

SILVA, Carolina Ribeiro; **Chen Chen**, Lee. Avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica de *Duguetia furfuracea*. In: CONGRESSO DE PESQUISA E EXTENSÃO, UFG, CONPEEX 3-2006. Departamento de Biologia Geral-ICB, UFG, Goiânia, GO, Brasil.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA DE *Duguetia furfuracea*

SILVA, Carolina Ribeiro¹; **Chen Chen**, Lee²

Palavras-chaves: *Duguetia furfuracea*, micronúcleo, induteste.

1) INTRODUÇÃO

Desde tempos remotos, o homem tem feito uso de plantas medicinais no tratamento e na cura de enfermidades (Castro & Júnior, 2004). O conhecimento sobre plantas medicinais representa muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (Maciel *et al.*, 2002).

A planta *Duguetia furfuracea* (St. Hil.) Benth e Hook. F., conhecida popularmente como “sofre-do-rim-quem-quer” é amplamente utilizada pela população brasileira como calmante, antirreumática e para combater afecções renais e lombalgias. Esta planta medicinal pertence à família, Annonaceae, que também é encontrada no Cerrado (Henriques, 2003) e apresenta distribuição predominantemente tropical, incluindo aproximadamente 130 gêneros e 2200 espécies. No Brasil ocorrem 33 gêneros e cerca de 250 espécies (Souza & Lorenzi, 2005). As plantas dessa família são formadas por árvores e arbustos tropicais e subtropicais e são conhecidas por produzirem diversos derivados alcalóidicos isoquinolínicos. A triagem de espécies vegetais dessa família é de grande importância uma vez que tem sido identificadas substâncias com diferentes atividades biológicas, como por exemplo, citotóxica, antiplasmódica, antiprotozoária, antiparasitária, pesticida, antimicrobiana, antifúngica, antimalárica, imunossupressora, antioxidante e antitumoral (Sousa *et al.*, 2000; Frana *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2000).

Foram isoladas substâncias com atividade antimicrobiana, (Siqueira *et al.*, 1997) potencialmente antitumorais, (Siqueira *et al.*, 1998; Siqueira *et al.*, 2000) entre outras (Pereira *et al.*, 2003; Siqueira *et al.*, 2003) em três espécies da família Annonaceae, *Duguetia furfuracea*, *Duguetia glabriuscula*, *Unonopsis lindmanii*, pelo estudo fitoquímico biomonitorado.

Jolad *et al.* (1982), isolaram a primeira acetogenina de Annonaceae, a partir do extrato etanólico das raízes de *Uvaria acuminata*, uma substância que apresentou atividade citotóxica, antiparasitária e antitumoral no sistema PS (leucemia linfocítica em ratos) *in vivo*.

Chás e extratos vegetais podem produzir efeitos colaterais como qualquer droga, além de apresentar ação benéfica, podem também ser prejudiciais. Muitas dessas plantas podem inclusive apresentar atividade tóxica e genotóxica. Entretanto, na maioria dos experimentos que têm sido realizados, os extratos vegetais, podem também reduzir a taxa de mutações (Erdtmann, 2003).

Portanto, é de grande importância que as plantas medicinais sejam avaliadas sob diversos aspectos, incluindo atividade genotóxica e/ou antígenotóxica. Muitos testes de detecção de atividades genotóxicas têm sido propostos para identificação de possíveis carcinógenos (Vilar, 2004). Uma vez que, testes de mutagenicidade são referenciais para carcinogenicidade. Pois, o câncer é tipicamente uma doença de organismos multicelulares e os fatores que determinam mutagenicidade nestes organismos quase sempre também produzem neoplasias (Erdtmann, 2003).

O presente trabalho pretende investigar os possíveis efeitos genotóxicos e antígenotóxicos da planta medicinal *D. furfuracea* pelo teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*, que é um teste amplamente utilizado para detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), bem como pelo Induteste SOS, que é um ensaio que avalia quantitativamente uma das funções SOS que é a autoclivagem do repressor do profago λ , mediada pela copreatase RecA (Little, 1991).

2) MATERIAL DE MÉTODOS

2.1) Materiais

1) A planta, *Duguetia furfuracea* (St. Hil.) Benth e Hook. F.

Serão utilizadas folhas da planta medicinal *Duguetia furfuracea* preparada por método de infusão.

2) Material utilizado para teste em Camundongos

A) Camundongos

Serão utilizados 80 camundongos *Mus musculus* (Swiss Webster) out bred, do sexo masculino, pesando entre 30 e 40 g, com idade de 7 a 12 semanas, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás. Antes da realização do experimento, os animais permanecerão por 7 dias no laboratório, onde serão mantidos em gaiolas de polipropileno de dimensão de 40x30x16 cm com 5 animais cada, forradas com maravalha trocada diariamente, e alimentados com ração comercial e água filtrada, ambos oferecidos "*ad libitum*". Os animais serão mantidos a temperatura ambiente de 25°C, umidade 50% \pm 20% e um ciclo de luz 12h claro/12h escuro.

B) Agentes Químicos e Soluções

- Mitomicina.
- Giemsa.
- Metanol (CH₄O).
- Soro fetal bovino.
- Fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄12H₂O).
- Fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄H₂O).

3) Material utilizado para teste com Cepas Bacterianas

A) Cepas Bacterianas

As cepas bacterianas utilizadas no presente trabalho são as seguintes: WP2s (λ) (cepa lisogênica) e RJF013 (cepa indicadora), derivadas de *E. coli*.

B) Meios de Cultura e Tampões

- Top-ágar (Cloreto de Sódio; Agar (Difco) e Água destilada)
- Mitomicina
- Meio LB (Tryptona; Extrato de Levedura; Cloreto de Sódio e Água destilada)
- Meio LB (1/2) (malt/amp) (Tryptona; Extratos de levedura; Cloreto de Sódio; Água destilada; Maltose (20%) e Ampicilina)
- Tampão M9 (Fosfato de sódio dibásico; Fosfato de potássio dibásico; Cloreto de amônia; Cloreto de sódio; Água destilada; Cloreto de cálcio e Sulfato de magnésio)

2.2) Metodologia

1) Teste do Micronúcleo

Grupos de cinco animais serão tratados, via intraperitoneal, com diferentes doses e diferentes tempos (24 e 48 horas) da folha de *Duguetia furfuracea*. No grupo de controle negativo, será utilizada água destilada esterilizada enquanto no grupo de controle positivo receberá uma dose única de mitomicina C (MMC). Para avaliação da antimutagenicidade, serão administradas as mesmas concentrações do extrato da planta concomitantemente com uma dose única de MMC. Os animais serão sacrificados por deslocamento cervical e os fêmures são então retirados. As epífises do fêmur serão cortadas e a medula óssea lavada com 1mL de soro fetal bovino. Após homogeneização da medula no soro, esta será centrifugada a 300 x g durante 5 minutos. O sobrenadante será parcialmente descartado. O precipitado de células será homogeneizado com pipeta Pasteur. Uma gota de suspensão celular será transferida para a lâmina de vidro onde será feito o esfregaço celular. Após secagem das lâminas, estas serão fixadas em metanol absoluto durante 5 minutos e coradas em soluções de Giemsa tamponada com pH 6,8 por um período de 15 minutos (Heddle, 1973). Após este período, as lâminas serão lavadas em água corrente e deixadas secar em condições ambientais.

2) Induteste

O procedimento experimental quantitativo para avaliação da atividade exponencial de crescimento será realizado da seguinte maneira: a cepa lisogênica WP2s(λ), em fase exponencial de crescimento, será centrifugada a 5.000 rpm por 15 minutos e ressuspensa em igual volume com tampão sulfato de magnésio (M9). Amostras de 1mL da cultura serão incubadas com diferentes concentrações do extrato de *Duguetia furfuracea*, por 25 minutos a 37°C com agitação e aeração constantes. Após, serão diluídas em tampão M9 e 0,1mL de bactéria lisogênica será adicionada a 0,3mL da cultura RJF013 (bactéria indicadora), seguindo-se o acréscimo de 2,5mL de top-ágar. O conjunto será vertido sobre placas LB_(1/2) (malt/amp), em duplicatas, as quais serão incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Posteriormente serão computados os centros infecciosos e os resultados expressos

pelo fator de indução em função da concentração de *D. furfuracea*. Serão também incluídos controles: positivo (mitomicina C) e negativo (H₂O destilada).

Para melhor elucidar a inativação celular em função da dose de *D. furfuracea* será feita uma curva de sobrevivência. Culturas de *E. coli* WP2s(λ) em fase exponencial de crescimento será centrifugada, ressuspensa em tampão M9 e incubada com diferentes concentrações do extrato de *D. furfuracea* por 25 minutos a 37°C com agitação e aeração constantes. Diluída em tampão M9, será semeada em placas de LB. Após 24 horas de incubação na estufa a 37°C, procederá à contagem de colônias. Os resultados foram expressos pela fração de sobrevivência (número de colônias na placa teste sobre o número de colônias na placa controle negativo) em função da dose de *D. furfuracea*.

3) RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se elucidar a atividade genotóxica e/ou antigenotóxica do extrato de *Duguetia furfuracea*, pois, ambos resultados são de relevância para a população, visto que, se confirmada a atividade genotóxica da planta em estudo, contribuirá para o esclarecimento da população quantos aos possíveis riscos na ingestão desta planta. No entanto, se for constatada sua atividade antigenotóxica, a utilização benéfica será comprovada.

4) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTRO, Afrânio José Ribeiro; PASTORE JÚNIOR, Floriano. **Guia de Plantas Mediciniais**. Disponível em: <file:///A:/Plantas%20mediciniais/Guia-de-plantas-mediciniais,htm>.

ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Ed. Alcance, 2003, cap.1, p.21-48.

FRANA, S. A.; SUFFREDINI, I. B. Determinação da atividade citotóxica à *Artemia* de extratos de Annonaceae. **XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, Recife-PE, pp. 175, 2000.

GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, A. B.; LOPEZ, M. T.; BRAGA, F. C.; LOMBARDI, J. A.; MOTA, A. P. Triagem de extratos vegetais para atividade antitumoral e isolamento biomonitorado de substâncias ativas de *Annona coracea* (Annonaceae). **XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, Recife-PE, pp. 186, 2000.

HEDDLE, J. A. A rapid in vitro test for chromosomal damage. **Mut. Res.**, 18: 187-190. 1973.

HENRIQUES, Olga Kotchetkoff. **Caracterização da vegetação natural em Ribeirão Preto, SP: Bases para conservação**. Ribeirão Preto, 2003. 270p. Tese (Doutor) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP.

JOLAD, S. D.; HOFFMANN, J. J.; SCHRAM, K. H.; COLE J. R. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **J. Org. Chem.**, 47: 3151-3153, 1982.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, vol. 25, n.3, 429-438, 2002.

MOREAU, P.; BAILONE A.; DEVORET, R. Prophage induction in *Escherichia coli* K-12 uvrA uvrB a highly sensitive test for potential carcinogens. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**. 73: 3700-3704, 1976.

PEREIRA, N. F. G.; SIQUEIRA, J. M.; GARCEZ, W. S. Novel santalene sesquiterpenoids from stem bark of *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae, **Química Nova**, v. 26, p. 512-516, 2003.

SIQUEIRA, J. M.; OLIVEIRA, C. C.; GARCEZ, W. W.; GARCEZ, F. R., BOAVENTURA, M. A. Bioactive sesquiterpene from *Duguetia glabriuscula* in **Fitoterapia**, v. 66, n. 1, p. 89-90, 1997.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; BOAVENTURA, M. A. D.; OLIVEIRA, A. B., GARCEZ, W. S. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 557-559, 1998.

SIQUEIRA, J. M.; ZIMINIANI, M. G.; RESENDE, U. M. BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, aceito para publicação (após revisão), 2000.

SIQUEIRA, J. M.; CAROLL, C. A.; MULLER, L.; NASCIMENTO, E. A. Aromadendrane sesquiterpenoids from the essential oil of leaves of *D. furfuracea*. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 48, n.4, p. 89-93, 2003.

SOUSA, O. V.; SILVÉRIO M. S.; LEITE M. N.; SILVA C.; KAPLAN, M. A. C. Avaliação da atividade biológica de extratos de *Annona coriacea*. **XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Recife-PE. Pp. 244. 2000.

SOUZA, VINICIUS C.; LORENZI, HARRI. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2005. 640p.

VILAR, Juliana Brandestetter. **Avaliação das atividades genotóxica e antígeno-tóxica de *Annona classiflora* Mart, (araticum) em cepas bacterianas**. Goiânia, 2004. 131p. Dissertação (Mestre) – Instituto de Ciências Biológicas da UFG.

FONTE DE FINANCIAMENTO: CNPq

¹Mestranda em Biologia Molecular e Celular. Instituto de Ciências Biológicas-UFG, Laboratório de Radiobiologia de Microrganismos e Mutagênese. crs_bio@hotmail.com

²Orientador. Instituto de Ciências Biológicas-UFG. chenlee@icb.ufg.br