

ESTUDO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E ANTIMUTAGÊNICO DA *Curatella americana* L.

DE ANDRADE, Laryssa Silva¹; LACERDA, Elisângela de Paula Silveira²,
CHEN-CHEN, Lee²

Departamento de Biologia Geral/ Instituto de Ciências Biológicas/ UFG

¹laryssasa@yahoo.com.br, ²chenlee@ic.ufg.br

Palavras-chave: *Curatella americana*, mutagênese, antimutagênese.

1. INTRODUÇÃO

Diversas evidências indicam que as plantas medicinais representam a mais antiga e difundida forma de medicação (Halberstein, 2005) e de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% da população mundial utiliza plantas como fonte primária de diversos agentes medicinais (Cordell, 1995; Gurib-Fakim, 2005). Assim, é extremamente importante que testes que avaliam genotoxicidade de preparações vegetais sejam realizados a fim de avaliar seu potencial mutagênico ou modulação da genotoxicidade quando associados com outras substâncias. Testes de curto prazo têm sido utilizados a mais de 25 anos para identificar mutágenos químicos e avaliar seu potencial carcinogênico. A utilização destes testes se baseia em estudos da década de 1970, que reportaram que a carcinogenicidade está correlacionada com mutagenicidade (Waters *et al.*, 1999).

Sendo o Cerrado a segunda maior área vegetal do país que abrange 120 milhões de hectares, correspondendo a 23% da superfície do território, é de se esperar que as espécies que compõem esta vegetação exerçam forte influência na medicina popular (Guarim Neto e Morais, 2003). A planta *Curatella americana* L. (Dilleniaceae), popularmente conhecida como “lixadeira”, “sambaiba” e “cajueiro-bravo”, é utilizada na forma de infusões pela população para o tratamento de úlceras e inflamação (Cronquist, 1981; Corrêa, 1984). A análise fitoquímica dessa espécie tem revelado a presença de flavonóides, terpenos, compostos fenólicos, saponinas e esteróides (El-Azizi *et al.*, 1980). Estudos anteriores têm descrito a atividade terapêutica da planta com ação antiinflamatória, analgésica, antihipertensiva e vasodilatadora (Alexandre-Moreira *et al.*, 1999; Guerrero *et al.*, 2002). Além disso, outro estudo tem demonstrado que o extrato da planta altera a distribuição do radiofármaco tecnécio 99-m no organismo, bem como sua ligação aos elementos sanguíneos ou a outras moléculas, o que impede a precisão no diagnóstico de doenças pelo radiofármaco (Soares *et al.*, 2002). Considerando a grande utilização da planta *C. americana* pela população e seu potencial terapêutico, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade mutagênica e antimutagênica do extrato da casca do tronco de *Curatella americana* utilizando o Teste do Micronúcleo em camundongos e Aberração Cromossômica em linfócitos humanos.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1 – Teste do micronúcleo em medula óssea

2.1.1 – Extrato de *Curatella americana*

A casca do tronco da planta foi coletada, seca, pulverizada e submetida então a um processo maceração em etanol O solvente foi removido com o auxílio de um rotaevaporador.

2.1.2 – Camundongos

São 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.

2.1.3 – Agentes Químicos e Soluções

Fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico, corante Giemsa, metanol e soro fetal bovino.

2.1.4 - Procedimento Experimental

Os animais foram divididos em dezesseis grupos de cinco animais cada. Os grupos 1 e 2 (controles negativos) receberem uma dose única ip do solvente utilizado para diluição do extrato da planta (água destilada + 0,1% Tween80). Os grupos 3 e 4 (controles positivos) recebem uma dose única de mitomicina C (MMC) ip. Os grupos 5a, 5b, 5c, 6a, 6b e 6c são tratados com uma dose única de uma das três concentrações de extrato de *Curatella americana* ip. Os grupos 7a, 7b, 7c, 8a, 8b e 8c recebem uma dose única de extrato da planta ip concomitantemente com uma dose única de MMC. Os grupos 1, 3, 5a, 5b, 5c, 7a, 7b e 7c são sacrificados após 24 horas de tratamento, enquanto os grupos 2, 4, 6a, 6b, 6c, 8a, 8b e 8c são sacrificados 48 horas após o tratamento (figura 1). Os animais são sacrificados por deslocamento cervical e os fêmures são então retirados. As epífises do fêmur são cortadas e a medula óssea lavada com 1,0mL de soro fetal bovino. Após homogeneização da medula no soro, esta é centrifugada a 300 x g durante 5 minutos. O sobrenadante é parcialmente descartado. O precipitado de células é homogeneizado com pipeta Pasteur. Uma gota de suspensão celular é transferida para a lâmina de vidro onde é feito o esfregaço celular. Após secagem das lâminas, estas são fixadas em metanol absoluto durante 5 minutos e coradas em soluções de Giemsa tamponada (pH 6,8) por 15 minutos. Após este período, as lâminas são lavadas em água corrente e deixadas secar em condições ambientais. As células são visualizadas em objetiva de imersão (1000x), avaliando-se 2000 eritrócitos policromáticos (EPC) em duas lâminas para cada animal. Para avaliação da citotoxicidade, são contados também eritrócitos normocromáticos (ENC), e a razão EPC/ENC é determinada.

2.2 - Teste de Aberração Cromossômica em Linfócitos Humanos

2.2.1 – Extrato de *Curatella americana*

A casca do tronco da planta foi coletada, seca, pulverizada e submetida então a um processo maceração em etanol. O solvente foi removido com o auxílio de um rotaevaporador.

2.2.2. Linfócitos do sangue periférico humano

Os linfócitos são obtidos de seis doadores voluntários adultos saudáveis (três homens e três mulheres), na faixa etária de 20 a 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumantes, sem exposição recente a radiações ou a medicamentos.

2.2.3. Agentes Químicos e Soluções

Fitohemaglutinina A, soro bovino fetal, meio de Cultura RPMI (meio RPMI 1640, estreptomomicina, penicilina), cloreto de potássio, etanol, ácido acético, corante Giemsa, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio dibásico, colchicina.

2.2.4 - Procedimento Experimental

Com uma seringa estéril descartável são colhidos cerca de 10mL de sangue periférico que são então transferidos para um tubo estéril contendo heparina. O plasma é então separado por sedimentação. Com uma pipeta Pasteur, retiram-se cuidadosamente o plasma e os linfócitos do tubo e semeia-se nos frascos contendo 5mL de meio de cultura (80% de RPMI + 20% de soro fetal bovino + 3% de fitohemaglutinina A. A mistura é incubada em estufa a 37°C. Após 24h do início da cultura, estas são tratadas com o extrato de *C. americana*. Serão utilizadas três concentrações diferentes de extrato de *C. americana*. O tempo total de cultura é de 48h. Aproximadamente 90 minutos antes do término da incubação adiciona-se colchicina 0,016% a cada frasco de cultura (0,4 µg/mL de cultura) para interromper a divisão celular em metáfase. Terminado o tempo de incubação, o conteúdo é centrifugado a 300 x g por 5 minutos. O sobrenadante é desprezado e as células são suspensas em 5 mL de solução hipotônica de KCl 0,075M, aquecida a 37°C. Os tubos permanecem na estufa em 37°C até completar 5 minutos. Centrifuga-se novamente a 300 x g por 5 minutos, despreza-se o sobrenadante, suspende-se as células em 5mL de solução fixadora (1: etanol + 1: ácido acético). A fixação é repetida mais 2 vezes. Na última, as células são suspensas em cerca de 0,2mL de fixador. As lâminas limpas são conservadas em água destilada a 4°C. Goteja-se a suspensão de células sobre a lâmina inclinada. A coloração do material é feita em Giemsa diluído em tampão fosfato por 5 minutos. Lavam-se as lâminas em água corrente e deixa-se secar naturalmente. As aberrações cromossômicas são analisadas em no mínimo, 100 metáfases por tratamento. São contadas quebras cromatídicas e cromossômicas, anéis, trirradiais, entre outras aberrações visíveis. Os índices mitóticos são obtidos calculando o número total de células em divisão pelo total de células ativadas. Para isto, são contadas, no mínimo, 1000 células por tratamento. No caso dos linfócitos, o índice mitótico baixo pode indicar citotoxicidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Teste do Micronúcleo foi padronizado. As concentrações que estão sendo trabalhadas são 50, 100 e 200mg/Kg com base em estudos anteriores (Alexandre-Moreira, 1999). Os resultados encontrados até o presente momento estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Efeito da administração do extrato de *C. americana* em medula óssea de camundongos e controles.

Tratamentos	Grupo	Tempo	Eritrócitos policromáticos micronucleados			EPC/ENC	
			Dados Individuais ^a	No.	%	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
Controle negativo (H ₂ O _{dest.} + Tween80)	1	24h	04, 07, 04, 03, 06	24	1,20	4,8 ± 1,64	1,17 ± 0,06
MMC (4 mg/Kg)	3	24h	39, 40, 37, 35, 32	183	9,15	36,6 ± 3,2	0,52 ± 0,06
100,0 mg/Kg	5b	24h	25, 17, 22, 18, 20	102	5,10	20,4 ± 3,2 ^b	1,08 ± 0,13
100,0 mg/Kg	6b	48h	12, 17, 12, 11, 16	68	3,40	13,6 ± 2,70 ^b	1,45 ± 0,09
100,0 mg/Kg + MMC	7b	24h	23, 26, 27, 24, 17	117	5,85	23,4 ± 3,91 ^c	0,66 ± 0,13

^a Em 2000 eritrócitos policromáticos por animal.

^b Estatisticamente diferente do controle negativo pelo teste t-student. **P* < 0,05.

^c Estatisticamente diferente do controle positivo pelo teste t-student. **P* < 0,05.

Os resultados obtidos para 24h de tratamento do extrato com a concentração de 100mg/kg mostraram que houve um aumento significativo da frequência de EPCMN em relação ao controle negativo ($p < 0.05$), indicando, dessa maneira, que o extrato de *Curatella americana* apresentou a atividade mutagênica. Os resultados para 48h de tratamento com o extrato da planta mostraram um aumento significativo da frequência de EPCMN em relação ao controle negativo ($p < 0.05$), porém, houve uma redução da frequência quando comparada com o tratamento de 24h, indicando ainda a ação mutagênica da planta neste tempo de tratamento. Não foi observada alteração da razão EPC/ENC quando comparada ao controle negativo ($p > 0,05$) para o tempo de 24 horas. Para o tempo de tratamento de 48 horas, esta razão foi significativa ($p < 0,05$).

No estudo de antimutagenicidade, os resultados do tratamento dos animais com a concentração de 100mg/Kg acrescida de MMC mostraram redução significativa da frequência de EPCMN quando comparados com o controle positivo ($p < 0.05$). Entretanto, não foi observada alteração da razão EPC/ENC quando comparada ao controle positivo ($p > 0.05$). Os demais tratamentos ainda estão em estágio de execução.

O Teste de Aberração Cromossômica em linfócitos foi padronizado e está sendo executado em nosso laboratório. Os primeiros resultados de índice mitótico buscando definir as concentrações do extrato da planta a serem utilizadas estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Índice mitótico (IM) de culturas de linfócitos após tratamento com diferentes concentrações de extrato de *C. americana*

Tratamento	IM (%)
Sem tratamento	2,1
DMSO (2 μ l/mL cultura)	1,6
40 μ g/mL cultura	2,3
10 μ g/mL cultura	2,7
2,5 μ g/mL cultura	2,2
0,625 μ g/mL cultura	2,5

Os resultados iniciais obtidos sugerem a não citotoxicidade do extrato de *C. americana* em todas as concentrações testadas quando comparadas ao controle negativo. A análise citogenética dos tratamentos ainda está em fase de execução.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; PIUVEZAM, M. R.; ARAÚJO, C. C.; THOMAS, G. Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Curatella americana* L. *J. Ethnopharmacol.*, 67, 171-177, 1999.

CORDELL, G.A. Changing strategies in natural products chemistry, *Phytochemistry*, 40, 1585–1612. 1995.

CORRÊA, M. P. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, IBDF, Brasil (6 vols.), p. 402, 1984.

CRONQUIST, A. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University, New York, 1981.

EL-AZIZI, M.M.; ATEYA, A.M.; SVOBOBA, G.H.; SCHIFF, P.L.; SLATKIN, D.J.; KNAPP, J. E. Chemical Constituents of *Curatella Americana* (Dilleniaceae). *Pharm. Sci.*, 69, 360-361, 1980.

GUARIM-NETO, G.; MORAIS, R.G. de. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato-Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta bot. Bras.* 17, 561-584. 2003.

GUERRERO, M. F.; PUEBLA, P.; CARRÓN, R.; MARTIN, M. L.; ARTEAGA, L.; SAN ROMÁN, L. Assessment of the antihypertensive and vasodilatador effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, 80, 37-42, 2002.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.*, 13. 2005.

HALBERSTEIN, R.A. Medicinal Plants: Historical and Cross-cultural Usage Patterns. *Ann. Epidemiol.*, 2005.

R.; OLIVEIRA, M. B. N.; FILHO, M. B.; BRITO, A. R. M. S. Efeitos Biológicos do Extrato Bruto de *Curatella americana* a partir da marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com tecnécio-99M. *Alasbimn Journal Year*, 4, 14, 2002.

WATERS, M.D., STACK, H.F., JACKSON, M.A. Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. *Mutat. Res.*, 437, 21-49. 1999.

FONTE DE FINANCIAMENTO – UFG/PRPPG

¹ Mestranda. Instituto de Ciências Biológicas – Laboratório de Radiobiologia de Microrganismos e Mutagênese, laryssasa@yahoo.com.br

² Orientadora/Instituto de Ciências Biológicas/UFG, chenlee@icb.ufg.br