

ATIVIDADE RECOMBINOGÊNICA INDUZIDA PELO AÇAFRÃO (*CURCUMA LONGA L.*) EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*.

Bethânia Cristhine de Araújo*
Júlio César Nepomuceno**

RESUMO: O açafrão (*Curcuma longa L.*) é uma herbácea rizomatosa de coloração vermelho-alaranjada, usada popularmente e comercialmente pelas indústrias farmacêutica, têxtil e química como corante e condimento. Do rizoma da planta é extraído um polifenol conhecido como curcumina. A curcumina é conhecida pelo seu potencial anticâncer e antigenotóxico, devido a sua capacidade de seqüestrar radicais livres. Contudo, existe uma grande variedade de princípios farmacológicos, encontrados no rizoma, que têm atividades antiinflamatórias, antifúngicas, antibacteriana e nematocida, e que ainda são desconhecidos quanto a sua atividade genotóxica. Com o objetivo de conhecer o potencial genotóxico da *Curcuma longa L.*, avaliou-se a solução aquosa do açafrão nas concentrações 1,0mg/mL, 3,0mg/mL e 5,0mg/mL, utilizando-se o teste para detecção de mutação e recombinação somáticas (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster*. O tratamento foi realizado em descendentes MH (trans heterozigotos marcados) e BH (heterozigotos balanceados), do cruzamento padrão (ST) e de alta bioativação (HB). Os resultados obtidos demonstraram que, nos indivíduos descendentes do cruzamento de alta bioativação, tratados com açafrão (1,0mg/mL, 3,0mg/mL e 5,0mg/mL) ocorreram aumentos, estatisticamente significativos, nas freqüências de manchas mutantes. A análise dos descendentes BH (heterozigotos balanceados) nos mostra uma atividade recombinogênica do açafrão. Tais resultados nos permitem concluir que o açafrão, nestas condições experimentais, possui efeitos genotóxicos (recombinogênico) em *D. melanogaster*.

PALAVRAS - CHAVE: *Curcuma longa L.* *Drosophila melanogaster*. SMART. Genotoxicidade.

ABSTRACT: Turmeric (*Curcuma longa L.*) is an orange-red rhizome herb, popularly and commercially used by pharmaceutical, textile and chemical industries, as pigment and seasoning. A polyphenol known as curcumin is extracted from the rhizome of the plant. Curcumin is known by its anti-cancer and antigenotoxicity potential, due to its capacity to scavenge free radicals. However, there is a great variety of pharmacological principles found on the rhizome, which have anti-inflammatory, anti-fungus, anti-bacteria and nematocidal activities, and which are still unknown in their genotoxicity activity. With the aim of knowing the genotoxicity potential of *Curcuma longa L.*, we have evaluated the aqueous solution of turmeric in 1,0mg/mL, 3,0mg/mL and 5,0 mg/mL concentrations, using the Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster* wings. The treatment was made in MH (marker-transheterozygous) and BH (balancer-heterozygous) descendants, of standard cross (ST) and of high bioactivation cross (HB). The results obtained demonstrated that in individuals descendant from high bioactivation cross, treated with turmeric (1,0mh/mL, 3,0mg/mL and 5,0 mg/mL), there were some statistically significant increases in the frequencies of mutant spots. The analysis of BH descendants (balancer-heterozygous) shows us a recombinagenic activity of turmeric. Such results may lead us to conclude that turmeric, in these experimental conditions, have genotoxicity effects (recombinagenic) in *D. melanogaster*.

KEY WORDS: *Curcuma longa L.* *Drosophila melanogaster*. SMART. Genotoxicity.

* Estudante de Graduação do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Patos de Minas e bolsista do IV PIBIC.

** Professor titular do Centro Universitário de Patos de Minas e Professor Adjunto da Universidade Federal de Uberlândia.

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A Genética, atualmente, tem lugar relevante na área científica e, mais que isso, aborda o homem moderno em sua vida diária. Essa relação proximal ciência/homem tem destacado a importância das descobertas genéticas que buscam melhorias de interesse humano, visando à prevenção de alterações no material genético, e ao que está relacionado a este comprometimento.

O estudo genético começou no ano de 1860 quando Gregor Mendel fez experimentos que apontaram para a existência de elementos biológicos, depois chamados genes. Mas foi em 1953, com a elucidação da estrutura do DNA, que James Watson e Francis Crick abriram caminho para a compreensão da ação gênica e da hereditariedade em termos moleculares (SUZUKI et al., 2002).

As alterações genéticas podem ocorrer em qualquer célula, em qualquer estágio do ciclo celular, resultantes de mutações gênicas, aberrações cromossômicas, recombinações e elementos genéticos de transposição (SUZUKI et al., 2002). O termo mutação refere-se a qualquer alteração no DNA, mas este processo de alteração, algumas vezes, pode ser chamado de normal, visto que o aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Outras vezes, porém, os resultados das mutações incluem malformações, câncer, envelhecimento e morte (ERDTMANN et al., 2003).

Os agentes mutagênicos podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias (RIBEIRO; MARQUES, 2003). As células neoplásicas estão desacopladas dos mecanismos regulatórios que controlam a proliferação celular devido ao acúmulo de mutações nas células que suprimem o controle do ciclo celular. As neoplasias derivam de uma única célula fundadora que sofreu mutação somática; entretanto as células mutantes descendentes sofrem mutações adicionais, formando um setor mutante (SUZUKI et al., 2002).

Após passar por várias divisões, se uma célula acumular um número elevado de mutações, pode ocorrer a perda do controle de sua divisão, determinando o aparecimento do câncer. Assim, os mecanismos de mutagênese e de carcinogênese parecem estar intrinsicamente ligados. A mutação é uma consequência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos inicia a formação do tumor (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Um tumor pode se dispersar pelo corpo para formar novos tumores, num processo chamado metástase. As etapas do desenvolvimento de uma neoplasia são iniciação, promoção e proliferação (WEINBERG, 1996) e as células neoplásicas se diferem

das normais por várias mudanças fenotípicas específicas, como a rápida taxa de multiplicação, invasão de novos territórios celulares, alta taxa metabólica e formas alteradas no tamanho, no núcleo e no número e na estrutura de seus cromossomos (SUZUKI et al., 2002).

Uma complexa rede de sistemas de reparo do DNA constitui a principal barreira protetora contra as consequências deletérias de danos no material genético, chamados genes de reparo, responsáveis por produzir enzimas topoisomerasas que reparam os genes defeituosos, além de contribuir para a inibição da proliferação celular através de proteínas (FELZENSZWALB; PINTO, 2003). Enfim, o aparato de proteção do DNA envolve diversos sistemas enzimáticos, especializados em dismutar, neutralizar e detoxificar diversos íons e moléculas para formas menos tóxicas, a fim de que possam ser eliminadas da célula e do sistema como um todo (LOURO et al., 2002).

Mas, apesar dos mecanismos de reparo já existentes no organismo, é preciso usar agentes antioxidantes. Estudos realizados em roedores (KONOPACKA et al., 1998; ANTUNES; TAKAHASHI, 1998) e em bactérias (EDENHARDER et al., 1999) mostram que as vitaminas protegem ou previnem danos na molécula de DNA, causados por agentes genotóxicos. Mesmo assim, tais mecanismos não são suficientemente eficientes para recuperar todas as lesões ocorridas. As mutações remanescentes são as responsáveis pela alteração das células e dos tecidos normais, podendo levar ao desenvolvimento de doenças degenerativas (SILVA; ANDRADE, 1999 apud VALADARES, 2002).

As mutações e a carcinogênese estão associadas porque ambas representam alterações em uma única célula e estas são permanentes e herdáveis pelas células filhas. Muitos cânceres humanos são causados pela exposição a agentes tóxicos e radiações. Esses carcinógenos são também mutagênicos, o que sugere que o dano no DNA é um evento fundamental e, portanto, é de grande importância a identificação desses compostos e a avaliação de seu potencial genotóxico, de modo que a exposição humana a eles seja minimizada (STRYER, 1996).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Plantas medicinais, dieta e câncer

As plantas adquiriram fundamental importância desde o ano 3000 a.C. quando se tem relato de cura através de plantas na China. Outra descoberta é o documento egípcio Ebers, encontrado em 1872 e que menciona a existência de herboristas no antigo Egito, além de documentos que mostram a importância que as ervas tiveram na saúde, na culinária, no preparo de produtos diversos e para embalsamar faraós. Na antiga Grécia, os

valores terapêuticos e tóxicos das plantas eram bastante conhecidos e, a partir da Era Cristã, europeus, árabes e alquimistas diversos contribuíram para a abertura de novas e amplas perspectivas na medicina natural (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 1996).

O poder medicinal das plantas se deve a um conjunto de componentes ativos sintetizados em seus tecidos que, a princípio, podem ser considerados terapêuticos, mas também podem causar efeitos indesejados ou tóxicos. Estes componentes, quando introduzidos nos organismos animais, promovem respostas fisiológicas e homeostasia e, de um modo geral, os princípios ativos apresentam mecanismos de ação semelhantes às drogas sintéticas (SIMÕES et al., 2003).

Atualmente uma das principais vias de exposição do homem a diferentes compostos é a ingestão de alimentos, já que através deles encontramos uma mistura complexa de agentes químicos. As diversas substâncias presentes nos alimentos podem ter efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos, induzindo mutações no DNA e favorecendo o desenvolvimento de tumores, enquanto outras podem atenuar ou anular tais efeitos (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

Muitos compostos presentes nos alimentos já foram testados quanto à mutagenicidade ou à antimutagenicidade, constatando-se que cerca de um terço de todos os cânceres humanos podem estar relacionados com o hábito alimentar. Por outro lado, tem sido observado que a dieta rica em frutas e legumes está associada à redução do risco de câncer (BLOCK, 1992 apud ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

As evidências na literatura médica demonstram uma clara associação entre dieta e câncer. Uma dieta rica em calorias, gordura saturada e proteína animal e pobre em fibras vegetais está relacionada ao surgimento de tumores de mama, endométrio, próstata, intestino grosso e vesícula biliar. Carnes artificialmente conservadas, especialmente as salgadas e defumadas, como a carne de sol e o *bacon* causam câncer de estômago e esôfago. Em animais, os alimentos conservados com nitritos e nitratos também são carcinogênicos (MURAD, 2004).

Uma dieta rica em fibras vegetais reduz a absorção intestinal de estrógenos, eliminando-os das vias biliares. Adicionalmente, o consumo de soja e seus produtos também parece reduzir a incidência do câncer de mama, possivelmente pela alta concentração dos chamados fitoestrógenos, esse tipo especial de estrógeno vegetal que atua no tecido mamário como um antagonista ao efeito cancerígeno dos estrógenos naturais (MURAD, 2004).

Os erros alimentares e o consumo exagerado de substâncias potencialmente cancerígenas podem ser responsáveis por cerca de 40% dos casos dos cânceres existentes (MURAD, 2004). Trata-se de um fato significativo, considerando-se que o câncer é a

segunda principal causa de óbito no Mundo, responsável pela morte de mais de 60 milhões de pessoas (FELZENSZWALB; PINTO, 2003).

Historicamente, os temperos ou condimentos foram utilizados em todas as culturas como elementos chave da culinária de cada país; (VARATOJO, 2004). Mas o preparo dos alimentos se modificou muito ao longo dos anos, particularmente nos últimos trinta anos. Além disso, a variedade, o sabor e a apresentação dos alimentos são preocupações constantes que têm motivado as indústrias alimentícias a utilizarem agentes para conservar, colorir ou aromatizar os alimentos, com o objetivo de atrair cada vez mais os consumidores.

O uso de corantes, naturais ou sintéticos, em alimentos tem atraído a atenção de muitos pesquisadores. Os primeiros testes de mutagenicidade e/ou carcinogenicidade, empregando corantes para alimentos ocorreram no início do século XX, quando Fischer demonstrou o efeito carcinogênico do corante vermelho escarlate (LEDERER, 1990 apud ANTUNES; ARAÚJO, 2000). Mas, apesar disso, as pesquisas estiveram muito voltadas para os corantes sintéticos, descuidando-se dos corantes naturais que também podem apresentar atividade mutagênica e/ou carcinogênica. Este fator pode estar relacionado à medicina não convencional que apregoa muito que "o que natural, não faz mal".

Um grande número de plantas pertencentes à família *Zingiberaceae* é usado como condimento, aditivo corante para alimentos e, também, como medicamento. A *Curcuma longa* Linn, espécie mais freqüente do gênero, tem o pó obtido a partir de seus rizomas, denominado curcuma (PANIZZA, 1997) e este é usado na culinária como corante e aromatizante para colorir gorduras hidrogenadas, manteiga, queijo, massas, sorvetes, biscoitos e doces, dentre outros alimentos.

2.2 Açafrão (*Curcuma longa* Linn)

O açafrão (*Curcuma longa* L.) é uma planta nativa da Índia e da Ásia Meridional e foi introduzida no Brasil pelos colonizadores (PANIZZA, 1997). A denominação curcuma vem da palavra Persa *Kurkum*, que significa açafrão e popularmente possui diversas sinonímias como: açafroeira, açafrão-da-terra, açafrão-da-Índia, gengibre amarelo, curcume, tumeric (inglês) e outras (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 1996).

A *Curcuma longa*, pertencente à família das Zingiberáceas, é uma herbácea perene, rizomatosa (Figura 1), sendo o rizoma principal piriforme e ovóide com inúmeras ramificações laterais compridas e finas; destes rizomas laterais podem nascer outras plantas independentes da originária. Apresenta folhas largas pecioladas e flores amareladas dispostas em uma longa bainha, semelhante a uma espiga. Os rizomas externamente

apresentam uma coloração acinzentada e internamente mostram uma superfície vermelho-alaranjada (PANIZZA, 1997).

Os rizomas do açafrão são tradicionalmente conhecidos no mercado internacional como “tumeric”, considerados especiarias por compor os famosos temperos orientais, sendo um dos principais componentes do *curry*. Entretanto, com a proibição do uso de pigmentos sintéticos nos principais países da América do Norte e Europa, o emprego da curcuma deixou de atender tão somente aos mercados condimentares e passou a disputar o mercado de alimentos, como corante e antioxidante e os mercados de perfumaria e têxtil (MAIA, 1991, apud CARVALHO et al., 1998).

A *Curcuma longa* L. possui diversos princípios ativos, como óleo essencial, resinas, substância amarga, curcumina, turmerona, açúcares, amidos e saponinas, que atualmente enquadram o açafrão no quadro de plantas úteis medicinais (PANIZZA, 1997). Além do já citado emprego como corante natural e de tecidos, na aplicação farmacêutica e química, é usada como reagente, sobretudo do ácido bórico e para descobrir *alcalis* (CORRÊA, 1984). O açafrão é utilizado também na medicina natural como ativador da função hepática e da secreção biliar, normalizador da taxa de colesterol (PANIZZA, 1997), contra reumatismo, sinusite, lesões de pele, anorexia, coriza, diabetes, no tratamento das infecções das vias urinárias, icterícia. Na Índia, é usado a fim de curar flatulências e resfriados e, na China, é empregado como emenagogo e para estancar hemorragias (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 1996). Também são encontradas na literatura propriedades anti-infecciosas e antibacterianas (CHERNOVIZ, 1996).

O açafrão (*Curcuma longa* L.) tem cheiro forte, agradável e sabor aromático, picante e fracamente amargo. Dentre os seus componentes, a curcumina, substância corante, tem demonstrado mecanismos de ação potenciais na prevenção do câncer, o primeiro deles é o efeito inibitório de enzimas pró-inflamatórias e lipoxigenases além da indução da produção de G2/M que detém o câncer de cólon humano, e da síntese de prostaglandinas (LAMSON; BRIGNALL, 2003). Segundo Araújo e Leon (2001), a *Curcuma longa* L. ainda possui efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, antiprotzoários, nematocida, anti-HIV e antitumorais. Porém, existe uma grande variedade de princípios encontrados no rizoma do açafrão que ainda são desconhecidos quanto a sua atividade genotóxica.

2.3 Doxorubicina

Os agentes que causam danos em nosso material genético e que induzem neoplasias são normalmente presentes no meio como a luz solar, radiações ionizantes ou agentes químicos (SETLOW, 2001). Um agente mutagênico é o cloridrato de doxorubicina,

que possui efeitos cardiotoxícos, genotóxicos, teratogênicos e ainda tem a capacidade de intercalar-se à molécula de DNA, gerando radicais livres.

A Adriblastina® RD é conhecida comercialmente como cloridrato de doxorubicina, um pó liofilizado composto por metilparabeno, lactose além da doxorubicina, sendo usado restritamente por hospitais e laboratórios com emprego específico em neoplasias malignas. A doxorubicina é eficaz em leucemias agudas e linfomas malignos, ativa em tumores sólidos e é um componente valioso de vários esquemas de quimioterapia, como do carcinoma de mama e carcinoma de pequenas células dos pulmões (GILMAN et al., 1996). Além disso, a doxorubicina tem sido usada com êxito para produzir regressão em carcinomas de bexiga, tireóide, carcinoma ovariano, linfomas de Hodgkin e não Hodgkin, neuroblastomas, tumor de Wilms e outros tumores sólidos (ADRIBLASTINA® RD.: pó liofilizado, 2002). Demonstrou também atividade em carcinomas do endométrio, testículo, próstata, colo do útero, cabeça e pescoço e no mieloma de células plasmáticas (CALABRESI; SCHEIN, 1993, apud GILMAN et al., 1996).

As propriedades citotóxicas da doxorubicina (DXR) sobre as células malignas e seus efeitos parecem estar relacionadas com a intercalação de seus anéis planos tetraciclina, entre os pares de bases nucleotídicas, causando conseqüentes danos à síntese de DNA e sobre a membrana lipídica celular, podendo ainda desencadear a quebra do DNA pela ação da topoisomerase II, gerando radicais de oxigênio livres altamente reativos e tóxicos (ADRIBLASTINA® RD.: pó liofilizado, 2002).

Portanto, a doxorubicina provoca manifestações tóxicas diversas como mielossupressão, tromboplastina, anemia, estomatite, perturbações gastrintestinais, manifestações dermatológicas, toxicidade cardíaca e derrame pericárdico (GILMAN et al., 1996). Os efeitos cardiotoxícos, genotóxicos, embriotóxicos e teratogênicos foram comprovados em testes *in vivo* realizados com camundongos, cães, coelhos e ratos. Ainda pode potencializar a toxicidade de outros agentes antineoplásicos, e uma vez que a via de eliminação da doxorubicina é o sistema hepatobiliar, a função hepática reduzida pode retardar a eliminação da droga e causar o aumento da toxicidade global (ADRIBLASTINA® RD.: pó liofilizado, 2002).

A DXR possui efeitos genotóxicos, induzindo aumento na freqüência de aberrações cromossômicas em células somáticas e redução na produção de células germinativas (gametas), comprovados em testículos de camundongos (AU; HSU, 1980 apud VALADARES, 2002), em células somáticas de *Drosophila melanogaster* (FREI et al., 1985), e em linfócitos humanos em cultura (ANTUNES, TAKAHASHI, 1998).

Segundo Antunes e Takahashi (1998), os efeitos genotóxicos da doxorubicina podem ser diminuídos pela ação das vitaminas C e E em células da medula óssea de ratos

Wistar e em células de asas de *Drosophila melanogaster*, quando ministradas em doses pequenas (FRAGIORGE, 2000 apud VALADARES, 2002).

Enfim, este antibiótico antracíclico possui vários efeitos terapêuticos e tóxicos, mas o efeito bioquímico mais importante neste estudo é a capacidade de intercalação da doxorrubicina com o DNA. Neste processo, muitas funções do DNA são afetadas, inclusive a síntese de RNA, ocorrendo também quebras mono e bifilamentares, bem como a troca de cromátides irmãs (GILMAN et al., 1996). Assim, as antraciclinas, como a doxorrubicina, são mutagênicas e carcinogênicas. Neste trabalho, a doxorrubicina foi utilizada como controle positivo, tendo em vista sua comprovada ação genotóxica.

2.4 SMART (Somatic Mutation And Recombination Test)

A *Drosophila melanogaster* é o organismo teste do SMART (Somatic Mutation And Recombination Test), o teste somático de asa desenvolvido por Graf et al. (1984) para detecção de agentes genotóxicos e que vem sendo usado também para detecção de antigenotóxicos. Este organismo eucarioto tem se mostrado ideal para estudos de genotoxicidade e antigenotoxicidade *in vivo*, por possuir pequeno número de cromossomos, sistema enzimático semelhante ao dos mamíferos, tempo curto de geração, grande número de mutantes, linhagens bem caracterizadas, além do baixo custo, rapidez e confiabilidade dos testes que utilizam a *Drosophila melanogaster* (GRAF et al., 1984; VOGEL, 1987).

O SMART detecta vários eventos mutacionais, como mutações pontuais, deleções ou tipos específicos de translocação, assim como recombinação mitótica e, por isso, nas últimas duas décadas, vem substituindo o conceituado teste do recessivo letal ligado ao sexo (Sex Linked Recessive Lethal Test - SLRT); além do fato de ser mais rápido, mais sensível e de menor custo que o SRLT (GRAF et al., 1984; VOGEL, 1987).

As linhagens de *Drosophila melanogaster* usadas no teste SMART são:

- ✓ *mwh/mwh* (*mwh*, multiple wing hair);
- ✓ *flr³/In(3LR)TM3(fl^r³, flare3)*;
- ✓ *ORR; flr³/In(3LR)TM3* (Oregon R, flare3).

As moscas da linhagem *mwh* possuem o gene marcador no cromossomo 3 (3-0,3) numa posição distal, caracterizado por expressar três ou mais pêlos em cada célula. A linhagem é mantida em homozigose por ser esta uma mutação viável. Os indivíduos *flare³* possuem o gene *flr³* numa posição proximal, também no cromossomo 3 (3-38,8) e o pêlo malformado é caracterizado por se assemelhar a uma chama. O gene marcador *flr³* é letal em homozigose (GRAF et al., 1984; GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995), no entanto, foi desenvolvido um cromossomo homólogo balanceador *TM3, Bds (Third Multiple 3, Beaded-serrate)* que mantém a heterozigose da linhagem *flr³* (LINDSLEY; ZIMM, 1992).

A linhagem *Oregon R; flare³ (ORR)* foi construída por Frölich e Würigler (1989) e, apesar de apresentar o marcador *flr³*, difere-se da linhagem *flare³* por apresentar os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem Oregon R resistente ao DDT, além de possuir alta atividade de enzimas citocromo P.450 (HALLSTRÖM; BLANK,1985). Pelo alto nível de citocromo P.450 constitutivo na linhagem *ORR*, o teste SMART torna-se mais sensível à ativação de promutágenos via citocromo.

No SMART são realizados os seguintes cruzamentos:

- 1) Cruzamento padrão (ST- Standard Cross):** fêmeas virgens *flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aabx^{34e}* e *Bd^s* cruzadas com machos *mwh* (GRAF et al., 1989);
- 2) Cruzamento de alta bioativação (HB- High Bioactivation Cross):** fêmeas virgens *ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aabx^{34e}* e *Bd^s* cruzadas com machos *mwh* (GRAF; VAN SCHAİK, 1992).

Desses cruzamentos nascem dois tipos de descendentes: trans heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Esses descendentes são distintos fenotipicamente, baseado no marcador TM3, *Bd^s*. Os MH (*mwh +/ + flr³*) apresentam os cromossomos estruturalmente normais, enquanto que os BH (*mwh +/ + TM3,Bd^s*) apresentam um cromossomo com um balanceador gênico com múltiplas inversões (*TM3,Bd^s*) (GUZMÁN-RINCON; GRAF, 1995).

Os indivíduos MH expressam pêlos mutantes nas asas originados de alterações mutagênicas e recombinogênicas ocorridas no locus gênico *mwh* e *flr³*. Já os descendentes BH possuem um cromossomo balanceador *TM3/Bd^s* que inibe recombinação, ocorrendo apenas eventos mutagênicos devido a inversões múltiplas. O fenótipo do descendente heterozigoto marcado (MH) desenvolve asa normal, com borda lisa, enquanto que no heterozigoto balanceado (BH), as asas são mal formadas, com aparência picotada ou serrilhada, denominadas "serrate" (GUZMÁN-RINCON; GRAF, 1995).

O teste da mancha da asa (SMART) baseia-se em grupos de células, discos imaginiais, que proliferam separadamente durante o desenvolvimento até se diferenciarem em estruturas do corpo da mosca adulta (olhos, asas etc.) (FREI et al., 1985). Então, pêlos mutantes são, a partir daí, classificados em manchas: simples, quando expressam apenas um dos marcadores *mwh* ou *flr³* originadas por mutação, aberração cromossômica (deleção) ou recombinação distal; e gêmeas, quando expressam os dois marcadores *mwh* e *flr³* na mesma mancha (GRAF et al., 1984). Quanto ao tamanho, as manchas podem ser simples pequenas, quando possuir um ou dois pêlos mutantes, ou simples grandes, se houver mais de dois pêlos mutantes. A posição da mancha é determinada de acordo com o setor da asa que tem sete regiões: A, B, C', C, D, D' e E.

3 METODOLOGIA

3.1 Agentes químicos

Após os cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação (HB), as larvas se alimentaram do açafrão cedido pela Fazenda Gameleira, município de Vazante - MG. O açafrão foi utilizado na forma de condimento e o extrato aquoso foi preparado a partir do pó obtido de rizomas secos e triturados. Esta planta herbácea pertencente à família das Zingiberáceas tem como principal componente a curcumina

A Adriblastina® RD, conhecida comercialmente por cloridrato de doxorrubicina, dissolvido em água destilada e usado como controle positivo, devido a sua comprovada ação genotóxica em *Drosophila melanogaster*.

3.2 Teste para detecção de mutação e recombinação somática - SMART

As linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster* existentes no Laboratório de Citogenética e Mutagênese foram cedidas pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os estoques da mosca são mantidos à temperatura de 25° C em frascos de 250 ml contendo um meio preparado com 820 ml de água, 11g de ágar, 156 g de banana, 1 g de nipagim e 25 g de fermento biológico (*Sacharomyces cerevisiae*) que, após aquecido, é distribuído de maneira uniforme pelos frascos.

Os dois tipos de cruzamentos foram realizados: padrão (“ST- Standard cross”) utilizando fêmeas virgens *flr³/TM3*, cruzando as com machos *mwh/mwh* (GUZMÁN – RINCÓN; GRAF, 1995); e de alta capacidade de bioativação (“HB- High bioactivation cross”) cruzando fêmeas virgens *ORR* e machos *mwh/mwh* (GRAF; VAN SCHAICK, 1992).

As moscas mantidas em estoque foram colocadas numa placa de petri e imobilizadas. A seguir, machos e fêmeas foram separados sob a lupa e fizeram-se os cruzamentos. A oviposição ocorreu 48 horas após o início dos cruzamentos e as larvas provenientes de ambos os cruzamentos (ST e HB), coletadas por filtração com um funil de metal e uma malha fina sob água corrente, foram transferidas para frascos de 25 ml contendo 1,5 g de purê de batata, um meio alternativo, e as concentrações do açafrão (*Curcuma longa*) testadas:

- ✓ Água destilada - controle negativo
- ✓ 0,125 mg/mL de DXR - controle positivo
- ✓ Açafrão 1 mg/mL/ Açafrão 3 mg/mL/ Açafrão 5 mg/mL

A análise microscópica das asas foi feita em microscópio óptico de luz (aumento de 400X). Com a observação dos sete setores de cada asa, os tipos e tamanho de manchas mutantes foram registrados.

Para avaliação dos efeitos genotóxicos do açafrão, as freqüências das manchas por mosca foram comparadas com as do controle negativo (água). De acordo com o teste qui-quadrado (X^2) para proporções (FREI; WURGLER, 1988) que se baseia em duas hipóteses:

1) a freqüência de mutação (induzida mais espontânea) na série tratada não é maior do que a freqüência de mutação no controle apropriado; **2)** a freqüência de mutação induzida na série tratada não é menor do que a maior freqüência de mutação espontânea observada no controle. Essas hipóteses foram levantadas para decidir se o resultado foi:

- ✓ Positivo: rejeita-se a primeira hipótese e aceita-se a segunda;
- ✓ Fraco positivo: rejeitam-se ambas hipóteses
- ✓ Inconclusivo: aceitam-se ambas as hipóteses;
- ✓ Negativo: aceita-se a primeira hipótese e rejeita-se a segunda.

4 RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos na análise dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH) descendentes do Cruzamento Padrão (ST), tratados com diferentes diluições do extrato aquoso de açafrão (*Curcuma longa*), obtido a partir do pó do rizoma triturado (1mg/mL; 3mg/mL; 5mg/mL).

Nos descendentes do cruzamento padrão, as freqüências totais de manchas, bem como todas as categorias de manchas mutantes (simples pequenas, simples grandes e gêmeas) apresentaram resultados estatisticamente inconclusivos para as concentrações 1mg/mL e 5mg/mL testadas, quando comparadas com o controle negativo (água). No entanto, na concentração 3mg/mL, o aumento na freqüência total de manchas foi significativo, como também o total de manchas simples pequenas. Porém, as machas simples grandes e gêmeas apresentaram resultados inconclusivos.

Para os descendentes BH, todas as categorias de manchas e a freqüência total não apresentaram resultados significativos; o diagnóstico foi, portanto, inconclusivo para todas as concentrações de açafrão e também para a DXR, mas, ainda assim, o total de manchas foi maior se comparado ao controle água; nesse caso, o menor valor de total de manchas foi encontrado na concentração 3mg/mL.

Na Tabela 2, os resultados obtidos do tratamento com os descendentes (MH) do Cruzamento de Alta Bioativação (HB) mostram aumentos significativos nas freqüências de

manchas simples pequenas, na freqüência de manchas simples grandes nas concentrações 1mg/mL e 3mg/mL e no total de manchas em todas as concentrações. Em relação à freqüência de manchas gêmeas na concentração 1mg/mL, este número foi maior que a freqüência no controle água, porém este aumento não foi significativo (diagnóstico inconclusivo). Nas demais concentrações, o total de manchas gêmeas foi igual (açafirão 3mg/mL) e menor (açafirão 5mg/mL), quando comparado ao controle negativo.

Verifica-se também que, nos descendentes MH do cruzamento HB, o aumento no total de manchas foi estatisticamente significativo nas diferentes concentrações, e este número foi diminuindo à medida que a concentração de açafirão aumentou.

Nos descendentes BH do cruzamento HB, na concentração 1mg/mL, o açafirão apresentou diagnóstico negativo na freqüência de manchas simples pequenas e no total de manchas e aumento não significativo em manchas simples grandes (inconclusivo). O extrato aquoso de açafirão nas concentrações 3 e 5 mg/mL apresentou diagnóstico negativo para manchas simples pequenas e no total de manchas, porém houve aumento na freqüência de manchas simples grandes, um aumento não significativo na concentração 5mg/mL, mas significativo em 3mg/mL

A Figura 8 apresenta as freqüências totais de manchas mutantes por mosca, observadas nas asas dos descendentes “MH” de *Drosophila melanogaster*, provenientes dos cruzamentos padrão “ST” e de alta bioativação “HB”, tratadas com diferentes concentrações de Açafirão (1mg/mL; 3mg/mL e 5mg/mL).

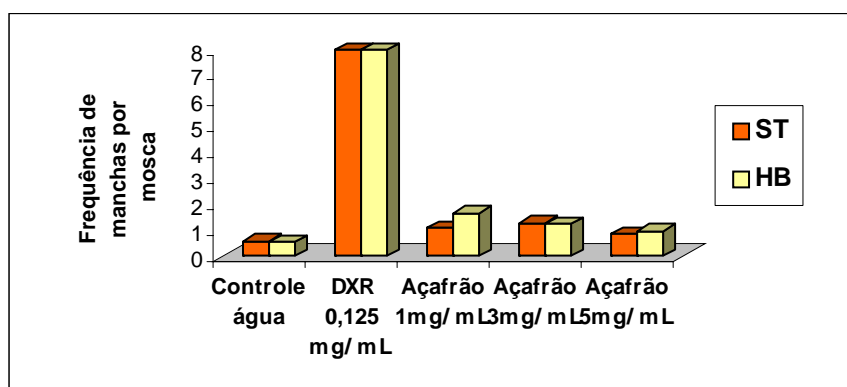


Figura 8: Freqüências totais de manchas mutantes por mosca nos descendentes trans-heterozigotos “MH” provenientes dos cruzamentos “ST” e “HB”, tratadas com diferentes concentrações de açafirão (*Curcuma longa* L.).

Tabela 1. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH e BH resultantes do cruzamento padrão (ST) tratados com diferentes concentrações de Açafração.

Tratamentos	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a						Total manchas mwh ^c (n)	Média das classes de tam. clones mwh ^{c,d} (î)	Frequência de indução de manchas (por 10 ⁵ células por divisão celular) ^f			
		MSP (1-2 céls) ^b		MSG (>2 céls) ^b		MG				TM		S/ correção por tam. ^{d,e} n/NC	C/ correção por tam. ^{d,e} (2 ^{t-2}) X (n/NC)
		m = 2		m = 5		m = 5				m = 2			
<i>mwh/flr³</i>													
Controle água	20	0,55(11)		0,05(1)		0,05(1)		0,65(13)		12	1,58	1,23	0,92
Açafração 1 mg/mL	20	0,95(19)	i	0,15(3)	i	0,00(0)	i	1,10(22)	i	22	1,77{2,00}	2,25{1,02}	1,93{1,02}
Açafração 3 mg/mL	20	1,15(23)	+	0,15(3)	i	0,00(0)	i	1,30(26)	+	26	1,73{1,86}	2,66{1,43}	2,21{1,30}
Açafração 5 mg/mL	20	0,70(14)	i	0,10(2)	i	0,05(1)	i	0,85(17)	i	17	2,24{3,80}	1,74{0,51}	2,05{1,78}
DXR 0,125 mg/mL	20	3,50(70)	+	4,60(92)	+	5,10(102)	+	13,20(264)	+	262	3,33{3,41}	26,84{25,61}	67,41{68,16}
<i>mwh/TM3</i>													
Controle água	20	0,35(7)		0,00(0)		g		0,35(7)		7	1,29	0,72	0,44
Açafração 1 mg/mL	20	0,55(11)	i	0,05(1)	i			0,60(12)	i	12	1,33{1,40}	1,23{0,51}	0,77{0,34}
Açafração 3 mg/mL	20	0,35(7)	i	0,05(1)	i			0,40(8)	i	8	1,38{2,00}	0,82{0,10}	0,53{0,10}
Açafração 5 mg/mL	20	0,60(12)	i	0,10(2)	i			0,70(14)	i	14	1,43{1,57}	1,43{0,72}	0,97{0,53}
DXR 0,125 mg/mL	20	0,65(13)	i	0,15(3)	i			0,80(16)	i	16	1,94{2,44}	1,64{0,92}	1,57{1,25}

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

^dNúmeros entre chaves são as frequências de indução corrigidas em relação a incidência espontânea estimada do controle negativo.

^eC = 48.000, isto é, número aproximado de células examinadas por indivíduo.

^fCalculado de acordo com Frei et al. (1992).

^gApenas manchas simples mwh podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

Tabela 2. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH e BH resultantes do cruzamento de alta bioativação (HB) tratados com diferentes concentrações de Açafração.

Tratamentos	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total manchas mwh ^c (n)	Média das classes de tam. clones mwh ^{c,d} (\hat{t})	Frequência de indução de manchas (por 10 ⁵ células por divisão celular) ^f	
		MSP (1-2 céls) ^b		MSG (>2 céls) ^b		MG		TM				S/ correção por tam. ^{d,e} n/NC	C/ correção por tam. ^{d,e} (2 ⁱ⁻²) X (n/NC)
		m = 2		m = 5		m = 5		m = 2					
<i>mwh/flr³</i>													
Controle água	30	0,47(14)		0,07(2)		0,03(1)		0,57(17)		17	1,65	1,16	0,91
Açafração 1 mg/mL	30	1,17(35) +		0,43(13) +		0,07(2) i		1,67(50) +		50	2,50{2,94}	3,42{2,25}	4,83{4,32}
Açafração 3 mg/mL	33	0,91(30) +		0,30(10) +		0,03(1) i		1,24(41) +		41	1,95{2,21}	2,55{1,38}	2,46{1,60}
Açafração 5 mg/mL	33	0,94(31) +		0,06(2) i		0,00(0) i		1,00(33) +		33	1,58{1,48}	2,05{0,89}	1,53{0,62}
DXR 0,125 mg/mL	20	3,50(70) +		3,40(68) +		3,20(64) +		10,10(202) +		190	3,05{3,14}	19,47{17,55}	40,23{38,58}
<i>mwh/TM3</i>													
Controle água	35	0,57(20)		0,00(0)		^g		0,57(20)		20	1,20	1,17	0,67
Açafração 1 mg/mL	30	0,47(14) -		0,03(1) i				0,50(15) -		15	1,27{0,73}	1,02-{0,15}	0,62-{0,06}
Açafração 3 mg/mL	30	0,40(12) -		0,13(4) +				0,53(16) -		16	1,81-{7,38}	1,09-{0,08}	0,96{0,00}
Açafração 5 mg/mL	30	0,27(8) -		0,00(0) i				0,27(8) -		8	1,25{1,16}	0,55-{0,62}	0,32-{0,35}
DXR 0,125 mg/mL	20	0,80(16) i		0,00(0) i				0,80(16) i		16	1,38{1,81}	1,64-{0,12}	1,06-{0,10}

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr³* raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

^dNúmeros entre chaves são as frequências de indução corrigidas em relação a incidência espontânea estimada do controle negativo.

^eC = 48.000, isto é, número aproximado de células examinadas por indivíduo.

^fCalculado de acordo com Frei et al. (1992).

^gApenas manchas simples mwh podem ser observadas nos indivíduos heterozigotos *mwh/TM3*, já que o cromossomo balanceador *TM3* não contém o gene mutante *flr³*.

A Figura 9 apresenta a porcentagem da frequência total de manchas mutantes, originadas por mutação e recombinação gênica nos descendentes MH do cruzamento HB (alta bioativação).

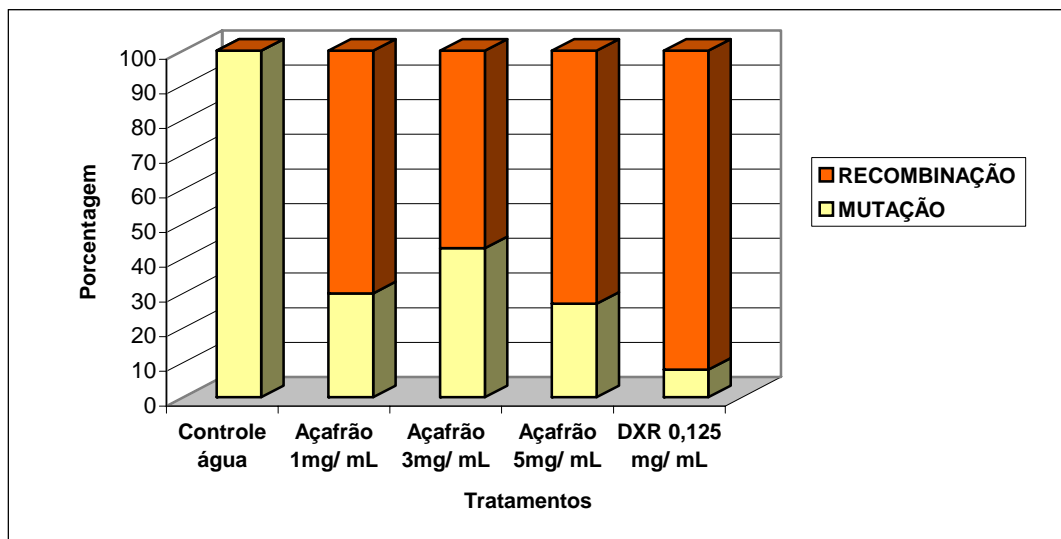


Figura 9. Mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster*, descendentes do cruzamento de alta bioativação, após tratamento crônico com extrato aquoso de açafrão e DXR 0,125 mg/mL.

Baseado na constituição genética das moscas trans-heterozigotas marcadas (MH), os clones (manchas) pequenos ou grandes podem ser originados por recombinação e/ou mutação, lesões que ocorrem no cromossomo 3. Considerando as moscas heterozigotas balanceadas (BH), portadoras do genótipo TM3, os clones são originados apenas por mutação, pois o TM3 inibe a recombinação.

Verifica-se, portanto, que o açafrão nas três concentrações foi altamente recombinogênico e que esta taxa de recombinação foi de 70% na concentração 1mg/mL, 57% na concentração 3mg/mL e 73% no extrato aquoso 5 mg/mL, sendo esta última concentração a que apresentou menores taxas de eventos mutagênicos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O pigmento extraído do açafrão é um composto fenólico, denominado curcumina. A curcumina é usada para colorir diversos alimentos e está presente nos rizomas do açafrão no teor médio de 2,5 a 8,1% (AMORIM et al., 2004).

As concentrações 1, 3 e 5mg /mL foram utilizadas para avaliar a genotoxicidade do açafrão (*Curcuma longa L*) em células somáticas das asas de *Drosophila melanogaster* e os resultados demonstraram que o extrato aquoso de açafrão induziu ação genotóxica nos descendentes MH do cruzamento HB em todas as concentrações, enquanto que nos mesmos descendentes do cruzamento ST esta ação ocorreu de forma não significativa, exceto para os

descendentes tratados com açafrão 3mg/mL. A alta atividade genotóxica da *Curcuma longa* nos descendentes do cruzamento de alta bioativação pode ser explicada pelo fato de algum princípio mutagênico, encontrado no açafrão, depender da ativação via citocromo P.450. A necessidade de ativação de alguns pró-mutágenos, pelas citocromo P.450 já foi demonstrada por Graf e Van Schaik (1992).

Mukhopadhyay et al. (1998) também demonstraram os efeitos mutagênicos fracos do açafrão e da curcumina isolada, em células da medula óssea de camundongos tratados. Resultados que, também, estão de acordo com os resultados obtidos por Antunes et al., 1999 e Araújo et al., 1999 que demonstraram o efeito mutagênico da curcumina, principal componente do açafrão, em células de ovário de *hamster* chinês (CHO).

Por outro lado, a *Curcuma longa* não demonstrou ser genotóxica em células precursoras da medula óssea e do baço de animais portadores de tumor de Ehrlich, mostrando-se eficiente na atividade antimutagênica na dose de 30mg/kg (FERRO; SOUZA, 2003). É possível que uma maior bioativação do açafrão tenha levado a uma ação citotóxica, diminuindo as freqüências totais de manchas nos indivíduos MH do cruzamento HB, à medida que se aumentou a concentração do extrato aquoso de açafrão, como mostrado na Tabela 2, sugerindo, portanto, uma relação inversamente proporcional entre surgimento de clones mutantes e concentração de açafrão. Provavelmente, se for usada uma menor dose que 1mg/mL, essa genotoxicidade aumente e, se usadas doses maiores que 5mg/mL, a freqüência de manchas mutantes vá diminuindo, sendo nesse caso letal para as células.

A curcumina é considerada um agente quimiopreventivo e está sendo testada pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos. Algumas outras atividades da curcumina são relatadas na literatura como, por exemplo, inibidora de apoptose, inibidora da integrase tipo-1 do HIV (MAZUMDER et al., 1995 apud ANTUNES; ARAÚJO, 2000), inibidora das funções induzidas pela radiação ultravioleta, inibidora da expressão de alguns protooncogenes e antioxidante, atuando, provavelmente, pelo seqüestro de espécies reativas de oxigênio (KAKAR; ROY, 1994 apud ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

No entanto, o presente estudo constatou a atividade recombinogênica da *Curcuma longa*. A recombinação somática é um mecanismo que leva ao fenômeno da perda da heterozigose, podendo ser, de acordo com Gúzman-Rincón e Graf (1995), um passo inicial na carcinogênese induzida por agentes genotóxicos.

A recombinação mitótica na região proximal do braço esquerdo do cromossomo 3, entre o centrômero e *locus flare-3* evidencia manchas gêmeas, detectadas pela presença de pêlos *mwh* e *flr³*, em uma mesma mancha. A ocorrência desses eventos foi observada nos descendentes tratados com o extrato aquoso de açafrão, indicando presença de atividade mutagênica e recombinogênica (Figura 9). Trabalhos com a curcumina também demonstram que esta pode ser capaz de induzir apoptose e fragmentação do DNA em células renais humanas (WOO, J. H., 2003).

Concluimos, portanto, que, provavelmente, a *Curcuma longa* L. possui um componente, ou associação de alguns, que são capazes de ativar promutágenos em mutágenos, ou ainda ser genotóxico direto para *Drosophila melanogaster*. A atividade genotóxica, verificada nos extratos aquosos, foi devida, principalmente, à sensibilidade e eficiência do SMART em permitir a detecção de eventos mutacionais e recombinação somática.

Como o açafrão é muito usado como corante e condimento no nosso país e principalmente na nossa região, e não há dúvidas de que a curcumina atualmente seja o corante para alimentos mais estudado, devido principalmente às suas propriedades farmacológicas, sendo então, importante que se façam novas pesquisas para conhecer o potencial genotóxico, de princípios isolados ou associados desta planta, em vários organismos teste, pois as contradições, como as já existentes na literatura, relatam que a eficácia no tratamento de doenças e o uso do açafrão também podem trazer prejuízos para o material genético bem como para a saúde.

Finalmente, nas condições experimentais deste estudo, os extratos aquosos de *Curcuma longa* L., popularmente conhecido como açafrão, nas concentrações 1, 3 e 5 mg/mL apresentaram atividade recombinogênica em *Drosophila melanogaster*.

6 REFERÊNCIAS

ADRIPLASTINA® RD.: pó liofilizado. Responsável farmacêutica bioquímica Dr^a F. Cutrupi. Milão: Pharmacia & Upjohn S.p.A, 2002. Bula de remédio.

ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C. (Ed.) ENCICLOPÉDIA das plantas que curam. São Paulo: Grupo de Comunicação Três S/A, 1996. p. 9–15.

AMORIM, H. E. et al. **Avaliação da atividade antifúngica do açafrão (*Curcuma longa* L.) em manteiga de leite.** Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”. Juiz de Fora: Jul./ Ago., 2004. n. 339.

ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. **Mutagenicidade e antimutagenicidade dos princípios corantes para alimentos.** Revista de Nutrição. vol.13. n.2. Campinas. Maio/Ago. 2000.

ANTUNES, L.M.G., ARAÚJO, M.C.P., DIAS, F.L., TAKAHASHI C.S. **Modulatory effects of curcumin on the chromosomal damage induced by doxorubicin in Chinese hamster ovary cells.** Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, New York, v.19, n.1, p.1-8, 1998.

ARAÚJO C.A.C.; LEON L.L. **Biological Activities of *Curcuma longa* L.** Rio de Janeiro: Memória do Instituto Oswaldo Cruz, 2001. v. 96. p.723–728.

CARVALHO, C.M.; SOUZA, R. J.; CECÍLIO FILHO, A. B. **Produtividade da curcuma (*Curcuma longa* L.) cultivada em diferentes densidades de plantio.** Lavras: Setor de olericultura, 1998. p. 32-34.

CHERNOVIZ, P.L.N. **A grande farmacopéia brasileira: formulário e guia médico.** 19 ed. Belo Horizonte: Itatiaia Ltda, 1996. v. 2. p. 632-634.

CORRÊA, M. Pio. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. v. 1. p. 21-23.

ERDTMANN, B.; SILVA, J.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica.** Porto Alegre: Alcance, 2003.

FERRO, Ana Flávia Portilho; SOUZA, Mary Luci de. **Estudo da atividade antitumoral do extrato da *Curcuma longa* Linn.** Faculdade de Ciências Médicas – FCM, UNICAMP, 2003. Disponível em: <<http://www.prp.unicamp.br/pibic/xicongresso/cdrom/pdfN/517.pdf>>. Acesso em: 23 ago./2004.

FELZENSZWALB, I.; PINTO, L. F. R. Genética do Câncer Humano. In: **Mutagênese Ambiental.** Canoas: ULBRA, 2003. cap. 2. p. 29-48.

FREI, H.; WÜRGLER, F. E. **Statistical methods to decide whater mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative or inconclusive result.** Mutation Res. 203,1988. p. 297-308.

FREI, H. et al. **Aristolochic acid is mutagenic and recombinogenic in *Drosophila* genotoxicity tests.** Archives of toxicology. 1985. p. 158-166.

FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F. E. **New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test.** Mutation Res. 216, 1989. p. 99-104.

GILMAN, Alfred G.; LIMBIRD, Lee E.; HARDMAN, Joel G. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 9. ed. Rio de Janeiro: Graw Hill, 1996. p. 909-943.

GRAF, U. et al. **Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*.** Environmental mutagenesis, 1984. p. 153-188.

GRAF, U.; VAN SCHAİK, N. **Improved high bioactivation cross for the wing somatic and recombination test in *Drosophila melanogaster*.** Mutation Res., 271, 1992. p. 59-67.

GRAF, U. et al. **Somatic Mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*.** Environmental mutagenesis, 1984. p. 153-188.

GRAF, U. et al. **Thirty coumpounds tested in the *Drosophila* wing spot test.** Mutation Res.222, 1989. p. 359-373.

GUZMÁN-RICON, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: **Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change**. New York: Edited by F. M. Butterworth et al., Plenum Press, 1995. p.169-181.

HALLSTRÖM, I.; BLANK, A. **Genetic regulation of the cytochrome P – 450 – dependent reactions**. Chem. Biol. Interact, 1985. p. 157-171.

KONOPHACKA, M.; WIDEL, R.; WOLNY, J. **Modifying effect of vitamins C, E and beta carotene against gamma ray induced DNA damage in mouse cells**. Mutation Res., 1998. 1133 p.

LAMSON, D. W.; BRIGNALL, M. S. **Natural agents in the prevention of cancer, part two: preclinical data and chemoprevention for common**. Disponível em <<http://www.thome.com/altmedrev.html>> Acesso em: 24/ mar. 2003.

LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001. 955 p.

LINDESLEY, D. L.; ZIMM, G.G. **The genome of Drosophila melanogaster**. San Diego: Academic Press, 1992. 1133 p.

LOURO, Lúri D., et al. **Genética Molecular do Câncer**. 2 ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002. 426 p.

MUKHOPADHYAY, M.J., SAHA, A., MUKHERJEE, A. **Studies on the anticlastogenic effect of turmeric and curcumin on cyclophosphamide and mitomycin C *in vivo***. 1998, Food and Chemical Toxicology, Oxford, v.36, n.11, p.73-76.

MURAD, André Márcio. **Educando para ter saúde**. Núcleo de Apoio ao paciente com câncer. Disponível em <<http://www.napacan.com.br>>. Acesso em 01 nov./ 2004.

PANIZZA, S. P. **Plantas que curam: cheiro do mato**. 17. ed. São Paulo: IBRASA, 1997. p. 88-96.

PASSAGLIA, L. M. P. Mutações: mecanismos de reparo do DNA e recombinação. In: **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. p. 116-158.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagenese ambiental na carcinogenese humana. In: **Mutagenese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. cap. 1. p. 21-27.

SETLOW, R. B. **Human cancer**. Mutation Res.: 477, 2001. p. 1-6.

SHEPARD, S.E., WAKABAYASHI, K., NAGAO, M. **Mutagenic activity of peptides and the artificial sweetener aspartame after nitrosation**. Oxford: Food and Chemical Toxicology, 1993. v.31, n.5, p.323-329.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis: UFRGS, 2003. 821 p.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996. 1001 p.

SUZUKI, D. et al. **Introdução a Genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 794 p.

VALADARES, Bruno Lassmar Bueno. **Ação anti-recombinogênica da própolis contra efeitos genotóxicos da doxorrubicina em *Drosophila melanogaster***. Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2002.

VARAJOTO, Francisco. **Plantas terapêuticas**. Disponível em <<http://www.infomacrobioica.com.br>>. Acesso em: 22 ago./ 2004

VOGEL, E.W. **Evaluation of potential mammalian genotoxins using *Drosophila*: the need for a change in test strategy**. *Mutagenesis*, 2, 1987. p. 161-171.

WEINBERG, R. **How Cancer arises**. *Sci Amer.*, 1996. p. 32-40.

WOO, J. H. et al. **Molecular mechanisms of curcumin – induced cytotoxicity...** *Medli* / 2003. Disponível em <<http://research.bmn.com>>. Acesso em 27 set./ 2003.