



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

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

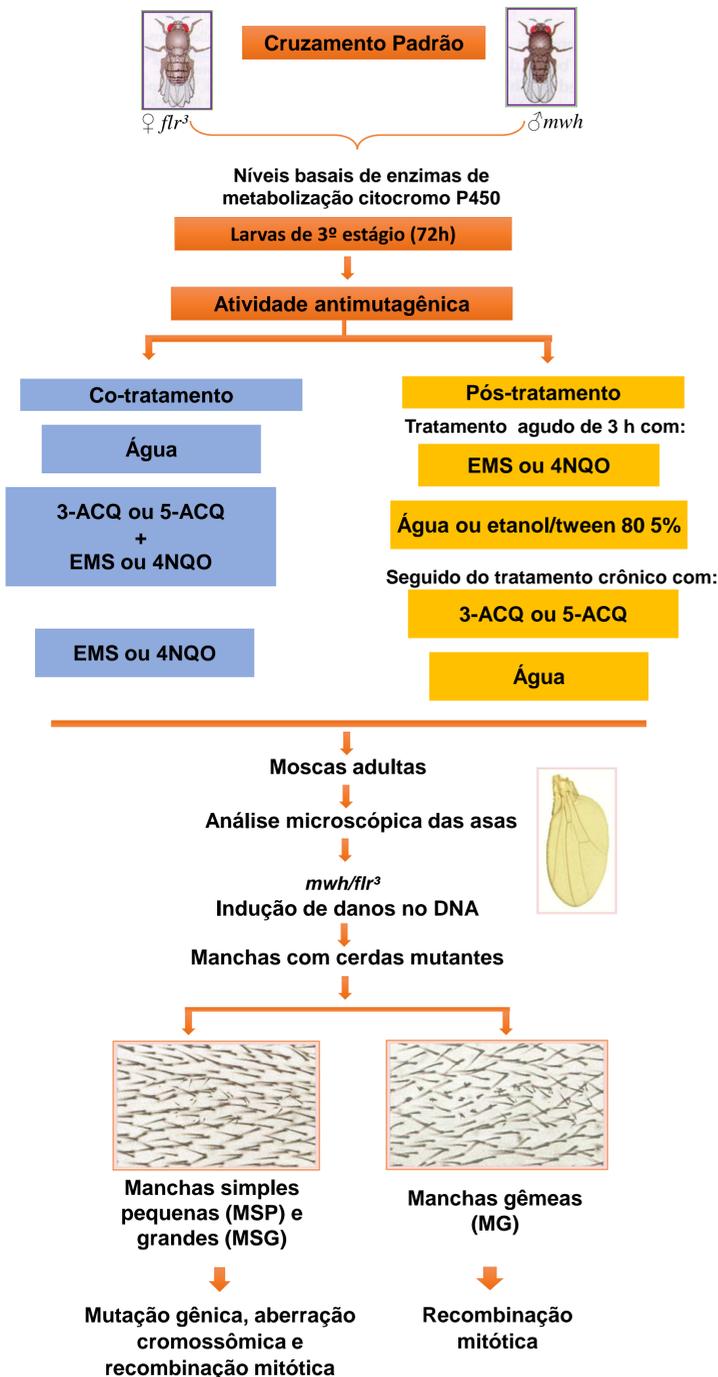
<sup>1</sup>Laboratório de Toxicidade Genética (TOXIGEN), ULBRA Canoas; <sup>2</sup>Aluna de Doutorado do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde (PPGBioSaúde); <sup>3</sup>Bolsista de IC PROBIC/FAPERGS-ULBRA; <sup>4</sup>Aluno do Curso de Biologia, ULBRA Canoas. mauricio@ulbra.br

## Introdução

O ácido clorogênico integra o grupo dos fenóis antioxidantes e atua em diversos sistemas biológicos, sendo associados a atividades antitumoral, analgésica, antimicrobiana, antioxidante, antiaterosclerose e antidiabetes (Kremr et al., 2016). Este polifenol além de ser abundante no café, pode ser encontrado ainda na erva mate, bem como na ameixa, maçã e na batata (Kremr et al., 2016). A sua isomeria encontra-se na posição 3 é denominado de ácido 3-O-cafeoilquinico (3-ACQ); se a isomeria situar-se na posição 4, este é especificado como ácido 4-O-cafeoilquinico (4-ACQ); já a isomeria na posição 5 denomina-o como ácido 5-O-cafeoilquinico (5-ACQ), conforme nomenclatura sistematizada pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (Kremr et al., 2016).

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

## Teste SMART



## Discussão

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

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

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

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

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

## Referências bibliográficas

- ASEERVATHAM, G. S. B., et al. Expression pattern of NMDA receptors reveals antiepileptic potential of apigenin 8-C-glucoside and chlorogenic acid in pilocarpine induced epileptic mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 82, p. 54-64, 2016.
- FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research*, v. 203, p. 297-308, 1988.
- FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research*, v. 334, p. 247-48, 1995.
- GUL, Z., et al. Protective Effects of Chlorogenic Acid and its Metabolites on Hydrogen Peroxide-Induced Alterations in Rat Brain Slices: A Comparative Study with Resveratrol. *Neurochemistry Research*, v. 41, p. 2075-85, 2016.
- KREMER, D., et al. Unremitting problems with chlorogenic acid Nomenclature: A review. *Química Nova*, v.39, p. 530-3, 2016.

## Resultados

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

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

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

Tabela 2. Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr3* do cruzamento padrão (CP) após exposição aguda de larvas de 3º estágio ao tratamento com EMS (46 mM) seguido do pós-tratamento com três concentrações de 3-ACQ e 5-ACQ.

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

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

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

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

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

Tabela 4. Resultados obtidos no teste SMART com a progênie *mwh/flr3* do cruzamento padrão (CP) após exposição aguda de larvas de 3º estágio ao tratamento com 4NQO (30 mM) seguido do pós-tratamento com três concentrações de 3-ACQ e 5-ACQ.

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

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