



AVALIAÇÃO DE EFEITOS MUTAGÊNICOS DE UM COMPOSTO MONOTERPENO EM BACTÉRIAS

Cleonice Hoffmann¹
Jaqueline Nascimento Picada²

Resumo

Gama-decanolactona (GD) é um monoterpeneo com atividade no sistema nervoso central (SNC), incluindo hipnótica, anticonvulsivante e indutora de hipotermia. Porém poucos estudos avaliaram este composto quanto as suas atividades mutagênicas. O teste de *Salmonella*/microssomal ou teste de AMES, é usado para avaliar mutações gênicas induzidas por substâncias com potencial uso farmacológico. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a mutagenicidade deste composto, utilizando 5 (cinco) linhagens das bactérias *Salmonellatyphimurium*, através do teste de AMES, na ausência de S9 mix. Os resultados demonstraram que gama-decanolactona não induziu atividade mutagênica de forma significativa nas 5 (cinco) linhagens testadas, na ausência de ativação metabólica (S9 mix).

Palavras-chave: teste de Ames, mutagenicidade, produtos naturais

INTRODUÇÃO

O teste de *Salmonella*/microssomal ou teste de AMES, é usado para avaliar a atividade mutagênica de uma substância e, conseqüentemente, o seu potencial carcinogênico (MARON; AMES, 1983). O teste de AMES, é realizado in vitro e caracteriza-se pela utilização de linhagens de bactérias *Salmonella typhimurium* sensíveis a substâncias capazes de induzir diferentes tipos de mutação. Estas linhagens, na presença de agentes mutagênicos, reverterem seu caráter de auxotrofia para síntese de histidina e passam a formar colônias em um meio desprovido deste aminoácido. Desta forma, é possível estabelecer a ação mutagênica de um composto em função de sua concentração, através da contagem de colônias por placa. Esse teste ainda apresenta reprodutibilidade, baixo custo, aplicação generalizada e análise de

1 Aluna do curso de graduação de Biomedicina – Bolsista PROBIC/Fapergs – cleo2506@hotmail.com

2 Professora do PPGBIOSAÚDE – jnpicada@gmail.com

várias amostras em curto espaço de tempo, características que facilitam a comparação entre vários resultados.

A Gama-decanolactona(GD) é um composto monoterpeneo, estruturalmente relacionada com lactonas presentes em óleo essencial de *Aeollanthussuaveolens* (usado como remédio por caboclos na Amazônia). Esta substância demonstrou ser ativa em alguns modelos animais, tais como convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) e tarefas de campo aberto (ELISABETSKY et al., 1995; COELHO DE SOUZA et al., 1997; VIANA et al., 2007).

A avaliação deste composto psicofarmacológico em ratos revelou que ele tem um efeito dose-dependente no sistema nervoso central (SNC), incluindo hipnótico, anticonvulsivante e indutor de hipotermia; a administração em dose única de GD revelou seu efeito protetor contra convulsões induzidas por pentilenotetrazol (Coelho de Souza et al., 1997). Os resultados sugeriram efeitos protetores associados com atividade anticonvulsivante, e indicaram que GD é capaz de inibir a ligação de glutamato em córtex (Pereira et al, 1997; Viana et al, 2007; De Oliveira et al., 2008). GD não alterou o comportamento dos animais no labirinto em cruz elevado e nado forçado, sugerindo que este composto não apresenta nenhuma atividade ansiolítica ou antidepressiva (VIANA et al., 2007).

Considerando que GD tem mostrado efeitos farmacológicos sobre o sistema nervoso central (SNC), em estudos anteriores, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a mutagenicidade deste composto, utilizando-se o teste de AMES, um dos testes requeridos para registro de novos fármacos.

OBJETIVOS

Avaliar a atividade mutagênica do composto monoterpeneo gama-decanolactona pelo teste *Salmonella*/microsomaol, teste de AMES).

METODOLOGIA

Foram utilizadas cinco (05) linhagens de *Salmonellatyphimurium* TA102, TA98, TA97a, TA100 e TA1535 na ausência de ativação metabólica, seguindo a metodologia padrão desenvolvida por Maron e Ames (1983) e revisada em Mortelmans e Zeiger (2000). As culturas bacterianas ($1-2 \times 10^9$ células/mL) foram tratadas com a substância teste, em diferentes concentrações, em tubos de ensaio durante 20 minutos a 37°C, em banho-maria e após foram semeadas em meio mínimo (MM), constituído por glicose 40% e meio E de Vogel-Bonner (sulfato de magnésio a 1%, ácido cítrico monoidratado a 10%, fosfato de potássio dibásico a

50%, fosfato de sódio e amônio a 17,5%), solidificado com 1,5% de ágar. Dois mL de ágar de superfície (ágar a 0,9%, NaCl a 0,75%, 50µM de histidina, 50µM de biotina, pH 7,4, 45°C) foram adicionados e após mistura em agitador de tubos, semeados em placas de MM. Todas as placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em incubadora BOD. Substâncias mutagênicas foram utilizadas como controle positivo.

ANÁLISE DE DADOS

Os dados do teste com linhagens de *Salmonella typhimurium* foram expressos em média \pm D.P e a significância estatística foi determinada por análise de variância de uma via (ANOVA) complementada pelo teste de Dunnett. Uma substância teste é considerada mutagênica quando a dose-resposta e a variação ANOVA forem significativas com $p < 0,05$ e o aumento do número médio de revertentes da substância teste for de pelo menos o dobro do encontrado no controle negativo (ou pelo menos três vezes para TA1535).

RESULTADOS

Os ensaios de mutagenicidade de curta duração, especialmente aqueles que utilizam linhagens bacterianas, são usados para detectar as propriedades mutagênicas de vários compostos. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos no experimento, indicando que nenhum efeito mutagênico foi observado nas linhagens TA98 e TA97a, sensíveis a mutação por deslocamento no quadro de leitura. Também não foi observada nenhuma mutação nas linhagens de detecção de mutação por substituição de pares bases TA100 e TA1535. Resultados negativos também foram observados na linhagem TA102 que é sensível a agentes oxidantes e alquilantes. Observou-se a formação de microcolônias nas placas em todas as linhagens na dose mais alta testada (200 µg/placa), sugerindo toxicidade nesta dose. Portanto, GD não aumentou de forma significativa o número de revertentes nas 05 (cinco) linhagens testadas, na ausência de ativação metabólica (S9 mix).



Tabela 1. Indução de revertentes *his+* em linhagens de *S. typhimurium* tratadas com gamma-decanolactona (GD) na ausência de ativação metabólica (S9 mix)

| Substância | Concentração (µg/placa) | Linhagens de <i>S. typhimurium</i> | | | | | | | | | |
|-----------------|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|
| | | TA98 | | TA97a | | TA100 | | TA1535 | | TA102 | |
| | | Rev/placa ^a | IM ^b | Rev/placa ^a | IM ^b | Rev/placa ^a | IM ^b | Rev/placa ^a | IM ^b | Rev/placa ^a | IM ^b |
| CN ^c | - | 28.7±8.3 | - | 90.7±24.0 | - | 125.0±1.0 | - | 13.3±2.0 | - | 480.0±37.8 | - |
| GD | 5 | 23.3±5.8 | 0.81 | 93.0±26.5 | 1.03 | 122.0±21.7 | 0.98 | 11.7±5.1 | 0.88 | 463.0±32.7 | 0.96 |
| | 10 | 25.0±4.4 | 0.87 | 105.3±11.6 | 1.16 | 117.7±17.6 | 0.94 | 9.7±2.1 | 0.73 | 460.0±3.5 | 0.96 |
| | 50 | 22.0±5.2 | 0.77 | 113.3±6.7 | 1.25 | 114.3±4.7 | 0.91 | 10.3±3.1 | 0.77 | 496.7±54.7 | 1.03 |
| | 100 | 22.3±2.3 | 0.78 | 109.7±15.3 | 1.21 | 109.3±13.0 | 0.87 | 7.7±2.9 | 0.58 | 498.0±47.8 | 1.04 |
| | 200 | 35.0±19.0 | 1.22 | 107.0±9.5 | 1.18 | 83.3±4.7 | 0.67 | 11.0±1.7 | 0.83 | 471.7±26.0 | 0.98 |
| CP ^d | 0.5 (4NQO) 1 (NaN ₃) | 370.0±28.3*** | 12.91 | 531.5±38.9*** | 5.86 | 1312.0±339.5*** | 10.50 | 617.5±44.6*** | 46.32 | 3838.0±503.0*** | 8.00 |

^aNúmero de revertentes/placa: media ± DP; ^bIM: Índice Mutagênico (nº. *dehis+* induzidos na amostra/nº. *dehis+* espontâneo no controle negativo); ^cCN: Controle Negativo (dimetilsulfoxido, 10 µL, usado com solvente). ^dCP: Controle Positivo (-S9) azida sódica para TA100 e TA1535; 4-NQO para TA97a, TA98 e TA102;; Diferença significativa em relação ao controle negativo *** $p < 0.001$, (ANOVA, Teste de Dunnett). A concentração mais elevada (200 µg/placa) induziu a formação de microcolônias em todas as linhagens.



CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que, sem metabolização, GD não induz mutações gênicas tanto por substituição de pares de bases como por deslocamento no quadro de leitura.

REFERÊNCIAS

- MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p.173-215, 1983
- MORTELMANS, K.; ZEIGER E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v.455, p.29-60, 2000.
- COELHO DE SOUZA, G.P.; ELISABETSKY, E.; NUNES, D.S.; RABELO, S.K.; NASCIMENTO DA SILVA M. Anticonvulsant of properties of γ -decanolactone in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.58, p.175–181, 1997.
- ELISABESTY, E.;MARCHNER, J.; SOUZA, D.O. Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. **Neurochemical Research**, v.20, p.461–465, 1995.
- DE OLIVEIRA, P.A.; LINO, F.L.; CAPPELARI, S.E.;DA SILVA BRUM, L.F.;PICADA, J.N.;PEREIRA, P., Effects of gamma-decanolactone on seizures induced by PTZ-kindling in mice. **Experimental Brain Research**, v. 187, p. 161–166, 2008.
- PEREIRA, P.;ELISABESTY, E.;SOUZA, D.O. Effect of gamma-decanolactone on glutamate binding in the rat cerebral cortex. **Neurochemical Research**, v.22, p.1507–1510, 1997.
- VIANA, C.C.; DE OLIVEIRA, P.A.; BRUM, L.F.; PICADA, J.N.; PEREIRA, P. Gamma-decanolactone effect on behavioral and genotoxic parameters. **Life Sciences**, v. 80, p. 1014–1019, 2007.
- PFLÜGER, P.; VIAU, C.M.; COELHO, V.R.; BERWIG, N.A.; STAUB, R.B.; PEREIRA, P.; SAFFI, J. Gamma-decanolactone inhibits iNOS and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia in N9 cells. **European Journal of Pharmacology**, v.780, p.38–45, 2016