

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Bruna Frielink Immich

**Avaliação das Atividades Mutagênica, Antimutagênica e Antioxidante
de Extrato e Frações Biologicamente Ativas de *Uncaria Tomentosa***

Porto Alegre

2011

Bruna Frielink Immich

**Avaliação das Atividades Mutagênica, Antimutagênica e Antioxidante de
Extrato e Frações Biologicamente Ativas de *Uncaria Tomentosa***

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado ao Instituto de Biociências
da UFRGS em preenchimento parcial
dos requisitos para obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Diego Bonatto

Co-orientadora: Profa. Dra. Jenifer Saffi

Porto Alegre

2011

Artigo para submissão ao periódico Mutagenesis

Avaliação das Atividades Mutagênica, Antimutagênica e Antioxidante de Extrato e Frações Biologicamente Ativas de *Uncaria Tomentosa*

Bruna Frielink Immich^{a,b}, Jenifer Saffi^b e Diego Bonatto^c

^aLaboratório de Reparação de DNA de Eucariontes, Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

^bLaboratório de Genética Toxicológica, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

^cLaboratório de Radiobiologia Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

Resumo

A planta *Uncaria tomentosa*, pertencente à família Rubiaceae, tem sido utilizada na medicina tradicional para tratar diversas condições de saúde. Estudos investigando a atividade biológica de extratos e frações demonstraram atividades anti-inflamatória, antiviral, antimutagênica e antioxidante. Este trabalho tem como objetivo avaliar as atividades mutagênica, antimutagênica e antioxidante de um extrato etanólico bruto de *U. tomentosa* e de quatro frações isoladas obtidas a partir deste extrato, através de ensaios utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e ensaios *in vitro*. O extrato e as frações apresentaram ausência de citotoxicidade e mutagenicidade em doses de até 500 µg/mL, e não foram capazes de proteger contra os agentes óxido de 4-nitroquinoleína e peróxido de hidrogênio. As frações de derivados quinóvicos e de polifenóis apresentaram atividade sequestradora de radical livre DPPH• e redução do estresse oxidativo em levedura medido pelo teste de oxidação da diclorofluoresceína.

Introdução

Uncaria tomentosa (Willdenow ex Roemer & Schultes) De Candolle é uma liana pertencente à família Rubiaceae (1). Devido a seus espinhos curvados, é popularmente conhecida como “unha-de-gato”, ou, em inglês, “cat’s claw” (2). Encontrada apenas na América do Sul, ela tem sido tradicionalmente usada pelo povo indígena Ashaninka, no Peru, para tratar diversas condições de saúde, incluindo artrite, reumatismo, herpes, alergias, problemas gastrointestinais, infecções virais e diferentes tipos de câncer. Seus vários usos terapêuticos provêm do extrato aquoso preparado através de decocção das cascas e raízes (revisado por (3)).

Muitos constituintes químicos foram identificados em *U. tomentosa*, incluindo glicosídeos do ácido quinóico, esteróis, taninos, procianidinas, flavonoides, triterpenos polihidroxilados e pelo menos 17 diferentes alcaloides (4, 5). Existem dois quimiotipos de *U. tomentosa*, um contendo alcaloides pentacíclicos e o outro, alcaloides tetracíclicos indólicos e oxindólicos. O quimiotipo utilizado pelos índios Ashaninka é o que contém alcaloides pentacíclicos. Os alcaloides oxindólicos pentacíclicos denominados pteropodina, isopteropodina, speciophyllina, uncarina F e isomitraphyllina, entre os diferentes tipos de alcaloides presentes na *U. tomentosa*, são majoritários nas raízes (2, 3).

Vários trabalhos têm mostrado que extratos de *U. tomentosa* possuem atividades anti-inflamatória, antiviral, antimutagênica e antioxidante. A propriedade de suprimir a inflamação crônica apresentada pela planta está relacionada à inibição da ativação do fator nuclear kappa-B (NF- κ B), que é um importante regulador das respostas imune e anti-inflamatória, e à inibição do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), sendo esta última propriedade considerada o mecanismo primário da ação imunomodulatória proporcionada por essa espécie (5). Um extrato aquoso de *U. tomentosa* foi capaz de inibir a proliferação de linfócitos primários e de inibir a proliferação de algumas linhagens tumorais humanas (HL60, Raji e Jurkat) sem induzir morte celular (6). A mitrafilina, um alcaloide oxindólico pentacíclico presente na planta, tem um potente efeito antitumoral *in vitro* frente a linhagens de neuroblastoma e glioma humanos (5). Outros alcaloides, especialmente a pteropodina e a uncarina F, apresentaram indução de apoptose em células de leucemia linfoblástica aguda (7). A pteropodina é um forte agente antígeno-tóxico contra formação de micronúcleos induzidos por doxorubicina em camundongos, além de estimular a produção de linfócitos nos mesmos animais e possuir significativa atividade sequestradora de radicais livres (4).

Apesar do crescente número de trabalhos confirmando as atividades biológicas de *U. tomentosa*, a preparação e a composição dos extratos pode afetar suas propriedades, e este é um dos principais problemas em relação à comparação de diferentes estudos (8). As propriedades farmacológicas de *U. tomentosa* verificadas por seu uso tradicional e pelos resultados de pesquisas anteriores demonstram que a planta é uma fonte de biomoléculas que poderão ser utilizadas para o tratamento de diversas condições.

Neste trabalho, foram avaliadas as atividades mutagênica, antimutagênica e antioxidante de um extrato etanólico bruto de *U. tomentosa* e de quatro frações isoladas obtidas a partir deste extrato, utilizando ensaios *in vivo* na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e ensaios *in vitro*.

Materiais e métodos

Material vegetal

O extrato etanólico bruto e suas frações isoladas foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. George González Ortega, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, RS, Brasil). O extrato etanólico bruto, obtido a partir das cascas rasuradas da espécie, foi utilizado como substrato para a obtenção das quatro frações enriquecidas, sendo duas frações de polifenóis, uma fração de alcaloides e uma fração de derivados quinóvicos, via processo de fracionamento sequencial e unidirecional (9). A fração de alcaloides foi obtida por cromatografia, utilizando resina de troca iônica e misturas hidroetanólicas como eluente. Esta fração foi padronizada em alcaloides oxindólicos pentacíclicos, classe majoritária de alcaloides encontrados na espécie. A fração de derivados quinóvicos foi obtida mediante cromatografia, utilizando uma resina polimérica e misturas hidrometanólicas como eluente. Esta fração foi padronizada em derivados do ácido quinóvicico. As duas frações de polifenóis foram obtidas mediante complexação em fase sólida, sendo posteriormente eluídas com misturas de acetona e água. Uma das frações é enriquecida em polifenóis de baixa massa molecular e, a outra, em polifenóis de alta massa molecular. Todas as frações são enriquecidas e padronizadas em relação aos respectivos componentes.

Reagentes

Os reagentes peróxido de hidrogênio (H_2O_2), aminoácidos, bases nitrogenadas, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH[•]), vitamina E (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), canavanina (L-canavanine sulfate salt), 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) e 2',7'-dichlorofluorescein (H_2DCF) foram obtidos de Sigma (St. Louis, MO, USA). Extrato de levedura, bacto-peptona, bacto-agar e base nitrogenada para levedura foram obtidas da Difco (Detroit, MI, USA). Os demais reagentes são de grade analítica.

Linhagens e meios de Saccharomyces cerevisiae

Os efeitos dos sistemas antioxidantes celulares sobre a inibição do crescimento induzida pelo extrato bruto e pelas frações isoladas de *U. tomentosa* foram avaliados utilizando as linhagens EG103, selvagem e mutantes deficientes nas enzimas superóxido dismutase e/ou catalase, descritas na Tabela I. Estas linhagens foram gentilmente cedidas pela Dr^a Edith B. Gralla (University of California, CA, EUA).

Para os ensaios de mutagênese e antimutagênese, foi empregada a linhagem haplóide N123 (Tabela I), gentilmente cedida pelo Prof. João Antonio Pêgas Henriques (UFRGS, RS, Brasil). Esta linhagem é bastante responsiva à mutagênese induzida por peróxido de hidrogênio devido ao baixo conteúdo de glutatona (10).

Meios, soluções e tampões foram preparados como previamente descrito (11). O meio líquido completo (YPD; 1% extrato de levedura, 2% bacto-peptona e 2% dextrose) foi utilizado para o crescimento de rotina das linhagens de levedura. O meio mínimo (MM) contém 0,67% de base nitrogenada para levedura, 2% de dextrose e 0,5% de sulfato de amônio. O meio sólido contém 2% de bacto-agar. O meio sintético completo (SC) consiste de MM suplementado com aminoácidos e bases nitrogenadas (adenina, histidina, lisina, leucina, uracila, metionina e triptofano) à concentração de 2,0 mg por 100mL de MM. Para a determinação da mutagênese na linhagem N123, o meio SC foi suplementado com canavanina à concentração de 60 µg/mL (SC+can). Tampão fosfato (PBS; Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 e KCl; 20 mM; pH 7.4) foi utilizado para a diluição das suspensões celulares.

Culturas na fase estacionária de crescimento foram obtidas inoculando uma colônia isolada em meio líquido YPD. Após 48 h de incubação a 30°C com aeração por agitação, as culturas continham $1-2 \times 10^8$ células/mL. As células foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS. A concentração celular e a porcentagem de brotos foram determinadas em uma câmara de Neubauer por contagem ao microscópio óptico. Células na fase estacionária de crescimento foram escolhidas neste estudo porque se assemelham às células de organismos multicelulares

em aspectos importantes: a maior parte da energia provém da respiração mitocondrial; as células estão na fase G0 do ciclo celular; e o dano se acumula ao longo do tempo (12, 13).

Ensaio de mutagênese e antimutagênese

Soluções estoque do extrato bruto e das frações isoladas foram preparadas imediatamente antes dos tratamentos. Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como solvente, com a concentração final de DMSO na mistura de incubação nunca excedendo 0,2% (v/v).

Culturas de *S. cerevisiae* em fase estacionária de crescimento foram diluídas em PBS para obter uma densidade de 1×10^8 células/mL. Para o ensaio de mutagênese, as células foram expostas a concentrações do extrato bruto e das frações isoladas, variando de 25 a 500 $\mu\text{g/mL}$. O mutágeno 4NQO na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ foi utilizado como controle positivo. A mistura foi incubada por 22 h a 30°C com agitação.

Para investigar um efeito protetor intracelular do extrato e das frações, foi realizado o ensaio de antimutagênese. As células foram pré-tratadas durante 1h com doses do extrato e das frações variando de 12,5 a 50 $\mu\text{g/mL}$. As células foram então lavadas e foi adicionado 4NQO a uma concentração final de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, para induzir a mutagênese. A seguir, a mistura foi incubada por mais 1 h a 30°C. Após o tratamento, as células foram apropriadamente diluídas e plaqueadas. As placas foram incubadas a 30°C, no escuro. A sobrevivência foi determinada no meio YPD (2-5 dias) e a indução de mutação (revertentes CAN) no meio apropriadamente suplementado (4-7 dias). As colônias sobreviventes e revertentes foram contadas. A mutação direta (*forward mutation*) foi medida através do ensaio de resistência à canavanina (*CAN1*→*can1*) (14). Os ensaios foram repetidos pelo menos 2 vezes e o plaqueamento para cada dose foi realizado em triplicata.

Ensaio de inibição do crescimento (central disk assay)

Culturas em fase estacionária de linhagens de *S. cerevisiae* isogênicas deficientes nas enzimas superóxido dismutase e/ou catalase foram diluídas em PBS para obter uma densidade de 1×10^7 células/mL. Uma alça de inoculação da suspensão celular foi utilizada para fazer um risco contínuo, partindo do centro até a borda da placa de Petri.

Concentrações crescentes do extrato bruto (50, 100 e 250 μg) e das frações, apropriadamente diluídos em DMSO, foram aplicadas no centro do disco de papel filtro, no centro da placa. As placas foram pré-incubadas por 3h a 30°C. A seguir, 5 μL de H_2O_2 30% foram aplicados sobre o mesmo disco de papel filtro. Como controle negativo, 5 μL de PBS foram aplicados sobre o disco. As placas foram incubadas por 72 h a 30°C. A inibição do

crescimento foi medida, em milímetros, da borda do disco de papel filtro até o início do crescimento celular. Os valores obtidos podem variar de 0mm (crescimento completo até o disco) até 30 mm (ausência de crescimento até a borda da placa de Petri). O ensaio foi realizado três vezes e o plaqueamento para cada dose foi feito em duplicata.

Ensaio de oxidação da diclorofluoresceína

O ensaio de oxidação da diclorofluoresceína foi utilizado para estimar o estresse oxidativo em *S. cerevisiae*. Este ensaio foi baseado no método descrito por Jakubowski & Bartosz (15). As células foram tratadas seguindo o mesmo protocolo descrito para o ensaio de antimutagênese. Após a incubação, as células foram sedimentadas por centrifugação, lavadas e ressuspensas em PBS. Diclorofluoresceína (H₂DCF) foi adicionada em uma concentração final de 10 nM e a mistura foi incubada por 15min a 30°C. A seguir, a intensidade de fluorescência foi medida em citômetro de fluxo (FACS Calibur - BD, USA). A avaliação da fluorescência foi realizada via excitação da molécula a 480 nm (laser azul) e a emissão foi em 505 nm.

Capacidade de sequestro do radical livre DPPH[•]

O ensaio para determinar a capacidade do antioxidante de sequestrar o radical livre DPPH[•] foi baseado no método previamente descrito (16). O extrato e as frações foram diluídos em tampão Tris-HCl (100 mM, pH 7.0), contendo 250 µM de DPPH[•] dissolvido em metanol, para obter as concentrações finais de 12,5, 25, 50, 100, 250 e 500 µg/mL do extrato e das frações. Os tubos foram mantidos por 30 min no escuro e a absorbância a 530 nm foi medida em espectrofotômetro. Como controle negativo, foi utilizada uma solução de tampão Tris-HCl 100 mM contendo 250 µM de DPPH[•]. A vitamina E foi utilizada como controle positivo do experimento. Os resultados estão expressos como a quantidade de DPPH[•] reduzida pelos diferentes antioxidantes. O experimento foi repetido três vezes e a leitura para cada dose foi realizada em triplicata.

Análise estatística

Os dados estão apresentados com a média e o desvio padrão e foram analisados através do programa Prism (Graphpad InStat – NIH) utilizando o teste ANOVA de uma via (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste de Dunnett. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Efeitos citotóxico e mutagênico em S. cerevisiae

Como pode ser observado na Tabela II, tanto o extrato bruto quanto suas frações isoladas não induziram efeito citotóxico na linhagem N123 da levedura *S. cerevisiae*, na fase estacionária de crescimento, nas concentrações de 25 a 500 µg/mL. O percentual de sobrevivência entre os diferentes tratamentos variou entre 85,78 e 131,6% em relação ao controle negativo. Somente o controle positivo, tratamento com 4NQO 0,5 µg/mL, foi significativamente diferente, com 23,17% de sobrevivência.

As mesmas concentrações foram utilizadas nos experimentos para verificar o efeito mutagênico das amostras. Tanto o extrato quanto as frações não induziram mutação direta (*forward mutation*) na linhagem N123 em fase estacionária de crescimento. Estes resultados estão de acordo com Rizzi et al. (17), que demonstraram ausência de mutagenicidade do extrato e de suas frações utilizando o teste de Ames, com diferentes linhagens da bactéria *Salmonella typhimurium*, com ou sem ativação metabólica. Neste sentido, em outro estudo, utilizando o teste SMART (Somatic Mutation And Recombination Test) em *Drosophila melanogaster*, a infusão de *U. tomentosa* não demonstrou efeito mutagênico (18). Embora estes estudos, assim como o nosso, demonstrem ausência de citotoxicidade e mutagenicidade de *U. tomentosa*, utilizando diferentes modelos experimentais, o efeito antiproliferativo do extrato aquoso foi evidenciado em linhagens tumorais humanas, e esta atividade foi atribuída à indução de apoptose em conjunto com a fragmentação do DNA (19). Um estudo com preparações de *U. tomentosa* exibindo diferentes composições de alcaloides oxindólicos pentacíclicos demonstrou que as propriedades anticâncer destas preparações dependiam das diferentes proporções de cada alcaloide e, mais ainda, uma preparação que continha somente alcaloides puros teve atividade anticâncer baixa em comparação com as preparações que continham também outros componentes químicos da planta (20), sugerindo que outros fitoquímicos também podem ser responsáveis pela potência farmacológica, atuando em sinergia. Assim, é demonstrada a importância do fracionamento e da identificação dos componentes presentes na planta e a identificação de suas diferentes atividades biológicas.

Efeito antimutagênico em S. cerevisiae

Devido à ausência de citotoxicidade e mutagenicidade, foi realizado o ensaio de antimutagênese para verificar a capacidade protetora do extrato etanólico bruto e de suas frações frente ao mutágenoóxido de 4-nitroquinoleína (4NQO), cujo efeito mutagênico é

devido à geração do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (21). Os resultados preliminares do ensaio de antimutagênese são mostrados na Tabela III. Estes resultados sugerem que o pré-tratamento com o extrato bruto ou com suas frações, nas doses testadas (12,5, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) não é capaz de proteger contra o efeito mutagênico causado pelo agente 4NQO. Além disso, a fração de polifenóis de alta massa molecular de 25 $\mu\text{g/mL}$, em conjunto com o mutágeno, parece aumentar a taxa de mutagênese. Entretanto, mais experimentos são necessários para tornar possível a análise estatística dos dados. Outro aspecto a ser considerado é a alta citotoxicidade causada pelo agente 4NQO na dose utilizada, que pode ter impedido a detecção de efeito antimutagênico. Serão necessários experimentos utilizando uma concentração menor de 4NQO para avaliar a presença ou ausência de efeito antimutagênico.

Já foram descritos efeitos antimutagênicos para uma infusão de *U. tomentosa* frente ao peróxido de hidrogênio em *D. melanogaster* (9) e proteção causada por um extrato aquoso e suas frações frente à fotomutagênese induzida por 8-metóxipsoraleno (8-MOP) + UVA na linhagem TA 102 de *S. typhimurium* (18). Entretanto, as doses testadas no presente estudo parecem não oferecer proteção em *S. cerevisiae*. Testes utilizando outros agentes mutagênicos, como o peróxido de hidrogênio e o 8-MOP fotoativado podem fornecer dados importantes sobre a capacidade antimutagênica, se ela existir, e sugerir um mecanismo para esta proteção.

Ensaio de inibição do crescimento (central disk assay)

Os resultados do ensaio de inibição do crescimento são apresentados na Figura 1. O extrato bruto e as suas frações não tiveram efeito protetor contra o H_2O_2 , tanto na linhagem selvagem quanto nas linhagens deficientes nas enzimas superóxido dismutase e catalase. A linhagem mais sensível ao H_2O_2 foi a duplo mutante *sod1 Δ sod2 Δ* (EG133), deficiente nas enzimas superóxido dismutase mitocondrial e citosólica, seguida pela linhagem simples mutante *sod2 Δ* (EG110), deficiente apenas na enzima superóxido dismutase mitocondrial.

Ensaio de oxidação da diclorofluoresceína

Para as duas frações de polifenóis e para a fração de derivados quinónicos, as doses testadas parecem apresentar redução do estresse oxidativo na presença do mutágeno 4NQO (Figuras 2c, 2d e 2e). Estes resultados estão de acordo com a atividade antioxidante encontrada no ensaio de capacidade de seqüestrar o radical DPPH $^{\bullet}$, no qual estes compostos apresentaram atividade antioxidante *in vitro*. Entretanto, não foi possível observar o mesmo efeito para o extrato bruto e para as frações de alcalóides (Figura 2a e 2b). Mais experimentos

devem ser conduzidos para esclarecer a atividade sobre o estresse oxidativo apresentada por estes compostos.

Capacidade de sequestro do radical livre DPPH[•]

Os resultados do ensaio que mede a capacidade de sequestrar o radical livre DPPH[•] estão apresentados na Figura 3. O extrato bruto e a fração de polifenóis de baixa massa demonstraram capacidade de sequestrar o radical livre superior à da vitamina E, nas doses acima de 100 µg/mL para o extrato, e acima de 25 µg/mL para a fração de polifenóis de baixa massa. No entanto, nas concentrações mais altas, a capacidade antioxidante foi menor do que em concentrações intermediárias. Esta característica é conhecida para compostos do tipo “redox”, como os polifenóis, em que existe atividade antioxidante até uma determinada dose e, se esta dose for excedida, observa-se atividade pró-oxidante (22). A fração de polifenóis de alta massa causou a redução do radical DPPH[•] a partir da dose de 250 µg/mL, e a capacidade antioxidante da dose de 500 µg/mL foi superior àquela apresentada pela vitamina E. A fração de derivados quinóvicos mostrou capacidade antioxidante semelhante à da vitamina E somente na dose mais alta, de 500 µg/mL. A fração de alcaloides não demonstrou capacidade de sequestro do DPPH[•] nas doses testadas. Este resultado está de acordo com Sandoval et al. (23), em que os autores concluem que a presença de alcaloides oxindólicos pentacíclicos não afeta a atividade antioxidante apresentada pela planta. Portanto, a capacidade antioxidante do extrato utilizado neste estudo é devida aos demais compostos nele presentes, incluindo os polifenóis e os derivados quinóvicos.

Conclusões

O extrato etanólico bruto de *U. tomentosa* e suas frações não demonstraram atividade citotóxica e mutagênica nas doses variando de 12,5 a 500 µg/mL e não foram capazes de proteger as células de *S. cerevisiae* contra os danos causados pelos agentes 4-nitroquinoleína e peróxido de hidrogênio. A fração de derivados quinóvicos e as duas frações de polifenóis, de alta e baixa massa, apresentaram atividade sequestradora de radical livre *in vitro*, que pode ser correlacionada com a possível redução do estresse oxidativo causado por 4-nitroquinoleína em células de levedura, observada no teste de oxidação da diclorofluoresceína.

Financiamento

Este trabalho foi realizado com suporte financeiro do Instituto Nacional de Pesquisa Translacional em Saúde e Ambiente na Região Amazônica (INPeTAm/CNPq) e da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Agradecimentos

Agradecemos à Dra. Edith Gralla e ao Dr. João Antonio Pêgas Henriques pelas linhagens de *S. cerevisiae*.

Referências

1. Cisneros, F.J., Jayo, M., Niedziela, L. (2005). An *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract protects mice against ozone-induced lung inflammation. *J Ethnopharmacol.*, **96**, 355-64.
2. Keplinger, K., Laus, G., Wurm, M., Dierich, M.P., Teppner, H. (1999). *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.-ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *J Ethnopharmacol.*, **64**, 23-34.
3. Heitzman, M. E., Neto, C. C., Winiarz, E., Vaisberg, A. J., Hammond, G. B. (2005). Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, **66**, 5-29.
4. Paniagua-Perez, R., Madrigal-Bujaidar, E., Molina-Jasso, D., Reyes-Cadena, S. Alvarez-Gonzalez, I., Sanchez-Chapul, L., Perez-Gallaga, J. (2009). Antigenotoxic, antioxidant and lymphocyte induction effects produced by pteropodine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, **104**, 222-7.
5. Garcia Prado, E., Garcia Gimenez, M. D., De la Puerta Vazquez, R., Espartero Sanchez, J. L., Saenz Rodriguez, M. T. (2007). Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines. *Phytomedicine*, **14**, 280-4.
6. Akesson, C., Lindgren, H., Pero, R. W., Leanderson, T., Ivars, F. (2003) An extract of *Uncaria tomentosa* inhibiting cell division and NF-kappa B activity without inducing cell death. *Int Immunopharmacol.*, **3**, 1889-900.
7. Bacher, N., Tiefenthaler, M., Sturm, S., Stuppner, H., Ausserlechner, M. J. Kofler, R., Konwalinka, G. (2006) Oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce apoptosis in proliferating, G0/G1-arrested and bcl-2-expressing acute lymphoblastic leukaemia cells. *Br J Haematol.*, **132**, 615-22.

8. Gurrola-Diaz, C. M., Garcia-Lopez, P. M., Gulewicz, K., Pilarski, R., Dihlmann, S. (2011). Inhibitory mechanisms of two *Uncaria tomentosa* extracts affecting the Wnt-signaling pathway. *Phytomedicine*, **18**, 683-90.
9. Borré, G.L., (2010) Obtenção e análise de frações enriquecidas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Dissertação de Mestrado.
10. Brendel, M., Grey, M., Maris, A. F., Hietkamp, J., Fesus, Z., Pich, C. T., Dafre, A. L., Schmidt, M., Eckardt-Schupp, F., Henriques, J. A. P. (1998) Low glutathione pools in the original *ps03* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* are responsible for its pleiotropic sensitivity phenotype. *Curr Genet*, **33**, 4-9
11. Burke D., Dawson T., Stearns T. (2000) *Methods in yeast genetics, a CSH Laboratory course manual*. CSH Laboratory Press/Plainview, New York.
12. Longo, V. D., Gralla, E. B., Valentine, J. S. (1996) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*, **271**, 12275-80.
13. Cyrne, L., Martins, L., Fernandes, L., Marinho, H. S. (2003) Regulation of antioxidant enzymes gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during stationary phase. *Free Radic Biol Med.*, **34**, 385-93.
14. Whelan, W. L., Gocke, E., Manney, T. R. (1979) The CAN1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*: fine-structure analysis and forward mutation rates. *Genetics*, **91**, 35-51.
15. Jakubowski, W. and Bartosz, G. (1997) Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *Int J Biochem Cell Biol.*, **29**, 1297-301.
16. Soares, D.G., Andreazza, A.C., Salvador, M. (2003) Sequestering ability of butylatedhydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH•, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J Agric Food Chem.*, **51**, 1077-80.

17. Rizzi, R., Re, F., Bianchi, A., De Feo, V. de Simone, F., Bianchi, L., Stivala, L. A. (1993) Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts. *J Ethnopharmacol*, **38**, 63-77.
18. Romero-Jimenez, M., Campos-Sanchez, J., Analla, M., Munoz-Serrano, A., Alonso-Moraga, A. (2005) Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutat Res.*, **585**, 147-55.
19. Sheng, Y., Pero, R. W., Amiri, A., Bryngelsson, C. (1998) Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. *Anticancer Res.*, **18**, 3363-8.
20. Pilarski, R., Filip, B., Wietrzyk, J., Kuras, M., Gulewicz, K. (2010) Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. *Phytomedicine*, **17**, 1133-9.
21. Henriques, J.A.P., Dafré A.L., Picada, J.N., Maris A.F., Salvador M. (2001) Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In Serafini L.A., De Barros N.M. Azevedo J.L. (eds), *Biotecnologia na agricultura e na indústria*. Guaíba: Agropecuária, pp. 227-256.
22. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2000) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press/New York.
23. Sandoval, M., Okuhama, N. N., Zhang, X. J., Condezo, L. A., Lao, J., Angeles, F. M., Musah, R. A., Bobrowski, P., Miller, M. J. (2002) Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine*, **9**, 325-37.

Tabela I. Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste estudo

Linhagem	Genótipo	Deficiência enzimática	Fonte
N123	<i>MATa his1-7</i>	Nenhuma, mas exibe baixo conteúdo de glutatona	J.A.P. Henriques
EG103 (SOD-WT)	<i>MATa leu2Δ0 his3-Δ1 trp1-289 ura3-52</i>	Nenhuma	E. Gralla
EG118 (<i>sod1Δ</i>)	Idem EG103, exceto <i>sod1::URA3</i>	Cu-Zn superóxido dismutase (citossólica)	E. Gralla
EG110 (<i>sod2Δ</i>)	Idem EG103, exceto <i>sod2::TRP1</i>	Mn superóxido dismutase (mitocondrial)	E. Gralla
EG133 (<i>sod1Δsod2Δ</i>)	Idem EG103, exceto <i>sod1::URA3</i> e <i>sod2::TRP1</i>	Ambas superóxido dismutases	E. Gralla
EG223 (<i>ctt1Δ</i>)	Idem EG103, exceto <i>ctt1::TRP1</i>	Catalase citossólica	E. Gralla
EG213 (<i>sod1Δctt1Δ</i>)	Idem EG103, exceto <i>sod1::URA3</i> e <i>ctt1::TRP1</i>	Cu-Zn superóxido dismutase e catalase citossólica	E. Gralla

Tabela II. Indução de mutação direta na linhagem haplóide N123 de *Saccharomyces cerevisiae* em fase estacionária de crescimento após tratamento com extrato etanólico bruto de *Uncaria tomentosa* e suas frações

Substância	Tratamento	Sobrevivência (%)	CanR/10 ⁷ sobreviventes ^a	
CN ^b		100 ± 0 ^d	4,33 ± 1,35 ^d	
4NQO ^c	0,5µg/mL	23,17 ± 5,20*	28,09 ± 11,75*	
Extrato bruto	25µg/mL	101,6 ± 25,42	3,84 ± 1,51	
	50µg/mL	102,4 ± 38,95	4,54 ± 1,58	
	100µg/mL	111,0 ± 30,93	3,58 ± 1,09	
	250µg/mL	126,8 ± 35,12	3,13 ± 1,36	
	500µg/mL	130,1 ± 37,12	3,21 ± 1,36	
Frações	alcaloides	25µg/mL	85,78 ± 12,47	4,94 ± 1,06
		50µg/mL	89,81 ± 21,52	4,88 ± 0,36
		100µg/mL	94,01 ± 29,15	5,38 ± 2,16
		250µg/mL	111,7 ± 22,91	4,54 ± 1,39
		500µg/mL	110,6 ± 48,86	3,78 ± 1,17
	derivados quinóvicos	25µg/mL	106,2 ± 18,36	3,10 ± 1,05
		50µg/mL	103,4 ± 17,83	3,96 ± 0,16
		100µg/mL	96,15 ± 7,10	3,26 ± 1,43
		250µg/mL	86,85 ± 26,31	4,097 ± 2,51
		500µg/mL	94 ± 11,31	3,57 ± 1,10
	polifenóis de alta massa	25µg/mL	98 ± 21	2,89 ± 0,12
		50µg/mL	86,33 ± 17,42	4,84 ± 1,34
		100µg/mL	89,43 ± 18,98	4,57 ± 1,62
		250µg/mL	90,41 ± 31,77	3,36 ± 0,82
		500µg/mL	93,33 ± 39,53	3,82 ± 1,34
	polifenóis de baixa massa	25µg/mL	101,8 ± 39,83	4,05 ± 1,40
		50µg/mL	101,9 ± 14,10	3,20 ± 1,70
		100µg/mL	112,6 ± 27,01	2,06 ± 0,89
		250µg/mL	107,9 ± 30,87	2,87 ± 1,72
		500µg/mL	131,6 ± 61,65	2,35 ± 1,45

* dados significantes em relação ao controle negativo quando $P < 0,05$ /one-way ANOVA Dunnett's multiple comparison test.

CanR = revertentes canavanina.

^a Revertentes locus específico.

^b Controle negativo (solvente).

^c Controle positivo.

^d Média e desvio padrão de três experimentos independentes.

Tabela III. Efeitos do extrato etanólico bruto de *Uncaria tomentosa* e suas frações em mutações diretas induzidas por 4NQO na linhagem haplóide N123 de *Saccharomyces cerevisiae* em fase estacionária de crescimento

Substância	Tratamento	Sobrevivência (%)	CanR/10 ⁷ sobreviventes ^a	
CN ^b		100 ^d	3,53 ^d	
4NQO ^c	0,5µg/mL	32,75	36,83	
Extrato bruto	12,5µg/mL + 4NQO	42,76	29,97	
	25µg/mL + 4NQO	23,03	50,69	
	50µg/mL + 4NQO	29,61	44,04	
Frações	alcaloides	12,5µg/mL + 4NQO	43,42	30,88
		25µg/mL + 4NQO	39,47	24,20
		50µg/mL + 4NQO	34,21	34,92
	derivados quinóvicos	12,5µg/mL + 4NQO	29,54	56,08
		25µg/mL + 4NQO	27,55	49,28
		50µg/mL + 4NQO	30,88	47,74
	polifenóis de alta massa	12,5µg/mL + 4NQO	35,94	34,25
		25µg/mL + 4NQO	46,42	72,30
		50µg/mL + 4NQO	24,2	49,10
	polifenóis de baixa massa	12,5µg/mL + 4NQO	28,98	42,18
		25µg/mL + 4NQO	35,24	37,94
		50µg/mL + 4NQO	34,92	41,69

CanR = revertentes canavanina.

^a Revertentes locus específico.

^b Controle negativo (solvente).

^c Controle positivo.

^d Média de dois experimentos independentes.

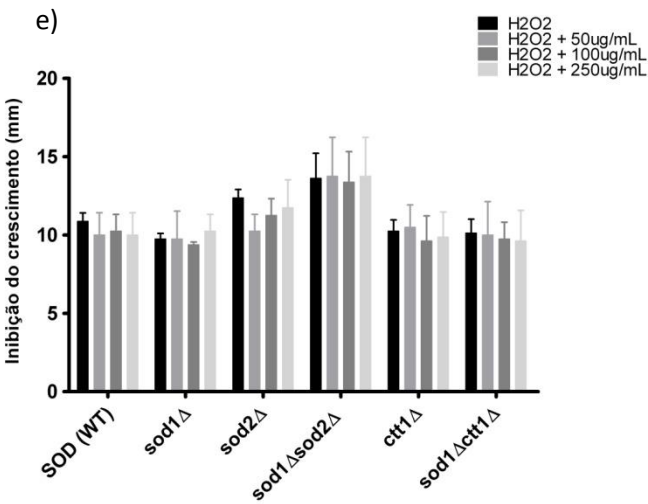
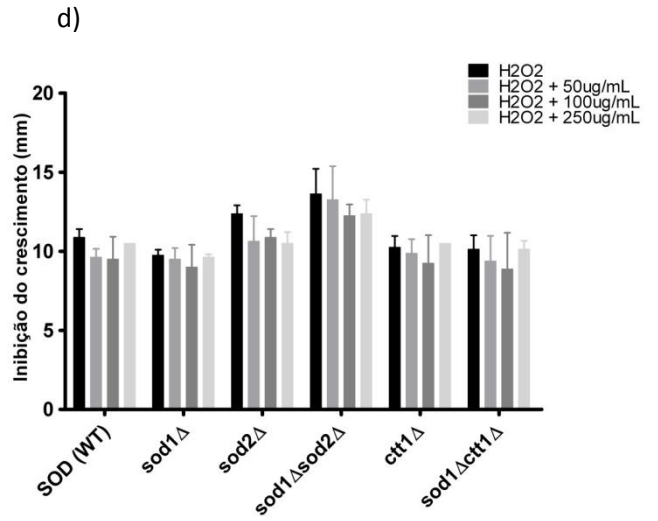
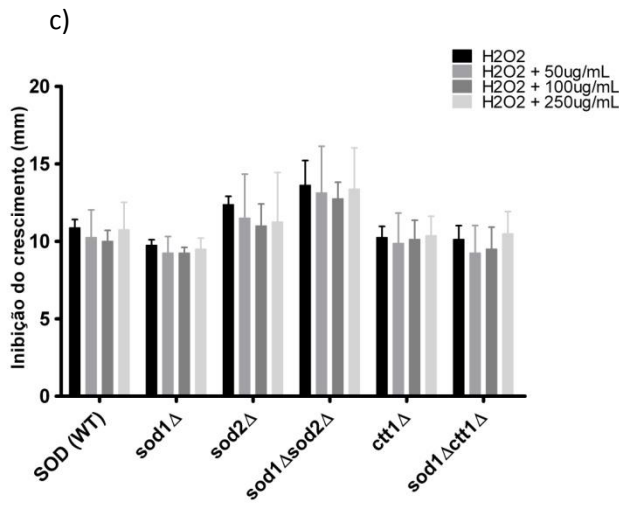
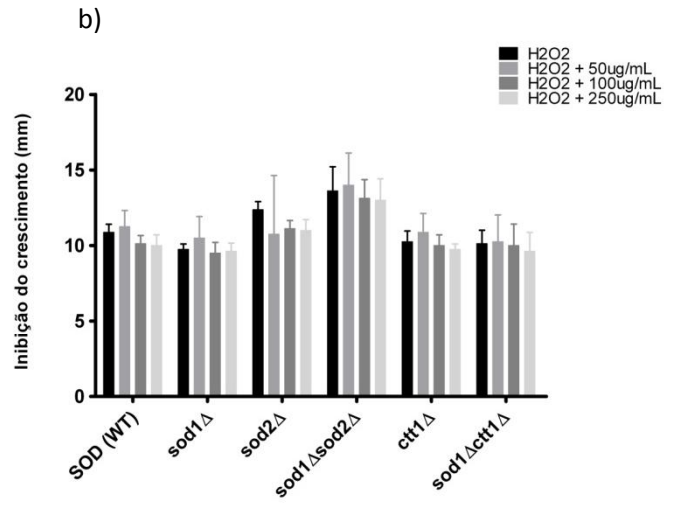
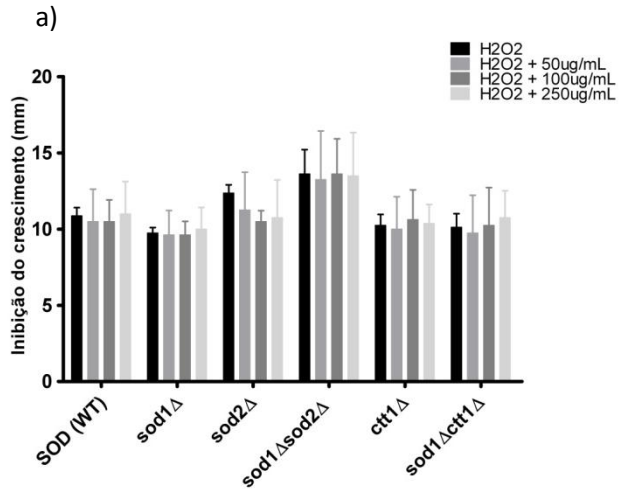
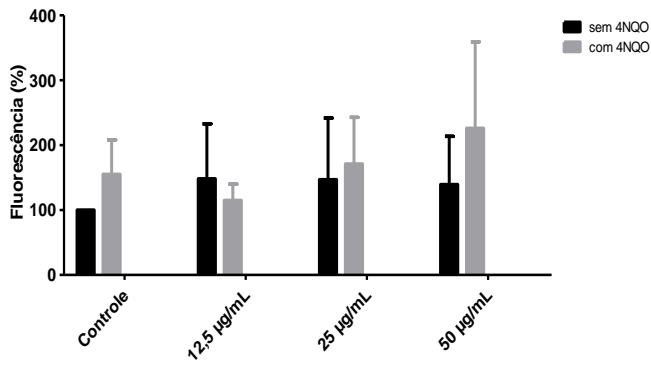
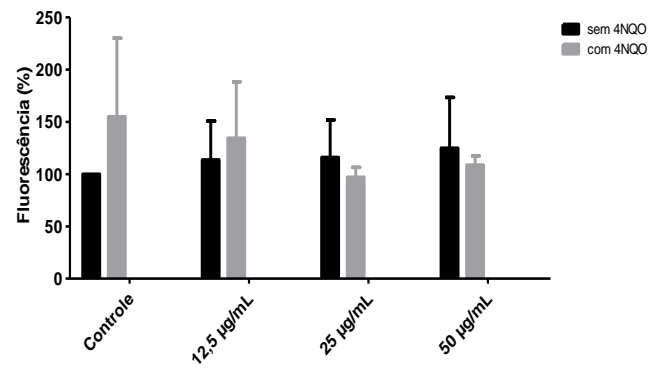


Fig. 1. Inibição do crescimento (em milímetros) de diferentes linhagens de *S. cerevisiae* expostas a peróxido de hidrogênio após pré-tratamento por 3h a 30°C com diferentes concentrações do extrato etanólico bruto e de suas frações. a) extrato etanólico bruto; b) fração de alcaloides oxindólicos pentacíclicos; c) fração de derivados quinóvicos; d) fração de polifenóis de alta massa; e) fração de polifenóis de baixa massa.

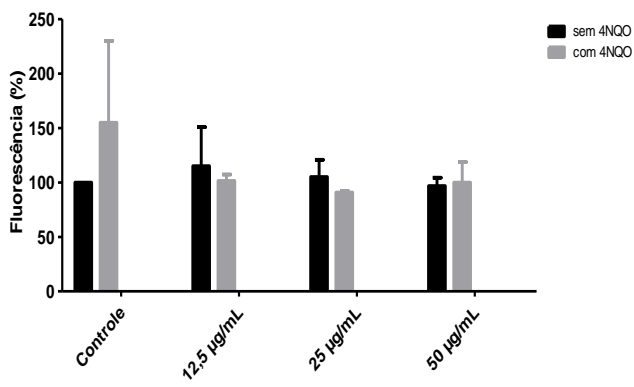
a)



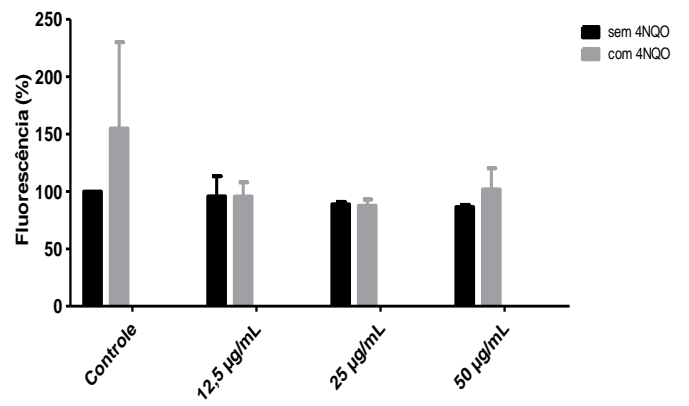
b)



c)



d)



e)

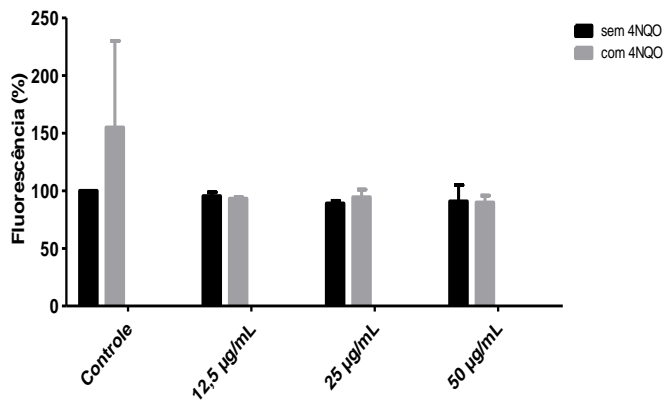


Fig. 2. Ensaio de oxidação da diclorofluoresceína. Porcentagem de fluorescência em relação ao controle não tratado. a) extrato etanólico bruto; b) fração de alcaloides oxindólicos pentacíclicos; c) fração de derivados quinóvicos; d) fração de polifenóis de alta massa; e) fração de polifenóis de baixa massa.

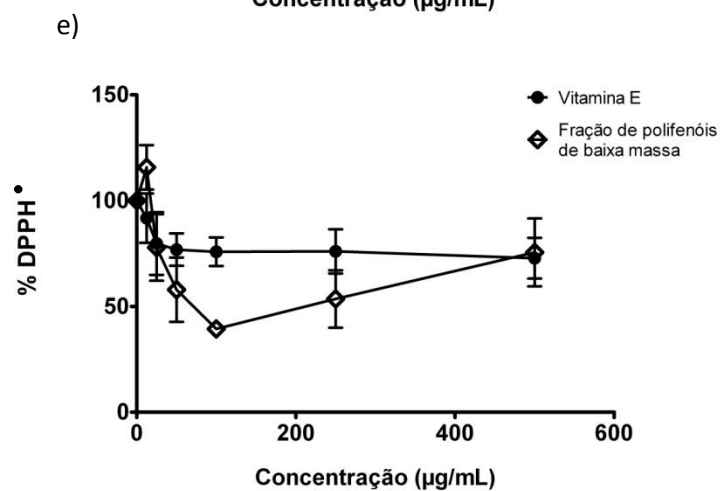
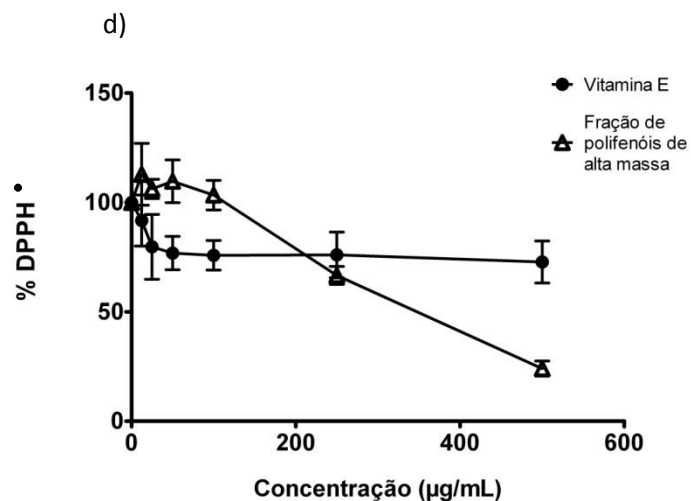
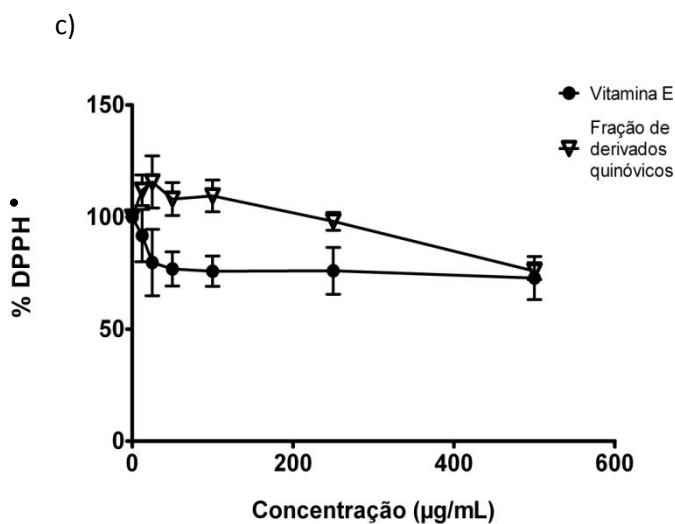
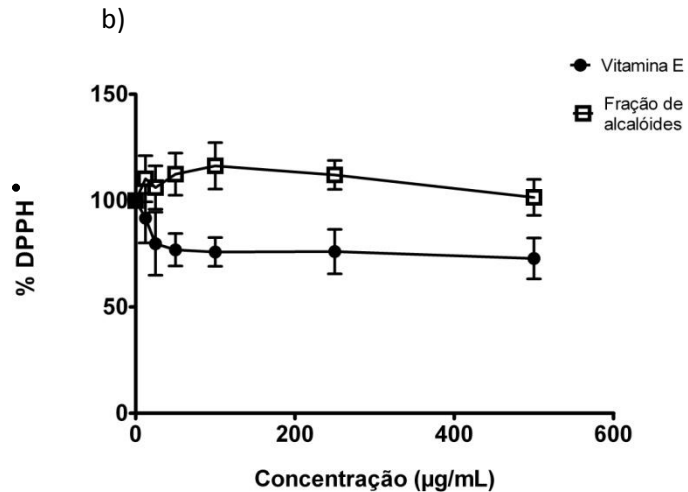
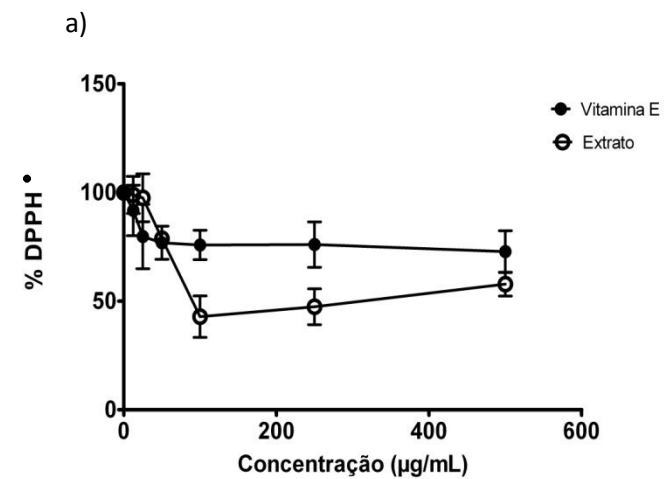


Fig. 3. Porcentagem de redução do radical livre DPPH[•] (solução inicial contendo 250μM de DPPH[•]). a) extrato etanólico bruto; b) fração de alcaloides oxindólicos pentacíclicos; c) fração de derivados quinóvicos; d) fração de polifenóis de alta massa; e) fração de polifenóis de baixa massa.

ANEXO

Instruções aos autores do periódico Mutagenesis, disponíveis em

http://www.oxfordjournals.org/our_journals/mutage/for_authors/general.html

PREPARATION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be in their final form when they are submitted so that proofs require only correction of typographical errors.

Sections of the manuscript

Regular full-length papers should be subdivided into the following sequence of sections: Title page, Abstract, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Legends to figures, Tables. The Title page must include the telephone and fax numbers and E-mail address of the corresponding author. In the Journal, the Materials and methods, Acknowledgements and References sections are printed in smaller type to accommodate more text. The Materials and methods section must give precise details of strains, concentrations and solvents. Where an activation system has been included it is necessary to know (i) the source, (ii) the inducer and (iii) the concentration treatment time, and incubation time with conditions should be given. Positive and negative controls together with their concentrations must be included. The number of replicates and the number of repeat experiments should be stated. Additional factors for *in vivo* tests should include age, weight, sex and total number of animals used in each experiment. A detailed dose regime is required. Papers for the Mutagenicity testing section should conform to the above requirements. In addition, results should be presented in tabular form.

General format

Prepare your manuscript text using a Word processing package (save in .doc or .rtf format). Use double spacing (space between lines of type not less than 6 mm) throughout the manuscript and leave margins of 25 mm (1 inch) at the top, bottom and sides of each page. Number each page. Please avoid footnotes; use instead, and as sparingly as possible, parenthesis within brackets. Enter text in the style and order of the journal. Type references in the correct order and style of the journal. Type unjustified, without hyphenation, except for compound words. Type headings in the style of the journal. Use the TAB key once for paragraph indents. Where possible use Times for the text font and Symbol for the Greek and special characters. Use the word processing formatting features to indicate **Bold**, *Italic*, Greek, Maths, ^{Superscript} and _{Subscript} characters. Clearly identify unusual symbols and Greek letters. Differentiate between the letter O and zero, and the letters I and l and the number 1. Mark the approximate position of each figure and table.

Check the final copy of your paper carefully, as any spelling mistakes and errors may be translated into the typeset version.

Abstract

The second page of every manuscript must contain only the Abstract, which should be a single paragraph not exceeding 300 words. Please abide strictly by this limitation of length. Published papers will only have the first 300 words of their abstracts incorporated into Medline, text in excess of this limit will be lost. The Abstract should be comprehensible to readers *before* they have read the paper, and abbreviations and reference citations should be avoided.

Funding

Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled 'Funding'. This should appear before the 'Acknowledgements' section.

The following rules should be followed:

- The sentence should begin: 'This work was supported by ...'
- The full official funding agency name should be given, i.e. 'the National Cancer Institute at the National Institutes of Health' or simply 'National Institutes of Health' not 'NCI' (one of the 27 subinstitutions) or 'NCI at NIH' (full RIN-approved list of UK funding agencies) . Grant numbers should be given in brackets as follows: '[grant number xxxx]'
- Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: '[grant numbers xxxx, yyyy]'
- Agencies should be separated by a semi-colon (plus 'and' before the last funding agency)
- Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number 'to [author initials]'

An example is given here: 'This work was supported by the National Institutes of Health [AA123456 to C.S., BB765432 to M.H.]; and the Alcohol & Education Research Council [hfygr667789].

Oxford Journals will deposit all NIH-funded articles in PubMed Central. See Depositing articles in repositories – information for authors for details. Authors must ensure that manuscripts are clearly indicated as NIH-funded using the guidelines above.

Acknowledgements

These should be included at the end of the text and not in footnotes. Personal acknowledgements should precede those of institutions or agencies.

References

Authors are responsible for the accuracy of the references. Published articles and those in press (state the journal which has accepted them) may be included. In the text, references should be cited, in order of appearance, as a number in brackets, e.g. (1). These should be on the line, do not use superscript. At the end of the manuscript the citations should be listed numerically. References should include, in the following order: all authors' names (with surnames and initials inverted), year, paper title in full,

journal title, volume number and inclusive page numbers. If a book, the name and address of the publisher should be given. The name of the journal should be abbreviated according to the *World List of Scientific Periodicals* and underlined to indicate italics.

References should therefore be listed as follows:

1. Hartley-Asp,B. and Hyldig-Nielsen,F. (1984) Comparative genotoxicity of nitrogen mustard and nor-nitrogen mustard. *Carcinogenesis*, **5**, 1637-1640.
2. Kirk,J.T.O. and Tilney-Bassett,R.A.E. (1978) *The Plastids. Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*, 2nd revised edn. Elsevier/North Holland, New York.
3. Warren,W. (1984) The analysis of alkylated DNA by high pressure liquid chromatography. In Venitt,S. and Parry,J.M. (eds), *Mutagenicity Testing - a Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 25-44.

Personal communication (J.Smith, personal communication) should be authorized by those involved, in writing, and unpublished data should be cited as (unpublished data). Both should be used as sparingly as possible and only when the unpublished data referred to is peripheral rather than central to the discussion. References to manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (B.Smith and N.Jones, in preparation) and should NOT be included in the list of references.

Tables

Tables should be typed on separate sheets, and numbered consecutively with Roman numerals. Tables should be self-explanatory and include a brief descriptive title. Footnotes to tables indicated by lower case letters are acceptable, but they should not include extensive experimental detail. An arrow in the text margin should be used to indicate where a table should be inserted in the text.

Illustrations

All illustrations (line drawings and photographs) should be referred to in the text as Figure 1 etc., which should be abbreviated to 'Fig. 1.' only in the figure legend. Figures must be prepared at publication quality resolution, using applications capable of generating high-resolution TIFF files of at least 300 pixels per inch at the final printed size for colour figures and photographs, and 1200 pixels per inch for black and white line drawings. Although some other formats can be translated into TIFF format by the publisher, the conversion may alter the tones, resolution and contrast of the image. Digital colour art should be submitted in CMYK rather than RGB format, as the printing process requires colours to be separated into CMYK and this conversion can alter the intensity and brightness of colours. Therefore authors should be satisfied with the colours in CMYK (both on screen and when printed) before submission. Please also keep in mind that colours can appear differently on different screens and printers. Failure to follow these guides could result in complications and delays.

Photographs. These must be submitted in the desired final size so that reduction can be avoided. The type area of a page is 248 x 185 mm (width) and photographs, including

their legends, must not exceed this area. A single column is 88 mm wide. A double column is 185 mm wide. Ideally, photographs should fit either a single column or a double column. Photographs should be of sufficiently high quality with respect to detail, contrast and fineness of grain to withstand the inevitable loss of contrast and detail inherent in the printing process. Please indicate the magnification by a rule on the photographs.

Colour plates. There is a special charge for the inclusion of colour plates. The cost is £350 *per plate*. (For cost purposes, the definition of a single figure is artwork that can be processed as a unit and printed on a single page without intervening type. Authors should note the potential cost savings inherent in this definition; for example, two consecutive half-page colour figures mounted as a composite and printed on one page, with both legends below or on the facing page, would be treated as one figure.) Orders from UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the EU, we will assume that the service is provided for business purposes, please provide a VAT number for yourself or your institution and ensure you account for your own local VAT correctly.

Line drawings. Please provide these as clear, sharp prints, suitable for reproduction as submitted. No additional artwork, redrawing or typesetting is done. Therefore, all labelling should be on the original drawing. Ensure that the size of lettering is in proportion with the overall dimensions of the drawing. Ideally, line drawings should be submitted in the desired final size to avoid reduction (maximum dimensions 248 x 185 mm including legends) and should fit either a single (88 mm) or a double column width (185 mm). If submitting line drawings which require reduction, please check that the lettering will be clearly legible after the drawing has been reduced to the size at which it will be printed. After reduction, letters should not be smaller than 1.5 mm in height.

Figure legends. These should be on a separate, numbered manuscript sheet. Define all symbols and abbreviations used in the figure. Common abbreviations and others in the preceding text should not be redefined in the legend.

Conventions

In general, the journal follows the conventions of the *CBE Style Manual* (Council of Biology Editors, Bethesda, MD, 1983, 5th edn).

Follow *Chemical Abstracts* and its indexes for chemical names. For guidance in the use of biochemical terminology follow the recommendations issued by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, as given in *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, published by the Biochemical Society, UK. For enzymes, use the recommended name assigned by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1978, as given in *Enzyme Nomenclature*, published by Academic Press, New York, 1980. Where possible, use the recommended SI (Système International) units.

Genotypes should be italicized; phenotypes should not be italicized. For bacterial genetics nomenclature follow Demerec *et al.* (1966) *Genetics*, **54**, 61-76.

Abbreviations

Try to restrict the use of abbreviations to SI symbols and those recommended by the IUPAC. Abbreviations should be defined in brackets after their first mention in the text. Standard units of measurements and chemical symbols of elements may be used without definition in the body of the paper.