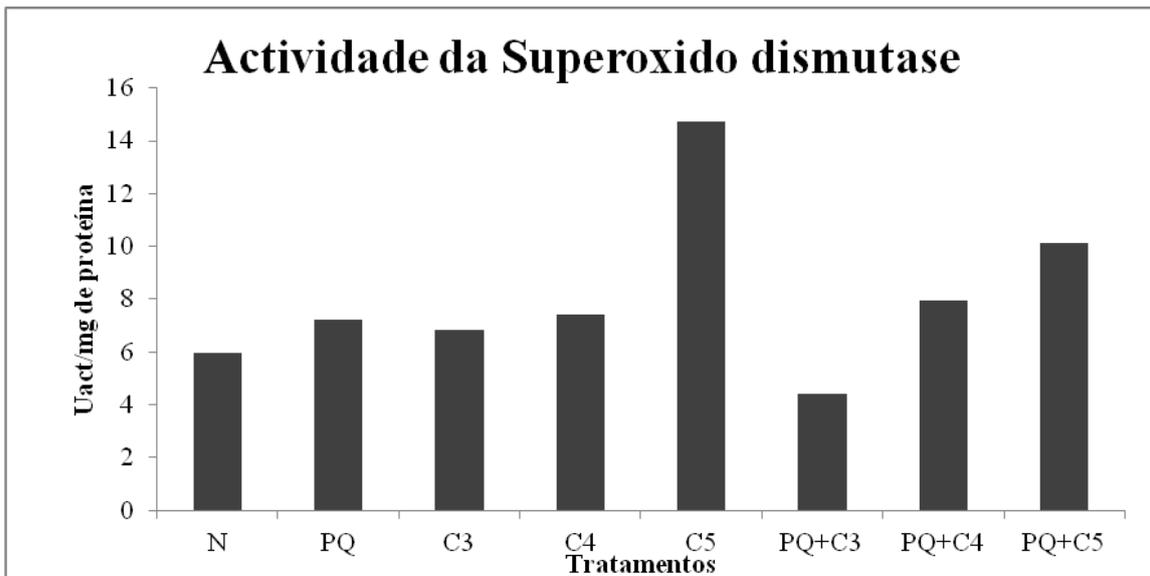


**Gráfico 10:** Níveis de atividade da Catalase medida com um elétrico de oxigénio (Hansatech) tipo Clark

P (estatístico)	<u>PQ</u>	<u>C3</u>	<u>C4</u>	<u>C5</u>	<u>PQ+C3</u>	<u>PQ+C4</u>	<u>PQ+C5</u>
N	<b>0,018</b>	<b>0,003</b>	0,288	<b>0,002</b>	0,219	<b>0,018</b>	<b>0,003</b>
	<u>PQ+C3</u>	<u>PQ+C4</u>	<u>PQ+C5</u>				
PQ	<b>0,009</b>	0,602	<b>0,006</b>				
	<u>PQ+C3</u>						
C3	<b>0,006</b>						
	<u>PQ+C4</u>						
C4	0,465						
	<u>PQ+C5</u>						
C5	<b>0,013</b>						
<b>P-Value</b>	<b>&lt;0,05</b>						
P-Value	>0,05						

**Tabela 8:** P value obtido pelo teste Mann-Whitney bilateral do cruzamento dos resultados dos níveis de Catalase

Os resultados da Superóxido dismutase mostram não existir diferença na resposta enzimática entre os tratamentos PQ, C3 e C4. Analisando o Gráfico 11 podemos nos aperceber que apenas o tratamento C5 tem uma resposta bastante mais elevada que os demais e que apesar do padrão referido, só encontramos dois casos de resultados estatisticamente diferentes, entre o N e o C5 e entre o PQ e o PQ+C3, todas as outras comparações exercidas não demonstram diferenças estatisticamente significativas.



**Gráfico 11:** Níveis de atividade da Superóxido dismutase medida com por espectrofotometria utilizando o sistema xantina-xantina oxidase

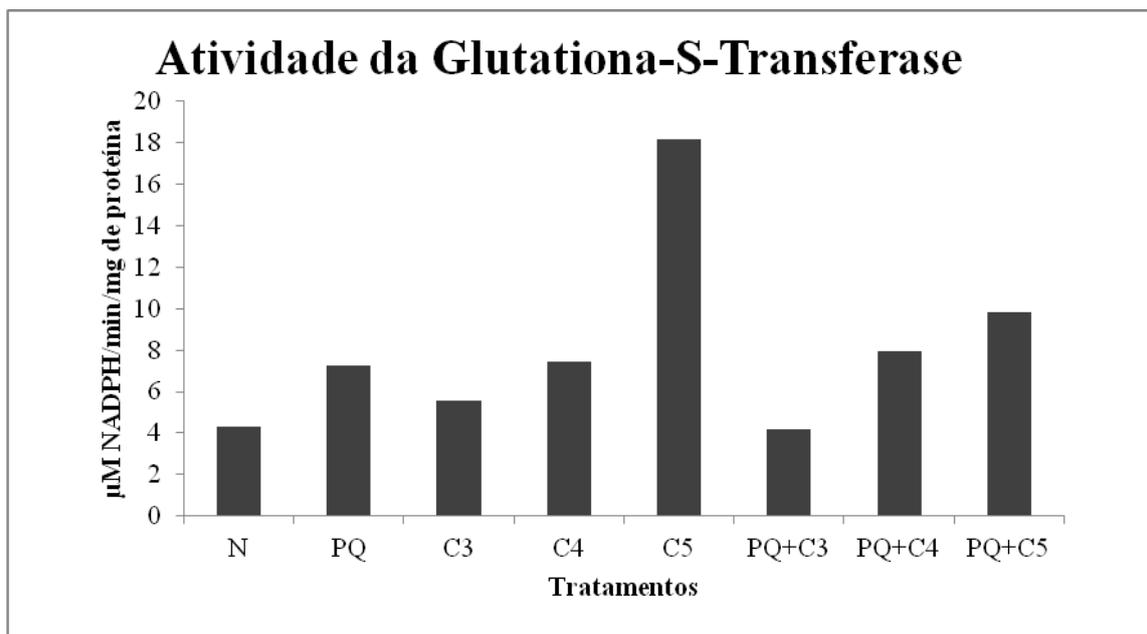
P (estatístico)	<u>PQ</u>	<u>C3</u>	<u>C4</u>	<u>C5</u>	<u>PQ+C3</u>	<u>PQ+C4</u>	<u>PQ+C5</u>
N	0,116	0,715	0,458	<b>0,008</b>	0,806	0,527	0,596
PQ		<u>PQ+C3</u>	<u>PQ+C4</u>	<u>PQ+C5</u>			
		<b>0,014</b>	0,863	0,457			
C3			<u>PQ+C3</u>				
			0,522				
C4				<u>PQ+C4</u>			
				0,751			
C5					<u>PQ+C5</u>		
					0,058		
<b>P-Value</b>	<b>&lt;0,05</b>						
P-Value	>0,05						

**Tabela 9:** P value obtido pelo teste Mann-Whitney bilateral do cruzamento dos resultados dos níveis da Superóxido dismutase

A atividade da Glutathione-S-Transferase expressa no Gráfico 12 tem um comportamento bastante semelhante ao da Superóxido dismutase seguindo o padrão já referido. Distinguindo-se, no entanto, da anterior no facto das diferenças entre C3 e C4 e entre PQ e C3 serem mais expressivas, e ainda pelo facto do controlo negativo, ter valores notoriamente mais baixos que quase todos os tratamentos.

Após a análise estatística entre tratamentos expressa na Tabela 10 podemos observar que apenas o C5 tem resultados estatisticamente diferentes de N, os

tratamentos PQ+C3 e PQ+C5 de PQ e que o C5 tem resultados estatisticamente diferentes de PQ+C5.



**Gráfico 12:** Níveis de atividade da Glutaciona S-transferase medida com por espectrofotometria medindo a formação de conjugado de CDNB

P (estatístico)	<u>PQ</u>	<u>C3</u>	<u>C4</u>	<u>C5</u>	<u>PQ+C3</u>	<u>PQ+C4</u>	<u>PQ+C5</u>
N	0,359	0,555	0,428	<b>0,043</b>	0,669	0,184	0,85
	<u>PQ+C3</u>	<u>PQ+C4</u>	<u>PQ+C5</u>				
PQ	<b>0,024</b>	0,863	<b>0,018</b>				
	<u>PQ+C3</u>						
C3	0,796						
	<u>PQ+C4</u>						
C4	0,751						
	<u>PQ+C5</u>						
C5	<b>0,007</b>						
<b>P- Value&lt;0,05</b>							
P-Value >0,05							

**Tabela 10:** P value obtido pelo teste Mann-Whitney bilateral do cruzamento dos resultados dos níveis Glutaciona-S-Transferase

Como é demonstrado nos resultados não existem diferenças estatisticamente significativas na atividade das enzimas utilizadas entre os meios testados, tendo o controlo negativo (PQ) resultados, por vezes, inferiores aos registados nas amostras (C3, C4 e C5).

## 5 Discussão

Estudos epidemiológicos e bioquímicos realizados durante a última década, sugerem que a presença de vitaminas e antioxidantes na alimentação tem um papel fundamental na saúde humana, diminuindo a incidência de várias doenças em diferentes grupos populacionais. São vários os dados que confirmam que uma presença de compostos antioxidantes fenólicos nos alimentos, que se encontram na dieta mediterrânea, juntamente com vitaminas, contribuem positivamente para a promoção da saúde [98-104]. Dados epidemiológicos, bem como estudos *in vitro* sugerem fortemente que os alimentos que contêm fitoquímicos com potencial antioxidante têm efeito protetor sobre das doenças, incluindo cancro e doenças cardiovasculares [104].

A *Corema album* tem sido objeto de vários estudos nos últimos anos mas quase todos debruçados sobre o seu papel no ecossistema, a sua fisiologia e conservação. [43-53]

Recentemente foram divulgados as primeiras publicações sobre fruto de *C. album* comparando estes com outras bagas, nomeadamente os chamados frutos vermelhos. O fruto da *C. album* é rico em compostos fenólicos sendo a maior parte deles pertencentes ao grupo dos ácidos hidroxicinâmicos apresentando uma grande atividade antioxidante [105]. Os ácidos hidroxicinâmicos naturais são de elevada importância tendo sido relatados como inibidores de proliferação de células tumorais, atividade anti-inflamatória [105] além de ser implicadas em tratamentos para várias doenças ligadas ao sangue. [105,106].

Mesmo tendo uma elevada capacidade antioxidante as camarinhas apresentam uma menor atividade que os frutos vermelhos, amoras, framboesas e morangos. Fato este que pode ter como explicação o baixo nível de antocianinas presentes nas camarinhas, comparando com as presentes nos frutos vermelhos, antocianinas estas que representam grande parte dos compostos fenólicos em frutos vermelhos [107].

Apesar destes estudos recentes nos frutos não foram encontrados trabalhos no mesmo âmbito sobre as folhas de *C. album*, assim não existe a possibilidade de comparar os resultados com estudos prévios, de qualquer modo os resultados obtidos nas folhas sobre a atividade antioxidante das mesmas não foram "estranhos", pois

resultados semelhantes foram relatos notando-se uma maior norma de uma maior atividade antioxidante em folhas comparativamente a frutos da mesma planta [108-110].

O modelo animal escolhido para este estudo foi a *D. melanogaster*, devido às suas características biológicas e porque o genoma é idêntico ao do Homem ao nível da codificação das enzimas antioxidantes estudadas [59-61].

As concentrações de extratos de folhas utilizadas neste ensaio basearam-se numa ideia realista associada a um trabalho piloto e atendendo ao facto de não existirem trabalhos científicos publicados sobre este tema nas folhas desta planta. No decurso do protocolo experimental o número de adultos eclodidos foram observados e registados como medida de toxicidade de forma a escolher as concentrações apropriadas.

Na atualidade a capacidade antioxidante de um produto é uma mais-valia para a valorização do mesmo, as folhas de *Corema album* demonstraram uma intensa capacidade antioxidante, 7,44 mg de Eq de GAE/g de folha, comparando com o fruto [111], no entanto percebe-se pelo número de adultos eclodidos que as diferentes concentrações de extrato foliar nos tratamentos não tem um efeito positivo mas sim negativo como se pode verificar pelos gráficos 1 e 2. Nestes observamos uma diminuição do número de descendentes de uma forma curiosa, C3=117, C4=103 e C5=108 no caso dos extratos foliares do ensaio teste C3=52, C4=109 e C5=101 no caso dos extratos foliares, em ambos os ensaios o tratamento controlo teve descendência mais elevada N=147. Estes resultados podiam ser imputados ao próprio metanol por isso fizeram-se 3 tratamentos com 3 concentrações análogas às dos extratos, sendo que os resultados apontam para uma influência negativa do metanol mas não para codependência dos resultados dos extratos foliares pois os extratos do ensaio teste apresentam descendências com valores próximos, em pelo menos duas concentrações. Além do facto de os tratamentos com extratos foliares terem menos adultos eclodidos estes exibem danos no ADN estatisticamente superiores, observáveis pelo SMART, ao controlo negativo em duas concentrações e ao controlo positivo na concentração C5, dados que apontam para toxicidade do extrato e que são reforçados pela observação dos danos basais obtidos nos neuroblastos das *D. melanogaster* que revelam danos no DNA aproximadamente 3 vezes superiores aos encontrados no tratamento controlo.

A análise efetuada sobre o stresse oxidativo, revelou que apesar de termos os danos no DNA acima referidos e uma menor descendência, pela análise incidida sobre a Catalase, Superóxido dismutase e a Glutathione-S-Transferase percebe-se que estas enzimas têm uma maior atividade no extrato com menor concentração, C5 . Este aspeto

pode estar relacionado com os níveis de antioxidantes presentes nas folhas da planta. O facto de existir uma elevada capacidade antioxidante nos extratos foliares testados parece ter algum efeito na resposta por parte das enzimas antioxidantes referidas pois esta é mais intensa nos indivíduos provenientes do tratamento C5. Esta afirmação ganha uma maior consistência, devido a análise dos resultados dos TBARS que demonstram uma maior peroxidação lipídica nas amostras dos tratamentos C4 e C5 revelando assim propriedades pró-oxidantes nas concentrações mais baixas.

É bastante curioso observar que a toxicidade nos extratos foliares nas concentrações mais elevadas apresenta os valores mais elevados, pelo inverso para esses mesmos extratos observamos que o nível de peroxidação lipídica e quantidade das enzimas antioxidantes é o mais baixo. Estes dados podem ser um sinal contrário ao descrito por alguns autores que defendem que a proteção contra danos do ADN pode ser atribuída ao potencial antioxidante existente nos compostos estudados [112]. Observando os gráficos 3,4 e 5 e as tabelas 1,2 e 3 podemos observar que tanto isoladamente como em conjunto com o tratamento PQ, o extrato foliar menos concentrado, C5, revela um menor número de danos basais mostrando uma capacidade protetora em relação aos efeitos provocados por PQ.

Comparando os resultados do controlo tratamento PQ, com os dos tratamentos de paraquato com as diferentes concentrações de extratos foliares observamos que no caso das enzimas antioxidantes quanto maior é a concentração do extrato menor é a resposta enzimática passando-se o mesmo na peroxidação lipídica, mas ao analisar a genotoxicidade verificamos que existe um efeito cumulativo entre o paraquato e os extratos foliares sendo que no tratamento PQ+C3 exhibe diferenças significativas de um maior número de danos comparando com o tratamento PQ.

Assim é expectável que o extrato foliar tenha atividade pró-oxidante e antioxidante assim como uma genotoxicidade que depende da concentração do extrato que pode ser mais tendenciosa para um dos aspetos, antioxidante ou pró-oxidante além de ser mais ou menos genotóxica.

A natureza antioxidante/pró-oxidante de extratos foliares já foi descrita em plantas utilizadas pelo homem, em infusões, como no caso das folhas do chá [113]. No estudo feito sobre extratos das folhas de chá verde percebe-se que apesar da natureza antioxidante que os extratos foliares podem também, dependendo das condições experimentais, apresentar uma atividade pró-oxidante, sendo que o tipo de atividade

apresentada pode estar associado á concentração de polifenóis, pelo menos *in vitro* [113].

Os polifenóis estão presentes na alimentação humana em vários alimentos nomeadamente nos frutos vermelhos e a dualidade de comportamento antioxidante/pró-oxidante já foi demonstrada em alguns estudos., apesar dos polifenóis serem antioxidantes bastante eficientes eles, pelo menos alguns, podem apresentar uma atividade pró-oxidante, esta divergência de atividades pode ter como causas a concentração dos compostos, meio envolvente e pH entre outros [115-119]. Algumas características pró-oxidantes relatadas aos polifenóis advêm de produtos secundários , radicais oxidantes, que por vezes são resultado de um processo antioxidante desenrolado por esses mesmos polifenóis. Estes radicais formados podem oxidar tanto proteínas como lípidos [114].

Assim em parte os resultados obtidos pelas enzimas antioxidantes e para a peroxidação lipídica podem assim ser percebidos, pois tal como é referido para as diferentes concentrações de extrato mostram comportamentos diferentes, tanto nos tratamentos em que estas aparecem isolados como nos tratamentos em que elas aparecem em conjunto com o PQ (ver gráficos 9 a 12) [115-119].

A análise dos danos basais nos quatro tipos diferentes de ensaio também mostra que os extratos foliares inibem a ação pró-oxidante do paraquato. Verifica-se também que a presença do metanol no extrato foliar não parece ter qualquer efeito significativo nos danos oxidativos provocados no ADN nos tratamentos PQ+C3, PQ+C4 e PQ+C5.

Após a obtenção dos resultados procedeu-se a tentativa de se perceber se existia correlações entre as diferentes variáveis testadas para os dados dos tratamentos N, C3, C4 e C5 e para os tratamentos PQ, PQ+C3, PQ+C4 e PQ+C5.

Os vários resultados permitiram perceber que o extrato de folhas de *C. album* apresentam atividade pró e antioxidante ao mesmo tempo, sendo que este equilíbrio preferencialmente antioxidante em concentrações mais elevadas e mais pró-oxidante em concentrações mais baixas. Estes resultados mostram ainda que o extrato foliar é genotóxico e que provoca danos no ADN em todas as concentrações testadas apesar de o número de danos ser superior nas concentrações mais elevadas.

Apesar destes aspetos o extrato foliar mostrou-se bastante interessante na redução dos efeitos nocivos do paraquato positivo, tanto ao nível da genotoxicidade como nos resultados de defesa antioxidante e stresse oxidativo, estes efeitos em relação ao paraquato têm a particularidade de serem mais eficientes em diferentes concentrações

para o stresse oxidativo e atividade antioxidante e para a genotoxicidade. Em relação á genotoxicidade observa-se que é a concentração que revela menos danos e menor capacidade antioxidante, C5, que demonstra a maior capacidade de reduzir os danos provocados pelo paraquato (ver gráficos 3 e 5). Em relação á atividade antioxidante e stresse oxidativo podemos observar que antagonicamente ao que acontece no ao nível da genotoxicidade, a concentração que se revela mais eficiente na redução dos efeitos provocados pelo paraquato é a mais genotóxica e a mais antioxidante, C3 (ver gráficos de 9 a 12). Estes resultados revelam uma possível independência do modo que o extrato reduz o efeito do paraquato nos neuroblastos em relação ao que acontece no resto do corpo.

Deste modo podemos perceber que existem compostos no extrato que podem ser interessantes como antioxidantes e até potencialmente protetores contra agentes agressores como é o caso do paraquato, mas pelo conjunto de dados obtidos pelos resultados podemos perceber que o extrato possui também propriedades genotóxicas que parecem ter mais influência na descendência que o stresse oxidativo encontrado. O menor número de danos basais e um maior nível de stresse oxidativo registado é encontrado nas concentrações mais baixas enquanto nas concentrações mais elevadas do extrato observamos um maior número de danos basais e um menor stresse oxidativo registado.

No entanto, é necessário a obtenção de mais dados que possam corroborar estes resultados pois é possível que seja o conjunto de compostos, em princípio, antioxidantes e que inibem a ação do paraquato os mesmos que também provocam danos no ADN assim como é possível que não o sejam. Só com estudos mais aprofundados é que podemos ter mais informações e informações mais concretas e completas sobre os extratos da *C. album*.

## 6 Conclusões

- Os extratos mostram ter bastante poder antioxidante.
- Apesar do poder antioxidante estes também demonstram ser pró-oxidantes denotando-se um equilíbrio entre estas duas vertentes mais favorável aos antioxidantes nas concentrações superiores e mais favorável à pró-oxidante à medida que a concentração vai descendo.
- Em todas as concentrações os extratos foliares provam ser genotóxicos havendo uma relação de retroação positiva entre a concentração dos mesmos e o dano provocado.
- Os extratos mostram um efeito protetor à ação do paraquato, tanto a nível da redução de danos no ADN como ao nível da redução do stresse oxidativo provocado por este composto. Sendo que este efeito tem o seu epiteto em concentrações diferentes para redução de danos no ADN e para redução do stresse oxidativo.
- A relação direta entre o número de adultos eclodidos e o grau de toxicidade do extrato não foi confirmada

## 7 Perspetivas futuras

Este foi um trabalho piloto sobre as folhas da *C. album*, dando algumas respostas e levantando diversas questões. Para melhor compreender os efeitos observados terá de se perceber qual ou quais os compostos que provocam estes efeitos, se são os compostos antioxidantes os mesmos a provocar os danos no ADN. Assim deste modo poderia ser possível saber se o efeito genotóxico registado pode ser dissociado da sua capacidade antioxidante assim como saber se este efeito protetor sobre o paraquato advém apenas da sua capacidade antioxidante ou se é através de outro mecanismo.

Assim a caracterização dos compostos presentes nos extratos foliares assim como a separação dos mesmos é de extrema importância, de modo a se poder avaliar a ação individual que cada dos compostos.

A *D. melanogaster* revelou-se um modelo bastante sensível sendo interessante em trabalhos futuros, no entanto, será também importante a realização de testes em organismos superiores tais como mamíferos e *in vitro* em culturas de células humanas de modo a ter-se mais dados sobre os efeitos dos compostos presentes nestes extratos.

Estes são apenas algumas ideias de complemento ao trabalho realizado visto que esta é uma planta ainda muito pouco investigada.

## 8 Bibliografia

1. Gerschman, Rebeca, et al. "Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common." *Science of Aging Knowledge Environment* 2005.17 (2005): cp1.
2. Srivastava, Satish K., and Ernest Beutler. "Glutathione metabolism of the erythrocyte. The enzymic cleavage of glutathione–haemoglobin preparations by glutathione reductase." *Biochemical Journal* 119.3 (1970): 353.
3. Gil del Valle, Lizette. "Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans." *Biomedicine & Aging Pathology* 1.1 (2011): 1-7.
4. Kasai, Hiroshi. "Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 387.3 (1997): 147-163.
5. Huang, Yeou-Lih, Jenn-Yuan Sheu, and Te-Hsien Lin. "Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer." *Clinical biochemistry* 32.2 (1999): 131-136.
6. Brown, Nicholas S., and Roy Bicknell. "Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer." *Breast Cancer Res* 3.5 (2001): 323-327.
7. Panis, C., et al. "Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy." *Breast cancer research and treatment* 133.1 (2012): 89-97.
8. "Dicionário Da Língua Portuguesa - Com Acordo Ortográfico." *Pesquisa Global*. N.p., n.d. Web. 10 Sept. 2011. <<http://www.infopedia.pt/pesquisa-global/tóxico>>
9. Hodgson, Ernest. "Toxicology." *Pesquisa Global*. N.p., 7 Jan. 2005. Web. 21 Mar.2012.  
<[http://search.toxicology.org/search?entqr=0&output=xml\\_no\\_dtd&sort=date%3AD%3A1%3Ad1&client=SOT&ud=1&oe=UTF-8&ie=UTF-8&proxystylesheet=SOT&site=SOT&q=definition+of+toxicology](http://search.toxicology.org/search?entqr=0&output=xml_no_dtd&sort=date%3AD%3A1%3Ad1&client=SOT&ud=1&oe=UTF-8&ie=UTF-8&proxystylesheet=SOT&site=SOT&q=definition+of+toxicology)>.
10. [medicina.med.up.pt/legal/NocoesGeraisCF.pdf](http://medicina.med.up.pt/legal/NocoesGeraisCF.pdf),

11. GreenFacts. "Genotoxic-genotoxicity." Pesquisa Global. Scientific Committees, n.d. Web. 21 Mar. 2012. <<http://ec.europa.eu/health/opinions2/en/electromagnetic-fields/glossary/ghi/genotoxic-genotoxicity.htm>>
12. Araújo, Ana Elizabeth Oliveira de. "Avaliação da genotoxicidade dos gases derivados do petróleo em trabalhadores expostos ocupacionalmente em ambiente fechado." (2009).
13. Gomes-Carneiro, Maria Regina, Luís Felipe Ribeiro-Pinto, and Francisco José Roma Paumgartten. "Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico: a visão do toxicologista Environmental risk factors for gastric cancer: the toxicologist's standpoint." *Cad. Saúde Públ* 13.Supl 1 (1997): 27-38.
14. Barreiros, A. L. B. S., Jorge M. David, and Juceni P. David. "Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo." *Química nova* 29.1 (2006): 113.
15. Shrilatha, B. "Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: Its progression and genotoxic consequences." *Reproductive Toxicology* 23.4 (2007): 578-587.
16. Doreswamy, Kodipura, Balakrishna Shrilatha, and Thimappa Rajeshkumar. "Nickel-Induced Oxidative Stress in Testis of Mice: Evidence of DNA Damage and Genotoxic Effects." *Journal of andrology* 25.6 (2004): 996-1003.
17. Martindale, Jennifer L., and Nikki J. Holbrook. "Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival\*." *Journal of cellular physiology* 192.1 (2002): 1-15.
18. Beyer, Robert E. "The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q." *Journal of bioenergetics and biomembranes* 26.4 (1994): 349-358.
19. Pinnell, Sheldon R. "Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection." *Journal of the American Academy of Dermatology* 48.1 (2003): 1-22.
20. Rice-Evans, Catherine. "Implications of the mechanisms of action of tea polyphenols as antioxidants in vitro for chemoprevention in humans." *Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine* 220.4 (1999): 262-266.

21. Halliwell, Barry, and John MC Gutteridge. Free radicals in biology and medicine. Vol. 135. Oxford: Oxford university press, 1999.
22. McCord, Joe M., and Irwin Fridovich. "Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein)." *Journal of Biological chemistry* 244.22 (1969): 6049-6055.
23. Johnson, Felicity, and Cecilia Giulivi. "Superoxide dismutases and their impact upon human health." *Molecular aspects of medicine* 26.4 (2005): 340-352.
24. Zelko, Igor N., Thomas J. Mariani, and Rodney J. Folz. "Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression." *Free Radical Biology and Medicine* 33.3 (2002): 337-349.
25. Schrader, Michael, and H. Dariush Fahimi. "Peroxisomes and oxidative stress." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1763.12 (2006): 1755-1766.
26. Nordberg, Jonas, and Elias SJ Arner. "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." *Free radical biology and medicine* 31.11 (2001): 1287-1312.
27. Salinas, Anna E., and Margaret G. Wong. "Glutathione S-transferases-a review." *Current medicinal chemistry* 6.4 (1999): 279-310.
28. Hemingway, Janet, et al. "The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes." *Insect biochemistry and molecular biology* 34.7 (2004): 653-665.
29. Klaassen, Curtis D., and John B. Watkins III. *Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange)*. Grupo A. pag.95
30. Wilce, M. C., and M. W. Parker. "Structure and function of glutathione S-transferases." *Biochimica et biophysica acta* 1205.1 (1994): 1-18.
31. Huber, Paula C., Wanda P. Almeida, and A. de FÁTIMA. "Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos." *Química Nova* 31.05 (2008): 1170-1179.
32. Ketterer, B. "Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases." *Xenobiotica* 16.10-11 (1986): 957-973.
33. Warholm, Margareta, Claes Guthenberg, and Bengt Mannervik. "Molecular and catalytic properties of glutathione transferase. mu. from human liver: an enzyme efficiently conjugating epoxides." *Biochemistry* 22.15 (1983): 3610-3617.

34. Monks, Terrence J., and Serrine S. Lau. "Glutathione,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, and the mercapturic acid pathway as modulators of 2-bromohydroquinone oxidation." *Toxicology and applied pharmacology* 103.3 (1990): 557-563.
35. Dekant, Wolfgang, and Spyridon Vamvokos. "Formation and Fate of Nephrotoxic and Cytotoxic Glutathione S-Conjugates: Cysteine Conjugate B-Lyase Pathway." *Conjugation-Dependent Carcinogenicity and Toxicity of Foreign Compounds* 30 (1994): 115.
36. Hemingway, Janet, et al. "The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes." *Insect biochemistry and molecular biology* 34.7 (2004): 653-665.
37. Small, Graham J., and Janet Hemingway. "Molecular characterization of the amplified carboxylesterase gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*." *Insect Molecular Biology* 9.6 (2000): 647-653.
38. Vontas, John G., Graham J. Small, and Janet Hemingway. "Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*." *Biochemical Journal* 357.Pt 1 (2001): 65.
39. Ranson, Hilary, et al. "Cloning and localization of a glutathione S-transferase class I gene from *Anopheles gambiae*." *Journal of Biological Chemistry* 272.9 (1997): 5464-5468.
40. Halvorsen, Bente L., et al. "A systematic screening of total antioxidants in dietary plants." *The Journal of Nutrition* 132.3 (2002): 461-471.
41. Jain, Meera G., et al. "Plant foods, antioxidants, and prostate cancer risk: findings from case-control studies in Canada." *Nutrition and cancer* 34.2 (1999): 173-184.
42. Guitián, Pablo, Mónica Medrano, and Mónica Rodríguez. "Reproductive biology of *Corema album* (L.) D. Don (Empetraceae) in the northwest Iberian Peninsula." *Acta Botanica Gallica* 144.1 (1997): 119-128.
43. Zunzunegui, M., et al. "Ecophysiology, growth timing and reproductive effort of three sexual forms of *Corema album* (Empetraceae)." *Plant Ecology* 183.1 (2006): 35-46.
44. Álvarez-Cansino, Leonor, et al. "Physiological performance and xylem water isotopic composition underlie gender-specific responses in the dioecious shrub *Corema album*." *Physiologia plantarum* 140.1 (2010): 32-45.

45. [http://www.jb.utad.pt/pt/herbario/cons\\_reg\\_todos1.asp?ID=6](http://www.jb.utad.pt/pt/herbario/cons_reg_todos1.asp?ID=6)
46. Guitián, Pablo, Mónica Medrano, and Mónica Rodríguez. "Reproductive biology of *Corema album* (L.) D. Don (Empetraceae) in the northwest Iberian Peninsula." *Acta Botanica Gallica* 144.1 (1997): 119-128.
47. Calviño-Cancela, María. "Ingestion and dispersal: direct and indirect effects of frugivores on seed viability and germination of *Corema album* (Empetraceae)." *Acta Oecologica* 26.1 (2004): 55-64.
48. Calviño-Cancela, María. "Seed and microsite limitations of recruitment and the impacts of post-dispersal seed predation at the within population level." *Plant Ecology* 192.1 (2007): 35-44.
49. Calviño-Cancela, María. "Spatial patterns of seed dispersal and seedling recruitment in *Corema album* (Empetraceae): the importance of unspecialized dispersers for regeneration." *Journal of Ecology* 90.5 (2002): 775-784.
50. Calviño-Cancela, María. "Fruit consumers and seed dispersers of the rare shrub *Corema album*, Empetraceae in coastal sand dunes." *Rev Eco Terre Vie* 60 (2005): 97-106.
51. Clavijo, A., Barradas, M.C.Diaz., et al. "A conservação de *Corema album* no litoral atlântico da Península Ibérica; a influência de dispersores animais na regeneração natural." *Revista Biologia (Lisboa)*, 21 (2003): 43-56.
52. Martín, Rosalía, Alejandro Rodríguez, and Miguel Delibes. "Local feeding specialization by badgers (*Meles meles*) in a Mediterranean environment." *Oecologia* 101.1 (1995): 45-50.
53. Barradas, M. C.Diaz., Correia, O., et al. "Distribuição de sexos na espécie dióica *Corema album* ao longo de um gradiente climático". *Revista Biologia (Lisboa)*, 18 (2000): 7-22.
54. Clavijo, A., Barradas, M.C.D., Ain-Lhout, F., Zunzunegui, M., Correia, O. "A fragmentação como causa principal da redução do habitat de *Corema album* na sua área de distribuição." *Revista Biologia (Lisboa)*, 20 (2002): 109-120.
55. Izhaki, I., and U. N. Safriel. "The effect of some Mediterranean scrubland frugivores upon germination patterns." *The Journal of Ecology* (1990): 56-65.
56. Barnea, A., Y. Yom-Tov, and J. Friedman. "Does ingestion by birds affect seed germination?." *Functional Ecology* (1991): 394-402.

57. Traveset, Anna, Javier Rodríguez-Pérez, and Beatriz Pías. "Seed trait changes in dispersers' guts and consequences for germination and seedling growth." *Ecology* 89.1 (2008): 95-106.
58. Rubin, Gerald M. "Drosophila melanogaster as an Experimental Organism." *Science* 240 (1988): 4858.
59. Missirlis, F., et al. "Drosophila and Antioxidant Therapy Design." *Medimond* (2003): 147-151.
60. Wickens, Andrew P. "Ageing and the free radical theory." *Respiration physiology* 128.3 (2001): 379-391.
61. Siddique, Hifzur R., et al. "Validation of Drosophila melanogaster as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay." *Mutagenesis* 20.4 (2005): 285-290.
62. Prakash, H. S., and G. Sreerama Reddy. "Drosophila fauna of Nagarhole, South India, including description of a new species (Diptera: Drosophilidae)." *Proceedings: Animal Sciences* 89.3 (1980): 235-241.
63. Festing, Michael Francis Wogan, et al. "Reducing the use of laboratory animals in biomedical research: problems and possible solutions." *ATLA-NOTTINGHAM-* 26 (1998): 283-302.
64. Benford, Diane J., et al. "Biomarkers as predictive tools in toxicity testing." *ATLA-NOTTINGHAM-* 28.1 (2000): 119-132.
65. Morgan, T. H. "Sex-limited inheritance in Drosophila." *Science* 32 (1910): 120-122.
66. Schüpbach, Trudi. "Normal female germ cell differentiation requires the female X chromosome to autosome ratio and expression of Sex-lethal in Drosophila melanogaster." *Genetics* 109.3 (1985): 529-548.
67. Lucchesi, John C., and Thomas Skripsky. "The link between dosage compensation and sex differentiation in Drosophila melanogaster." *Chromosoma* 82.2 (1981): 217-227.
68. Gilbert, S.E. "Developmental Biology". Sinauer Associates Inc., Sunderland. 7<sup>a</sup> Edition (2003): 307-355; 711-748.
69. Wilson, Leslie, et al. "Drosophila melanogaster: Practical Uses in Cell and Molecular Biology" Volume 44 (1995). Academic Press.

70. Agard, David A., and John W. Sedat. "Three-dimensional architecture of a polytene nucleus." *Nature* 302.5910 (1983): 676-681.
71. Johansen, Kristen M., et al. "Polytene chromosome squash methods for studying transcription and epigenetic chromatin modification in *Drosophila* using antibodies." *Methods* 48.4 (2009): 387-397.
72. Gaivão, Isabel, L. Maria Sierra, and Miguel A. Comendador. "The w/w SMART assay of *Drosophila melanogaster* detects the genotoxic effects of reactive oxygen species inducing compounds." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 440.2 (1999): 139-145.
73. Nazir, A., et al. "Chlorpyrifos-induced hsp70 expression and effect on reproductive performance in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg 9." *Archives of environmental contamination and toxicology* 41.4 (2001): 443-449.
74. Nazir, Aamir, et al. "Evaluation of the no observed adverse effect level of solvent dimethyl sulfoxide in *Drosophila melanogaster*." *Toxicology Mechanisms and Methods* 13.2 (2003): 147-152.
75. Nazir, Aamir, et al. "Evaluation of toxic potential of captan: Induction of hsp70 and tissue damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg9." *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 17.2 (2003): 98-107.
76. Nazir, Aamir, Daya Krishna Saxena, and Debapratim Kar Chowdhuri. "Induction of hsp70 in transgenic *Drosophila*: biomarker of exposure against phthalimide group of chemicals." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1621.2 (2003): 218-225.
77. Kar Chowdhuri, D., D. K. Saxena, and P. N. Viswanathan. "Effect of Hexachlorocyclohexane (HCH), Its Isomers, and Metabolites on Hsp70 Expression in Transgenic *Drosophila melanogaster*." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 63.1 (1999): 15-25.
78. Kar Chowdhuri, D., Nazir, A. and D. K. Saxena, "Effect of three chlorinated pesticides on hsrw stress gene in transgenic *Drosophila melanogaster*." *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 15 (2001): 173±186.
79. Mohankumar, Mary N., et al. "DNA damage and integrity of UV-induced DNA repair in lymphocytes of smokers analysed by the comet assay." *Mutation*

- Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 520.1 (2002): 179-187.
80. Mukhopadhyay, I., et al. "Toxicity of argemone oil: Effect on hsp70 expression and tissue damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg 9." *Cell biology and toxicology* 18.1 (2002): 1-11.
81. Vogel, E. W., and J. A. Zijlstra. "Somatic cell mutagenicity in *Drosophila melanogaster* in comparison with genetic damage in early germ-cell stages." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 180.2 (1987): 189-200.
82. Vogel, Ekkehart W. "Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy." *Mutagenesis* 2.3 (1987): 161-171.
83. Würgle, Friedrich E., and Ekkehart W. Vogel. "In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*." *Chemical mutagens*. Springer US, 1986. 1-72.
84. Vogel, E. W., and J. A. Zijlstra. "Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*." *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 182.5 (1987): 243-264.
85. Östling, O., and K. J. Johanson. "Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell." *International Journal of Radiation Biology* 52.5 (1987): 683-691.
86. Speit, Günter, and Claudia Dennog. "Untersuchungen zur genotoxischen Wirkung von oxidativem Streß." *Mutagenesis* 11 (1996): 605-609.
87. Silva, Juliana da, et al. "An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents." *Genetics and Molecular Biology* 23.1 (2000): 241-245.
88. Ozgen, Mustafa, et al. "Modified 2, 2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2, 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods." *Journal of agricultural and food chemistry* 54.4 (2006): 1151-1157.

89. Magalhães, Luís M., et al. "Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties." *Analytica chimica acta* 613.1 (2008): 1-19.
90. Neves, L. C., S. M. Alencar, and S. T. Carpes. "Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*." *VII BMCFB* (2009): 107-10.
91. Gornall, Allan G., Charles J. Bardawill, and Maxima M. David. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *177* (1949): 751-766
92. McCord, Joe M., and Irwin Fridovich. "The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase." *Journal of Biological Chemistry* 243.21 (1968): 5753-5760.
93. del Rio, Luis A., et al. "A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode: application to the kinetic study of the pea leaf enzyme." *Analytical biochemistry* 80.2 (1977): 409-415.
94. Chikezie, P. C., A. A. Uwakwe, and C. C. Monago. "Glutathione S-transferase activity of erythrocyte genotypes HbAA, HbAS and HbSS in male volunteers administered with fansidar and quinine." *African Journal of Biochemistry Research* 3.5 (2009): 210-214.
95. Ottolenghi, Athos. "Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipides." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 79 (1959): 355-363.
96. Siegel, S., and N. J. Castellan Jr. "Jr Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences (2e) McGraw-Hill." New York (1988).
97. Frei, H., and F. E. Würigler. "Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result." *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 203.4 (1988): 297-308.
98. Block, Gladys, Blossom Patterson, and Amy Subar. "Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence." *Nutrition and cancer* 18.1 (1992): 1-29.
99. Miles, Elizabeth A., Pinelope Zoubouli, and Philip C. Calder. "Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures." *Nutrition* 21.3 (2005): 389-394.
100. Paiva-Martins, Fatima, and Michael H. Gordon. "Interactions of ferric ions with olive oil phenolic compounds." *Journal of agricultural and food chemistry* 53.7 (2005): 2704-2709.

101. Palmerini, Carlo A., et al. "Activity of olive oil phenols on lymphomonocyte cytosolic calcium." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16.2 (2005): 109-113.
102. Singh, Indu, et al. "The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function." *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 18.2 (2008): 127-132.
103. Visioli, Francesco, Andrea Poli, and Claudio Gall. "Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil." *Medicinal research reviews* 22.1 (2002): 65-75.
104. Kaur, Charanjit, and Harish C. Kapoor. "Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables." *International Journal of Food Science & Technology* 37.2 (2002): 153-161.
105. León-González, Antonio J., et al. "Chemo-protective activity and characterization of phenolic extracts from *Corema album*." *Food Research International* (2012).
106. Perrine, Susan Park, and Douglas V. Faller. "S ISOMERS OF ALPHA-METHYL HYDROCINNAMIC ACID FOR THE TREATMENT OF BLOOD DISORDERS." U.S. Patent No. 20,120,283,329. 8 Nov. 2012.
107. León-González, Antonio J., et al. "Phenolic acids, flavonols and anthocyanins in *Corema album* (L.) D. Don berries." *Journal of Food Composition and Analysis* (2012).
108. Wang, Shiow Y., and Hsin-Shan Lin. "Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage." *Journal of agricultural and food chemistry* 48.2 (2000): 140-146.
109. Siddhuraju, P., P. S. Mohan, and K. Becker. "Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum ( *Cassia fistula* L.): a preliminary assessment of crude extracts from stem bark, leaves, flowers and fruit pulp." *Food chemistry* 79.1 (2002): 61-67.
110. Kubola, Jittawan, and Sirithon Siriamornpun. "Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd ( *Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts *in vitro*." *Food Chemistry* 110.4 (2008): 881-890.
111. Macedo, Diana Leonor Constantino. "Polyphenols as antioxidants in Parkinson's disease: protein aggregates in cellular models." (2010).

112. Skandrani, I., et al. "Assessment of phenolic content, free-radical-scavenging capacity genotoxic and anti-genotoxic effect of aqueous extract prepared from *Moricandia arvensis* leaves." *Food and Chemical Toxicology* 48.2 (2010): 710-715.
113. Forester, Sarah C., and Joshua D. Lambert. "The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention." *Molecular nutrition & food research* 55.6 (2011): 844-854.
114. Ferguson, Lynnette R. "Role of plant polyphenols in genomic stability." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 475.1 (2001): 89-111.
115. Halliwell, Barry. "Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies?." *Archives of biochemistry and biophysics* 476.2 (2008): 107-112.
116. Zhou, Lisa, and Ryan J. Elias. "Antioxidant and pro-oxidant activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate in food emulsions: Influence of pH and phenolic concentration." *Food chemistry* (2012).
117. Choueiri, Lamis, et al. "Antioxidant/pro-oxidant properties of model phenolic compounds. Part II: Studies on mixtures of polyphenols at different molar ratios by chemiluminescence and LC-MS." *Food Chemistry* 133.3 (2012): 1039-1044.
118. Yordi, Estela Guardado, et al. "Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence." *Nutrition, Well-Being and Health: InTech* (2012).
119. Decker, A. "Phenolics: prooxidants or antioxidants?." *Nutrition Reviews* 55.11 (1997): 396-398.