Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Mestrado em Biologia

Avaliação da Atividade Mutagênica e Antimutagênica de *Annona crassiflora* Mart. pelo Teste do Micronúcleo em Camundongos *Mus musculus*.

Francinez Linhares Ferreira

Goiânia-GO
Agosto de 2001

Universidade Federal de Goiás.
Instituto de Ciências Biológicas.
Mestrado em Biologia.

Avaliação da Atividade Mutagênica e Antimutagênica da *Annona crassiflora* Mart. pelo Teste do Micronúcleo em Camundongos *Mus musculus.*

Francinez Linhares Ferreira

Orientadora:
Prof[a]. Dr[a]. Lee Chen Chen

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia. Área de concentração em Genética.

Goiânia – GO
Agosto de 2001.

Banca Examinadora

Examinador externo: **Prof[a]. Dr[a]. Cláudia de Alencar Santos Lages**

Laboratório de Radiobiologia Molecular
Instituto Biofísica Carlos Chagas Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Examinador interno: **Prof[a]. Dr[a]. Rosângela Hatori Rocha**

Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Goiás

Presidente da banca: **Prof[a]. Dr[a]. Lee Chen Chen**

Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Goiás

Suplentes: **Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz**

Núcleo de Pesquisa Replicon
Universidade Católica de Goiás

Prof. Dr. José Realino de Paula

Faculdade de Farmácia
Universidade Federal de Goiás

Aos meus filhos

Pedro Henrique Linhares de Melo
e
Tatiana Linhares de Melo

Ao meu esposo

Bráulio Ferreira de Melo

De vocês recebi mais que compreensão e confiança.
Quantas vezes foram paciência e acalanto.
Foram mais que filhos e esposo,
foram meus companheiros
e cúmplices.

“A água de um rio

adapta-se ao caminho que é possível,

sem se esquecer do seu objetivo: o mar.

Frágil em sua nascente, vai ganhando

aos poucos a força dos outros rios que encontra.”

Anônimo.

AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho somente foi possível devido à contribuição de diversas pessoas e, em especial agradeço:

À Prof[a] Dr[a]. Lee Chen Chen pela orientação segura, conselhos e ensinamentos que muito engrandeceram minha formação científica e pelo carinho, confiança e amizade que me proporcionaram entusiasmo e segurança ao cumprimento de meus objetivos e desejo de seguir adiante.

Às Prof[as] Ms. Ivanise Mota e Maria Aparecida Sena, pelo incentivo e auxílio na técnica, sem os quais não teria possibilidades de realizar tal feito.

Ao Prof. Dr. Pedro Henrique Ferri, Prof[a] Dra. Suzana Santos e Prof. Dr. Luciano Lião, do Laboratório de Produtos Naturais/IQ/UFG, pela disponibilidade e pela extração do extrato vegetal analisado.

À Profa Ekaterina Akimovna B. Rivera do Biotério Central da UFG, pela doação de camundongos e esclarecimentos gerais sobre os mesmos.

Ao Prof. Dr. Realino e Prof[a] Débora, da Faculdade de Farmácia, pelos inestimáveis esclarecimentos sobre fitoquímica e toxicologia.

Ao corpo docente do Mestrado em Biologia pelos ensinamentos, discussões e auxílio experimental.

À equipe técnico administrativa do Instituto de Ciências Biológicas.

Aos amigos do Laboratório de Radiobiologia de Microrganismos e Mutagênese: Alberto, Daniel, Divino, Eliane, Juliana, João, Klever, Liliane, Luciana, Marinalva, Nara e Paula pelo convívio sempre bem humorado e companheirismo.

Às estagiárias Nara e Juliana pela constante boa vontade e auxílio durante toda a parte experimental deste trabalho.

Ao Bráulio Ferreira de Melo, esposo e companheiro, pelo esforço e eficiência em editorar as fotografias do araticum expostas nesse trabalho.

À Prof[a]. Ms. Vera Saddi pela oportunidade e privilégio de pertencer ao seu grupo de iniciação científica, alicerce de todos meus sonhos e conquistas.

Ao Prof. Dr. A. D. da Cruz (Peixoto) pela amizade fiel, incentivo e conselhos sempre edificantes que me encorajaram a escolher, e não aceitar, o meu destino.

Aos meus amigos de sempre Daniela de Melo e Flávio Ayres pelas sugestões, apoio e demonstração de carinho que me fizeram persistente e confiante.

À minha família pela paciência e resignação diante do pouco tempo a eles dedicado.

A FUNAPE e CAPES pelo auxílio e bolsa concedida.

A Deus que sempre me carrega nos braços.

ÍNDICE

página

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....viii
LISTA DE TABELAS.....ix
RESUMO GERAL.....x

INTRODUÇÃO GERAL……1
1.1 Considerações gerais.....1
1.2 Plantas Medicinais……7
1.3 *Annona crassiflora* Mart. (araticum)……9
1.4 Teste do micronúcleo…….....14
OBJETIVOS…….....19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS……....20

Capítulo 1

Detecção da Atividade Mutagênica da *Annona crassiflora* Mart. (araticum) pelo Teste do Micronúcleo em Camundongos.

1.INTRODUÇÃO…….……..31

2.MATERIAL E MÉTODOS…….....33
2.1 Procedimentos experimentais……..…….…..37
2.1.1 Avaliação da DL_{50} do araticum…..…….....37
2.1.2 Avaliação da atividade mutagênica do araticum pelo teste do micronúcleo……..…….....…… 38

3.RESULTADOS…….……...40
3.1 Dose Letal para 50% dos animais após tratamento com extrato bruto etanólico de folhas de araticum.....……...40
3.2 Avaliação da citotoxicidade do extrato bruto etanólico de folhas de araticum..... ……..…….43
3.3 Avaliação da atividade mutagênica do extrato bruto etanólico de folhas de araticum.. .....…….....46
4.DISCUSSÃO……..……...47

4.1 Justificativa…….....47
4.2 Análise da atividade tóxica e mutagênica do araticum em camundongos.....……...…….49

5. CONCLUSÃO…….....53

RESUMO……...……..54
ABSTRACT…….55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS…….56

Capítulo 2

Atividade Antimutagênica da *Annona crassiflora* Mart. (araticum) pelo Teste do Micronúcleo em Camundongos.

1.INTRODUÇÃO……...…...60

2.MATERIAL E MÉTODOS……....61
2.1 Procedimentos experimentais.....……..64
2.2 Avaliação da antimutagenicidade do araticum pelo teste do micronúcleo.....64

3.RESULTADOS……...….....66
3.1 Avaliação da atividade antimutagênica do araticum em camundongos.....66

4.DISCUSSÃO……....….68
4.1 Justificativa……....68
4.2 Análise da atividade antimutagênica do araticum pelo teste do Micronúcleo em camundongos.....69

5.CONCLUSÃO…….....……..71

RESUMO……...…….72
ABSTRACT……73
CONCLUSÕES GERAIS.....74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS……75

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

página

INTRODUÇÃO GERAL

FIGURA I Fruta e folhas do articum (*Annona crassiflora*).....13
FIGURA II Árvore do Araticum……13

Capítulo 1

Detecção da Atividade Mutagênica da *Annona crassiflora* Mart. (araticum) pelo Teste do Micronúcleo em Camundongos**.**

FIGURA I Sobrevivência dos camundongos Mus musculus em função da dose do extrato de araticum.....41

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Detecção da Atividade Mutagênica da *Annona crassiflora* Mart. (araticum) pelo Teste do Micronúcleo em Camundongos**.**

TABELA I Doses e tempos de administração de *Annona crassiflora* Mart. ……...……...35
TABELA II Composição tampão fosfato……...……...……...…...36
TABELA III Composição corante Giemsa……...…..……..36
TABELA IV Sobrevivência de camundongos *Mus musculus* em função da dose de araticum.....42
TABELA **V** Freqüência de micronúcleos em EPC e a relação EPC/ENC após tratamento com extrato de araticum em diferentes doses e tempos.....45

Capítulo 2

Atividade Antimutagênica da *Annona crassiflora* Mart. (araticum) pelo Teste do Micronúcleo em Camundongos.

TABELA I Doses e tempos de administração de *Annona crassiflora* Mart. ……...…62
TABELA II Composição tampão fosfato……..……...……...63
TABELA III Composição corante Giemsa…….……....63
TABELA IV Freqüência de micronúcleos em EPC e a relação EPC/ENC após tratamento simultâneo do extrato de araticum e mitomicina C.....67

RESUMO GERAL

Annona crassiflora Mart. (araticum) é uma planta tipicamente brasileira encontrada nos cerrados do Brasil. Esta planta contém acetogeninas que apresentam propriedades citotóxicas, antitumoral, antiparasitárias e antimicrobiana. Suas folhas, cascas, frutos e sementes são utilizadas pela população para tratar várias doenças como diarréia, reumatismo e sífilis. No presente estudo foi avaliada a atividade mutagênica e antimutagênica do extrato bruto etanólico de folhas de araticum pelo teste do micronúcleo na medula óssea de camundongos *Mus musculus*, em grupos de 5 animais para cada dose. Para a avaliação da atividade mutagênica, as doses foram aplicadas intraperitonealmente (10, 20, 50, 100 e 160 mg/Kg) e para avaliação da ação antimutagênica, as doses do extrato de folhas (10, 20,50, 100 e 160 mg/Kg) foram aplicadas concomitantemente com mitomicina C 94,0 mg/Kg). As preparações citológicas foram realizadas em conformidade com a metodologia de Heddle. Os resultados obtidos, na avaliação da atividade mutagênica, para todas as doses testadas, mostraram que o extrato de araticum não aumentou significantemente ($p > 0,01$) a freqüência de eritrócitos policromáticos micronucleados. Enquanto que na avaliação da ação antimutagênica, os resultados mostraram que esse extrato, nas doses de 20, 50 e 100 mg/Kg, inibiu significantemente ($p < 0,01$) a freqüência de micronúcleos induzidos pela mitomicina C. Dessa maneira, pôde-se concluii que o fitoterápico araticum não exibiu atividade mutagênica, entretanto uma ação desmutagênica foi observada.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Considerações gerais

O significado das mudanças genéticas nas células é reconhecido há muitos anos. As observações de Henri em radiação ultravioleta, Müller em 1927 (Raios-X), e Auerbach em 1947 (agentes químicos) estabeleceram o fato de que os agentes físicos e químicos, presentes em nosso ambiente, são capazes de produzir profundas mudanças na hereditariedade (Singer, 1996). Nos últimos anos, a avaliação dos danos genéticos resultantes da exposição dos organismos vivos aos agentes genotóxicos tem merecido especial atenção, principalmente estudos que revelam uma marcada sobreposição entre mutagenicidade e carcinogênese (Ames, 1989; Vijg, 2000).

Os genes podem sofrer mutação no tecido somático e/ou no germinativo, acarretando o desenvolvimento de doenças somáticas, efeitos teratogênicos e desordens hereditárias múltiplas. Embora as evidências diretas sobre a origem mutacional das doenças somáticas humanas ainda sejam limitadas, inferências obtidas a partir de resultados experimentais em diversos outros organismos têm fornecido evidências consistentes de que muitas doenças têm as suas raízes nas mutações. A mutagenicidade e a carcinogenicidade estão, em muitos casos, claramente correlacionadas. A teoria da mutação somática do câncer tem mostrado que mutágenos podem provocar câncer induzindo a

mutação em células somática levando a lesões genéticas permanentes que, geralmente, se expressam como mutações gênicas e/ou cromossômicas (Sugimura *et al.*, 1976; Bartsch *et al*., 1980; Vijg, 2000).

Atualmente, já se tem conhecimento que o câncer é uma doença multifatorial (genética e ambiental) e sua progressão envolvem a expressão de uma série de genes, como os proto-oncogenes e oncogenes.

Os proto-oncogenes, existentes nas células normais, codificam moléculas que participam nos processos de indução e controle da mutiplicação e do crescimento celular. Quando alterados, esses genes participam do mecanismo de malignização e são chamados de oncogenes. Os oncogenes estão envolvidos na iniciação e na promoção da transformação neoplásica. Um dos principais modos pelos quais os proto-oncogenes podem ser transformados para o estado causador de câncer (oncogênico) é por mutação (Van der Eb *et al*., 1984; Spandidos & Wilkie, 1984; Cooper, 1984; Vijg, 2000).

Como os tumores têm origem clonal, este evento pode causar um tumo mesmo quando acontece em apenas uma das numerosas céluas de um tecido (Baylin & Herman, 2000; Macleod, 2000).

Existe, ainda, a possibilidade de desenvolvimento de outras doenças decorrentes de mutações genéticas em células somáticas humanas. Fatores ambientais como vírus, radiação e agentes químicos podem também provocar danos no material genético causando, por exemplo, doenças relacionadas a anomalias neurológicas, problemas cardíacos e envelhecimento celular precoce (Ames, 1983 e 1993; Meneghini, 1987 e 1988; Haliwell &

Gutterridge, 1989; Mohan & Meltz, 1994).

Assim sendo, a exposição aos agentes genotóxicos oriundos do ambiente e também da dieta tem um significante papel na carcinogênese humana (Doll & Petos, 1981; Ames, 1989; Johnson, 1998), uma vez que o ambiente moderno expõe as pessoas a uma grande variedade de substâncias químicas em forma de remédios, cosméticos, conservantes de alimentos, pesticidas, compostos usados na indústria, poluentes e assim por diante. São muitas as evidências que demonstram a existência de uma ligação entre o hábito alimentar e uma alta freqüência de alguns tipos de câncer (Ames, 1983; Nguyen *et al*., 1989; Brito *et al*., 1990; Verhagen *et al*, 1993 e 1994; Wu *et al*., 1997).

Pelos vários métodos de detecção, muitos compostos têm mostrado potencial carcinogênico e mutagênico (Preston, 1995; Degrassi *et al*., 1999, Digue, *et al.*, 1999), e conseqüentemente, alguns desses foram submetidos a controle governamental. Entretanto, atualmente várias novas substâncias químicas e produtos são lançados no mercado a cada ano e é necessário que este vasto número de agentes seja avaliado quanto à mutagenicidade e carcinogenicidade antes que a população venha a ser exposta por eles.

A sensibilidade da resposta na detecção de agentes genotóxicos depende de uma intrincada cadeia de eventos que envolve: via de entrada e quantidade do composto absorvida; captação do composto pelo sistema metabólico no caso de pró-mutagênicos ou captação do composto pelas células alvo quando se tratar de mutagênicos de ação direta; acesso ao núcleo

e interação com o DNA, e finalmente, fixação das lesões genéticas (Ramel *et al*., 1986; De Flora, 1998). Vários fatores governados por forças balanceadoras opostas podem, adicionalmente, interferir sobre este processo. Neste contexto, destacam-se: (i) os sistemas de ativação e desintoxicação metabólica, (ii) a formação de espécies ativas de oxigênio ou de derivados nucleofílicos e sua captação por bloqueadores de moléculas reativas, e (iii) as lesões pré-mutacionais presentes no DNA e a possibilidade de sua reparação por múltiplos sistemas de correção inerentes às células (De Flora, 1998).

Uma vez que a incidência de doenças genéticas pode ser reduzida pelo decréscimo nas taxas de mutação, uma das estratégias para a proteção das populações humanas seria, portanto, a identificação dos agentes mutagênicos, seguida da implementação de medidas de controle do risco genético, através da diminuição da exposição humana a estes agentes (Waters *et al*., 1990; Johnson, 1998).

À luz dessas observações, surge uma nova possibilidade para a proteção da saúde humana que é a identificação e caracterização de substâncias naturais ou sintéticas que são capazes de interferir na atuação de diversos agentes potencialmente genotóxicos em diferentes etapas (Kada *et al*., 1981; De Flora, 1998; Sangwan *et al*.,1998). Desta maneira, tem emergido um novo campo de pesquisa que é a antimutagênese. Inicialmente, a grande massa de trabalhos experimentais foi realizada em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* tendo como objetivo detectar e identificar a presença de substâncias moduladoras da mutagênese em diversos alimentos comuns à

dieta humana (Clarke & Shankel, 1975; Ames, 1983; Sukumaran & Kuttan, 1995; Rauscher *et al*., 1998).

Os antimutagênicos podem ser classificados em desmutagênicos e antimutagênicos. Os desmutagênicos desempenham a sua atividade protetora por inativarem as substâncias mutagênicas antes que elas atuem sobre o DNA. Já os antimutagênicos são capazes de suprimir a mutação por interferirem sobre os processos metabólicos de reparação inerentes à célula (Kada *et al*., 1982).

O tipo de tratamento envolvendo o agente modulador e o mutagênico pode fornecer indícios do mecanismo de inibição da mutagênese. Desta forma, a exposição das células-alvo aos moduladores pode tanto proceder, co-existir ou seguir à exposição ao agente mutagênico, caracterizando, respectivamente, o pré, co e pós-tratamento. O pré tratamento possibilita a investigação de reações intracelulares do modulador ou de seus derivados com o composto mutagênico. Já o co-tratamento permite investigar as possíveis reações, que ocorrem a nível extracelular, entre o modulador e o mutagênico. Ambos os tipos de tratamento (pré ou co-tratamento) fornecem resultados sobre moduladores que atuam como desmutagênicos, segundo a classificação de Kada *et al*. (1982). Por outro lado, quando o composto mutagênico já incorporado à célula, iniciando, portanto, a indução de lesões no DNA, o pós-tratamento com o modulador pode revelar os seus possíveis efeitos sobre a fixação e expressão das lesões ocorridas, por interferir sobre os processos de reparação do DNA. Esses agentes inibidores são classificados como bioantimutagênicos de acordo com Kada *et al*. (1982).

Recentemente, De Flora (1998) propôs uma classificação mais detalhada dos mecanismos de ação dos inibidores da mutagênese com ação extracelular e intracelular e dos inibidores da carcinogênese.

A identificação do potencial biológico de novos compostos é por conseguinte também devotada para a identificação de novos agentes com significante atividade antineoplásica e que sejam, preferencialmente, tóxicas às células tumorais (Ferguson, 1994 e 1995; Ferguson & Pearson, 1996; Boone, *et al*., 1997; MacPhee, 1998; Kasuba *et al*., 1999).

A quimioterapia é o procedimento que visa ao tratamento e à cura de doenças neoplásicas, no entanto, apesar do sucesso alcançado com esses agentes, a maioria das drogas antineoplásicas, conhecidas como eficazes, tem apresentado uma variedade de efeitos indesejáveis de forma geral ou órgão-específico, danos no DNA e formação de câncer secundário (Ferguson & Pearson, 1996; Corrales, 1997; Miele *et al*., 1998; Kasuba *et al*., 1999; Gonzalez *et al*., 1999).

Dessa maneira, é de grande interesse que se consiga identificar compostos com propriedades antimutagênicas e antitumorais e que não apresentem atividade mutagênica.

1.2 Plantas Medicinais

A utilização de plantas medicinais é uma prática popular generalizada quase tão antiga como o próprio homem e que há algum tempo vem sendo retomada pela medicina natural que procura aproveitar suas práticas, dando-lhes caráter científico. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) tem mostrado que aproximadamente 67% da população mundial utiliza remédios a base de produtos naturais em busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável e também como subsídio à cura de diversas doenças. Desse total, pelo menos 30% o fazem por indicação médica (Farnsworth, 1985).

No Brasil, o uso de plantas medicinais é tradicional e não se restringe às zonas rurais ou regiões desprovidas de assistência médica e farmacêutica.

As pesquisas realizadas pela associação das indústrias farmacêuticas constataram que o uso de fitoterápicos cresceu 20% em 1995, enquanto que o consumo de medicamentos sintéticos aumentou 16% no mesmo período. Em diversas capitais dos Estados Brasileiros a utilização de plantas como medicamentos atinge índices em torno de 80% (Oliveira *et al*., 1994; Fonseca & Fioravante, 1995).

A situação da região Centro-Oeste é condizente com a de outros Estados. Nesta região, o uso de plantas com potencial medicamentoso reveste-se de singular importância, visto que abriga o Cerrado, segunda maior zona de vegetação do Brasil, cobrindo cerca de 25% da superfície total do país, onde 90% estão situados nos Estados de Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo. Dessa maneira, é compreensível que as espécies que compõem esta

vegetação exerçam forte influência na medicina popular.

A utilização medicinal das plantas do cerrado é feita principalmente de partes vegetativas (raízes, caules e folhas) e algumas vezes das resinas. O uso é feito através de chás ou por aplicações externas nos processos de banhos e gargarejos (Oliveira *et al*., 1994).

No entanto, apesar da crescente utilização de plantas como fitoterápicos, pouca informação encontra-se disponível sobre os constituintes de plantas, bem como sobre os riscos em potencial oferecidos à saúde humana. Muitos desses compostos já foram identificados como mutagênicos e carcinogênicos. Entre esses podem ser citados safróis, hidrazinas, hidroxihidroquinona, furocumarinas, quinonas, alcalóides de pirrolizidina e teobrominas (Garcia, 1987; Czeczot *et al*., 1990; Pereira, 1992; kazuyuki *et al*., 1998).

Por outro lado, existem, em plantas, substâncias que apresentam ação antimutagênica tais como os beta-carotenos (Vitamina A), o ácido ascórbico (Vitamina C), o tocoferol (Vitamina E), porfilinas, ácidos graxos, polifenóis, compostos sulfídrilicos, taninos, flavonóides, cálcio, fibras, ácido fólico e clorofila (Ames, 1983; Steinmetz & Potter, 1991; Di Mascio *et al*., 1991; Mayane, 1996; Antunes, 1997; Kaur *et al*., 1998; Sangwan *et al*., 1998; Edenharder *et al*., 1999).

Existem ainda vários compostos e/ou classes de compostos de origem vegetal que apresentam atividade antineoplásica, dentre eles, podemos destacar: terpenos, lignanas, xantonas, alcalóides e acetogeninas (Rupprechet

et al., 1990; Fang *et al*., 1993; Sangwan *et al*., 1998; Hanumantharao *et al*., 1998).

Com intuito de ampliar o conhecimento sobre as plantas medicinais do cerrado, foi proposta neste trabalho, a avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade da *Annona crassiflora* Mart. (Araticum) pelo teste do micronúcleo em camundongos.

1.3 *Annona crassiflora* Mart - Araticum

A planta *Annona crassiflora* Mart. da família Annonaceae, conhecida popularmente como araticum, bruto, cabeça-de-negro, marolo e pinha-do-cerrado, é uma planta genuinamente brasileira e disseminada em amplos setores do cerrado. Sua distribuição abrange os Estados da Bahia, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo e Tocantins (Almeida *et al*., 1998). (FIGURA I e II).

As anonáceas são consideradas plantas de variado aproveitamento e tradicionalmente usados na medicina popular, sendo seu fruto e sementes comestíveis. Suas finalidades terapêuticas abrangem: uso da polpa do fruto maduro como tônico e adstringente; das folhas como indutoras do fluxo menstrual, antisifilítico e antirreumático; das cascas como antidiarréico e do

pó das sementes para o tratamento de ferimentos, picadas de cobra e pediculose (Correia, 1926; Cruz, 1979; Rizzini *et al*., 1986; Almeida *et al*., 1987 e 1998).

A família Annonaceae compreende cerca de 120 gêneros e mais de 2000 espécies (Leboeuf *et al*., 1982). Segundo Panichpol & Waterman (1978) ainda pouco se conhece da fitoquímica desta família, provavelmente devido ao grande número de espécies, aliado ao fato que a maioria dos estudos realizados centraliza-se em alcalóides, cuja presença é marcante em Annonaceae.

Entretanto, estudos recentes têm indicado a presença de outros constituintes oriundos de Annonaceae com comprovado papel nutricional, como o cálcio, fósforo, ferro, carotenóides, vitamina B1 e B2 e vitamina C (Agostini *et al*., 1996; Almeida *et al*., 1998), além da classe das acetogeninas, que representa um grande interesse nos estudos fitoquímicos das Annonaceae, particularmente do gênero *Annona* (Santos *et al*., 1992, 1994 e 1995; Pollo-Zafra *et al*., 1996 e 1998).

Tal interesse foi motivado pelas pesquisas de Jolad e colaboradores (1982), que testaram o extrato etanólico das raízes de *Uvaria accuminata* e dele isolaram a primeira acetogenina de Annonaceae, uma substância de natureza graxa denominada uvaricina. Esta nova substância apresentou atividade citotóxica, antiparasitária e antitumoral no sistema PS (leucemia linfocítica em ratos) *in vivo*.

Atualmente, sabe-se que as diferentes espécies e gêneros de Annonaceae sintetizam tipos particulares de acetogeninas cuja classificação é feita de acordo com as características estruturais apresentadas. Essas acetogeninas, usualmente possuem um esqueleto constituído de 35 a 37

átomos de carbono, contendo um anel γ-lactônico, geralmente α, β-insaturado e um ou dois anéis tetra-hidrofurânicos (THF), que podem ou não ser adjacentes e de dois a sete grupos de hidroxilas, dois destes flanqueando o THF (Rupprechet *et al*., 1990; Silva *et al*., 1996).

A grande maioria dessas acetogeninas apresentou atividade antitumoral em testes *in vitro* e *in vivo* contra diferentes linhagens de células cancerígenas. Algumas delas são também efetivas na inativação de linhagens de células resistentes às drogas, e são relativamente não tóxicas às células não cancerígenas humanas (Morre *et al*., 1995; Oberlies *et al*., 1995, 1997). Atividades antimitótica, antimicrobiana e antimalárica, também foram atribuídas às acetogeninas de Annonaceae (Rupprechet *et al*., 1990).

A possível ação antitumoral desta classe de acetogeninas, demonstrada experimentalmente, foi constatada pelo impedimento da produção de ATP através da inibição da enzima oxi-redutase ubiquinona-NADH (Complexo I) do sistema transportador de elétrons mitocondrial (Londershausen, *et al*., 1991; Hollingworth *et al*., 1994; Pollo-Zafra *et al*., 1996) e da enzima oxidase ubiquinona-NADH de membranas plasmática de células tumorais (Morre, *et al*., 1995).

Santos e colaboradores (1992) isolaram e determinaram a estrutura de uma nova acetogenina, a partir do extrato etanólico de sementes de *Annona crassiflora* Mart., que foi denominada de crassiflorina. Dessa maneira, crassiflorina, bulatanocina e cherimolina-2 são denominações diferentes para

a mesma substância que foi isolada em três países diferentes: Brasil, Estados Unidos e França, a partir de espécies do gênero *Annona*, a saber *Annona crassiflora*, *Annona Bullata* e *Annona cherinolia* (Cortes *et al*., 1993).

A crassiflorina, demonstrou, *in vitro*, significante atividade contra linhagens de células tumorais humanas quando comparada com adriamicina, agente conhecidamente antineoplásico (Santos *et al*., 1995). A presença de atividade antitumoral da crassiflorina tem despertado um grande interesse por *Annona crassiflora* Mart. (araticum) como uma possível fonte potencial de agente antineoplásico natural (Santos *et al*., 1994).

Com o objetivo de contribuir na elucidação dos possíveis efeitos genotóxicos e antigenotóxicos desta planta, foi avaliada, no presente estudo, a atividade mutagênica e antimutagênica da *Annona crassiflora* Mart. pela análise da freqüência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos (teste do micronúcleo).

Figura I - Fruto e folhas do araticum (Annona crassiflora)

Figura II - Árvore do araticum

1.4 Teste do Micronúcleo

A estreita associação entre potencial mutagênico e carcinogênico aumenta acentuadamente a importância das pesquisas sobre eventos mutacionais e traz como conseqüência a necessidade de sistemas-teste específicos que possam fornecer resultados sobre as potencialidades carcinogênicas das substâncias que estão sendo analisadas (Preston *et al*., 1981; Rabello-Gay *et al*., 1991; Elespuru, 1996; Kirsch-Volders, 1996; Hayashi *et al*., 2000).

Os testes, que avaliam as atividades mutagênicas de compostos, raramente podem ser efetuados na espécie humana, por razões éticas. Em conseqüência, foram desenvolvidos testes que empregam inúmeros outros sistemas biológicos em procariotos e eucariotos. Os bioensaios utilizados podem ser de curta ou de longa duração (Garcia, 1987; Rabello-Gay *et al*., 1991).

Nos testes a "longo prazo" é observado o desenvolvimento ou não de neoplasias em animais de experimentação, com uma ou várias doses de uma substância testada, através de uma rotina apropriada por um período relativamente longo ou até, se possível, pela vida inteira. Porém, o custo para esse tipo de teste, é bastante elevado. Além disso, a ocorrência de neoplasia é demorada, exigindo, freqüentemente vários anos, o que se torna incompatível com as necessidades da sociedade (Bannasch *et al*., 1986).

Os testes a "curto prazo" foram desenvolvidos para detectar a capacidade de agentes físicos, químicos ou compostos de provocarem

alterações genéticas em microrganismos, células de mamíferos, cultura de tecidos em várias plantas e animais (Purchase *et al*., 1982; Kilbey *et al*., 1984; Ranaldi *et al*., 1998; Villalobos *et al*., 1999). Estes testes apresentam a vantagem de serem mais baratos quando comparados com testes de outras modalidades, e mostrarem resultados convincentes em tempo relativamente curto. Dentre os "testes rápidos", os mais utilizados para monitorar os danos genotóxicos de agentes químicos, são:

1) Ensaios de mutagenicidade com:

- Microrganismos - ensaios de mutações gênicas reversas com *Salmonella typhimurium* - Teste de Ames; ensaios com fungos; testes baseados na indução das funções SOS.
- Organismos superiores - pêlos estaminais de *Tradescantia*, meristemas radiculares vegetais e células somáticas e germinativas de *Drosophila melanogaster* (Rabello-Gay *et al*, 1991).

2) Ensaios que detectam alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais em:

- Testes em linfócitos do sangue periférico humano tratados *in vivo* e/ou *in vitro*, para a verificação de efeitos clastogênicos, aneugênicos, trocas entre cromátides irmãs e a verificação de alterações no índice mitótico (IM).
- Testes em células de medula óssea de roedores, tratados *in vivo*, para a verificação de efeitos clastogêncos, aneugênicos, trocas entre cromátides irmãs e a verificação de alterações no IM (Rabello-Gay *et al*., 1991).

O teste do micronúcleo, um teste a "curto prazo", estabelecido tanto nos sistemas *in vitro* quanto *in vivo,* serve para detectar e quantificar a ação mutagênica de agentes indutores (Heddle, 1973; Schmid, 1975; Bruce & Heddle, 1979; MacGregor *et al*., 1987). Este teste apresenta algumas vantagens em relação aos outros, entre as quais pode-se citar principalmente a sensibilidade, baixo custo e confiabilidade. Este teste pode ser executado praticamente em qualquer população de células que estejam constantemente em divisão, sendo a medula óssea de mamíferos uma das regiões mais adequadas, visto que suas células levam de 22 a 24 horas para completar um ciclo de divisão (Heddle, 1973).

Os micronúcleos são formados na anáfase, onde as cromátides e fragmentos cromossômicos acêntricos se atrasam em relação aos elementos com centrômero, quando estes se ligam aos polos do fuso. Após a telófase, os cromossomos não danificados e os fragmentos de centrômeros dão origem aos núcleos filhos. Os elementos que se atrasam são também incluídos nas células filhas, mas muitos se transformam em um ou vários núcleos secundários muito menores que o principal, denominados micronúcleo (MN), variando de 0,5 a 11,1% do DNA do núcleo diplóide em G1 (média 3,5%) (Heddle & Carrano, 1977). O teste do micronúcleo, realizado *in vivo*, em uma primeira abordagem, pode detectar agentes clastogênicos ou aneugênicos (que interferem na formação do fuso mitótico, alterando a distribuição eqüitativa dos cromossomos durante a divisão celular).

Conforme Heddle (1973) e Schmid (1975), os MN são contados nos eritrócitos jovens. Quando os eritroblastos expelem seu núcleo ao se

transformarem em eritrócitos, os MN permanecem no citoplasma onde são facilmente reconhecidos.

Segundo Mavournin e colaboradores (1990), os eritrócitos jovens são formados pela expulsão do núcleo no eritroblasto que ocorre 6 horas após a última mitose, e estes apresentam coloração azulada quando corado por Giemsa, por conterem ainda ácido ribonucléico (RNA) ribossômico no citoplasma e são chamados de eritrócitos policromáticos (EPC). Perante a mesma coloração, os eritrócitos maduros apresentam coloração alaranjada ou avermelhada e são chamados de eritrócitos normocromáticos (ENC) (Corralles, 1997). De conformidade com Salamone & Heddle (1983), a distinção entre EPC e ENC é de fundamental importância para confirmar quando o aumento da incidência de MN é realmente devida à exposição a um dado agente. Normalmente a razão EPC/ENC é 1:1, decrescendo quando a substituição dos EPC originados dos eritroblastos é deprimida (Mavournin *et al*., 1990). A razão EPC/ENC pode indicar a ação tóxica na medula óssea, devendo salientar que a taxa espontânea de EPC com MN é de aproximadamente 3/1000 (Rabello-Gay *et al*., 1991).

As medidas do conteúdo de DNA (Heddle & Carrano,1977), e a comparação do tamanho relativo dos micronúcleos (Yamamoto & Kikuchi, 1980), permitem determinar se o composto é clastogênico ou aneugênico, pois a análise do tamanho relativo do MN induzido sugere o sítio de ação do agente indutor. Recentemente, Matsuoka e colaboradores (1999), utilizaram a freqüência de células polinucleadas e índice mitótico (IM), *in vitro*, como parâmetro para a distinção de agentes clastogênicos de aneugênicos. Eles

observaram que os agentes reconhecidamente clastogênicos como a mitomicina C (MMC) e N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), induziram aumento estatisticamente significativo das células polinucleadas e não do IM, enquanto os agentes aneugênicos, vincristina (VINC) e benzopireno (BP), além da indução de células polinucleadas, também aumentou significativamente a freqüência de células em mitose.

O teste do MN, inicialmente descrito para detecção de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos em células do sistema hematopoiético (eritrócitos) de roedores, tem sido também utilizado em outros tipos celulares tais como o uso de inflorescências de *Tradescantia* (Villalobos *et al.*, 1999); linfócitos do sangue periférico humano (Kasuba *et al*., 1999); células uroteliais ou esfoliadas da mucosa bucal, bexiga urinária, ureter, brônquios, e do cérvix (Titenko *et al*., 1998); em eritrócitos nucleados de peixes, como dosímetro biológico de áreas contaminadas (testes *in situ*) e na avaliação da genotoxicidade de compostos após exposição indireta *in vivo* (Nepomuceno *et al*., 1997). O teste do micronúcleo, em muitos casos, é o único teste de genotoxicidade *in vivo* no comando para auxiliar o registro de novos farmacêuticos (Parton *et al*., 1996).

2- OBJETIVOS

1- Avaliar a toxicidade do extrato bruto etanólico de folhas da planta *Annona crassiflora* Mart. em camundongos *Mus musculus* pela determinação da Dose Letal para a metade dos animais (DL_{50}).

2- Determinar a possível citotoxicidade eritropoiética da *Annona crassiflora* Mart. pela relação entre eritrócitos policromáticos (EPC) e eritrócitos normocromáticos (ENC) na medula óssea de camundongos *Mus musculus*.

3- Avaliar o possível efeito mutagênico do extrato da planta *Annona crassiflora* Mart. pela avaliação da freqüência de micronúcleos (MN) na medula óssea de camundongos *Mus musculus*.

4- Avaliar o possível efeito antimutagênico da *Annona crassiflora* Mart., pelo tratamento simultâneo do extrato da planta e de composto sabidamente mutagênico, Mitomicina C (MMC), utilizando-se o teste do micronúcleo em camundongo.

3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostini, T.S.; Cecchi, H.M.; Godoy, H.T. (1996). Composição de carotenóides no marolo in natura e em produtos de preparo caseiro. Ciênc.Tecnol.Aliment., 16(1): 67-71.

Almeida, S.P.; Silva, J.A.; Ribeiro, J.F. (1987). Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, barú, cagaita e jatobá. Planaltina, Brasília, EMBRAPA-CPAC, pp.10-21.

Almeida, S.P.; Proença, C.E.B.; Sano, S.M.; Ribeiro, J.F. (1998). Planaltina, Brasília, EMBRAPA.

Ames, B.N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Sci., 221: 1256-1263.

Ames,B.N.(1989).Mutagenesis and carcinogenesis: endogenous and exogenous factors. Environ.Mol.Mutagen., 14(16): 66-77.

Ames, B.N. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. Proc. Acad. Sci., 90: 7915-7922.

Antunes, L.M.G. (1997). Efeito protetor das vitaminas C e E sobre os danos cromossômicos induzidos pelo antitumoral doxorubicina em células de mamíferos in vitro e in vivo. (Tese de Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, São Paulo. pp. 100.

Auerbach, C.; Robson, J.M. (1947). The production of mutations by chemical substances. Proc. R. Soc. Edinburgh B., 62: 271-283.

Bannash, P.; Griesemer, R.A.; Andres, F.; Becker, R.; Cabral, J.R.; Della Porta, G.; Feron, V.J.; Henschler, D.; Ito, N.; Kroes, R.; Magee, P.N.; Mcknigh, B.; Mohr, U.; Montesanto, R.; Napaldov, N.P.; Nesnow, S.; Pegg, A.E.; Rao, G.N.; Turusov, V.S.; Wahrendorf, J. & Wilbourn, J. (1986). Long-term and short-term assays for carcinogens: A critical appraisal. pp. 17-73, Oxford University Press, UK. Montesanto, R.; Bartsch, H.; Vanio, H.; Wilbourn, J. & Yamasaki, H. (Eds.).

Bartsch, H. ; Malaveille, C. ; Camus, A.M. ; Martel - Planche, G.; Brun, G. ; Hautefeille, A.; Sabadie, N.; Barbin, A.; Drevon, T.; Piccolo, C. & Montesano, R. (1980). Validation and comparative studies on 180

chemicals with S. typhimurium strains and V-79 Chinese hamster cells in the presence of various metabolizing systems. Mut.Res., 76: 1-50.

Baylin, S.B. & Herman, J.G. (2000). DNA hypermethylation in tumorigenesis, epigenetics joins genetics. TIG, 16(4): 168-174.

Boone, C.W.; Bacus, J.W.; Bacus, J.V.; Steele, V.E.; Kelloff, G.J. (1997). Properties of intraepithelial neoplasia relevant to cancer chemoprevention and to the development of surrogate end points for clinical trials. Division of Cancer Prevention and control, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Marykland 20892, USA. Proc- Soc- Exp- Biol- Med., 216: 151-65.

Brito, M.T.; Martinez, A.; Cadavid, N.F.G. (1990). Mutagenic activity in regional foods and berverages from the Venezuelan Andean region. Mut.Res., 243: 115-120.

Bruce, W.R.; Heddle, J.A.(1979).The mutagenic activity of 61 differents agents as determined by micronucleus, Salmonella and sperm abnormality assays. Can.J.Genet.Cytol., 21: 319-334.

Clarke, C.H. & Shankel, D.M. (1975). Antimutagenesis in microbial systems. Bacteriol. Rev., 39: 33-53.

Cooper, G.M. (1984). Activation of transforming genes in neoplasms. Br.J.Cancer, 50: 137-142.

Corrales, E.A.L.S. (1997). Verificação dos efeitos genotóxicos dos agentes Neoplásicos citrato de tamoxifen e paclitaxel. Uberlândia. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia.

Correia, M.Pio (1926). Dicionário das plantas úteis e espécies exóticas. Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro.

Cortes, D.; Myint, S.H; Dupont, B.; Davoust, D. (1993). Bioactive acetogenins from seeds of Annona cherimolia. Phytochem., 32: 1475-1482.

Cruz, G.L. (1979). Dicionário das plantas úteis do Brasil. Ed. Civilização Brasileira S.A., pp. 63-67.

Czeczot, H.; Tudek, B.; Kusztelak, J.; Szymczyk, T.; Dobrowolska;Glinkowska, G.; Malinowski, J.& Strzelecka, H. (1990). Isolation and studies of the mutagenic activity in

the Ames test of flavonoids naturally occuring in medical herbs. Mut.Res., 240: 209-221.

De Flora,S.(1998).Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mut.Res., 402(1-2): 151-158.

Degrassi, F.; Tanzarella, C.; Ieradi, L.; Zima, J.; Cappai, A.; Lascialfari, A.; Allegra,F.; Cristaldi, M.(1999).Crest staining of micronuclei from free-living rodents to detect environmental contamination in situ. Mutagen., 14(4): 391-396.

Digue, L.; Orsiere, T.; De-Meo, M.; Mattei, M.G.; Depetris, D.; Duffaud, F.; Favre, R.; Botta, A. (1999). Evaluation of the genotoxic activity of paclitaxel by the in vitro micronucleus test in combination with fluorescent in situ hybridization of a DNA centromeric probe and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human T- lymphocytes. Environm.Mol.Mutag., 34(4): 269-278.

Di Mascio, P.; Murphy, M.E.; Sies, H. (1991). Antioxidant defense systems: The role of carotenoids, tocopherols, and thiols. Am.J.Clin.Nutr., 53: 194s-200s.

Doll & Petos. (1981). ICPEMC- Comissão Internacional de Proteção mutagênicos e carcinogênicos Ambientais. Desenvolvido por Brawn.

Edenharder, R.; Wanderlburg, W.; Kref, D.; Platt, K.L. (1999). Antimutagenic effects and possible mechanisms of action of vitamins and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food. Mut.Res.,444(1): 235-248.

Elespuru, R.K.(1996). Future approaches to genetic toxicology risk assessment. Mut.Res., 365: 191-204.

Fang, X.P.; Rieser, M.J.; Gu, Z.M.; Zhao, G.X.; McLaughlin, J.L. (1993). Annonaceous acetogenins: an updated review. Phytochem.Anal., 4: 27- 67.

Fang, X.P.; Rong, S.; Gu, Z.M.; Rieser, M.J.; Hui, Y.H.; McLaughlin, J.L. (1993). Structural revisions of some non - adjacent bis - tetrahydrofuran Annonaceous acetogenins. J.Nat.Prod., 56: 1095-1100.

Farnsworth, N.R. (1985). Medicinal plants in therapy. Bulletim of the WHO, 63(6): 965-981.

Ferguson, L.R. (1994). Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the

diet. Mut.Res., 307: 395-410.

Ferguson, L.R.; Denny, W.A. (1995). Anticancer drugs: an underestimated risk or an underutilised resource in mutagenesis? Mut.Res., 331: 1-26.

Ferguson, L.R. & Pearson, A.E.(1996).The clinical use of mutagenic anticancer drugs. Mut.Res., 355: 1-12.

Fonseca, D. & Fioravanti, C. (1995). As plantas milagrosas. Globo Ciências, 33: 16-23.

Garcia, M.V. (1987). Princípios Básicos de Genética Toxicológica. UNESP, São José do Rio Preto, pp.127.

Goltsberg, I.S. (1982). Oreádes: 8-15.

Gonzalez, C.M.; Cuello, M.T.; Larripa, I.; Castex, M.R.; Melo, P. (1999). Comparison of the aneugenic effect of vinorelbine and vincristine in culture human lymphocytes. Mutagen., 14(1): 63-66.

Halliwell, B. & Gutterridge, J.M.C. (1989). Free radicals in biology and medicine. 2a Ed., Clarendron Press. Oxford.

Hanumantharao, R.; Kshitij, G.; Viswajeet, R.; Mridual, B.; Gopa, B.; Sanjay, S.K.; Subhash, -C.J.; Virinder, P.; Carl, O.; Jesper W. (1998). Aflatoxin B1- induced micronuclei and cell cycle alterations in lung and bone marrow Cells and their modulation by Piper arqyrophyllum extract. Teratog.Carcinog.Mutagen.18(5): 249-261.

Hayatsu, H.S.; Arimoto, S. & Neigishi, T. (1988). Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mut.Res., 202: 429-446.

Hayashi, M.; MacGregor, J.T.; Gatehouse, D.; Adler, I.D.; Blackey, D.H.; Dertinger, S.; Gopala, K.; Takeshi, M.; Russo, A. (2000). In vivo rodent erytrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatements, integration with toxicity testing, and automated scoring. Environm.Mol.Mutagen., 35: 234-252.

Heddle, J.A. (1973). A rapid in vitro test for chromosomal damage. Mut.Res., 18: 187-190.

Heddle, J.A. & Carrano, A.V.(1977). The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by γ-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. Mut.Res., 44: 63-69.

Hollingworth, R.M.; Ahammadesahib, K.I.; Gadelhad, G.; MacLaughlin, J.L. (1994). New inhibitors of complex I of the mitochondrial electron transport chain with activity as pesticides. Biochem. Soc. Trans., 22,230.

Johnson, F.M. (1998). The genetic effects of environmental lead. Mut.Res., 410: 123-140.

Jolad, S.D.; Hoffmann, J.J.; Schram, K.H.; Cole, J.R. (1982). Uvaricin, a new Antitumor agent from Uvaria accuminata (Annonaceae). J.Org.Chem., 47: 3151- 3153.

Kada, T.; Inoue, T. & Maniki, M. (1981). Environmental mutagenesis and plant biology.Environmental Desmutagens and Antimutagens. Kejowski, E.J. (ed.). Praeger, New York, pp. 134-155.

Kada, T.; Inoue, T. & Maniki, M. (1982). Environmental desmutagens and antimutagens. Environmental Mutag. and Plant Biol. Kleokowski, E.J. (ed.). Praeger, New York. pp. 113-152.

Kasuba, V.; Rozgaj, R.; Garaj, V.; Zagreb, C. (1999). Analysis if sister chromatid exchange and micronuclei in peripheral blood lymphocytes of nurses handling cytostatic drugs. J.Applied Toxicol., 19(06): 401-404.

Kaur, S.; Grover, I.S.; Singh, M.; Kaur, S. (1998). Antimutagenicity of hydrolyzable tannins from Terminalia chebula in Salmonella typhimurium. Mut.Res., 419: 169-179.

Kazuyuki, H.; Xianghong, L.; Mitsumasa, M.; Tetsuta, K.; Kiyomi, K. (1998). Identification of hydroxyhydroquinone in coffee as a generator of reactive oxygen species that break DNA single strands. Mut.Res., 419: 43-51.

Kilbey, B.; Legator, M.S.; Nichols, W.W.; Ramel, C. (1984). Handbook of mutagenicity test procedures. Amsterdam, Elsebier 2end edition.

Kirsch-Volders, M.; Tallon, I.; Tanzarella, C.; Sgura, A.; Heermione, T.; Parry, E.M.; Parry, J.M. (1996). Mitotic non-disjunction as a mechanism for in vitro aneuploidy induction by X-rays in primary human cells. Mutagen., 11: 307-313.

Leboeuf, M.; Cavé, A.; Bhaumik, P.K.; Mukherjee, B. & Mukherjee, R. (1982). Phytochem., 21: 2783.

Londershausen, M.; Leicht, W.; Lieb, F.; Moeschler, H.; Weiss, H. (1991). Molecular mode of action of annonins. Pesticide Sci., 33: 427-438.

MacGregor, J.T.; Heddle, J.A.; Hite, M.; Margolin, B.H.; Ramel, C.; Salamone, M. F. ; Tice, R. R. ; Wild, D. (1987). Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. Mut.Res., 189: 103-112.

Macleod, K. (2000). Tumor suppressor genes. Curr.Opin.Genet.Des., 10: 81-93.

MacPhee, D.G. (1998). Time-dependent mutagenesis and cancer: a new role for antimutagenesis in cancer prevention ? Mut.Res., 402(1-2): 29-39.

Matsuoka, A.; Sakamoto, H.; Hayashi, M.; Setagaya, K. (1999). A proposal for a simple way to distinguish aneugens from clastogens in the vitro micronucleus test. Mutag., 14(4): 385-389.

Mavournin, K.H.; Blakey, D.H.; Cimino, M.C.; Salamone, M.F. & Heddle, J.A. (1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow peripheral blood. A report of the U.S. environmental protection. Agency Gene-Tox program. Mut.Res., 239: 29-80.

Mayane, S.T. (1996). Beta-carotene, carotenoids and disease prevention in humans. FASEB J., 10: 690-701.

Meneghini, R. (1987). A toxicidade do Oxigênio. Ciência hoje (SBPC), 05(28): 56- 62.

Meneghini, R.(1988).Genotoxicity a active oxygen species in mammalian cells. Mut.Res., 195: 215-230.

Miele, M.; binassi, S.; Bonatti, S.; Martini, e.; Miglio, L.; Ottaggio, L.; Queirlo, P.; Sertoli, M.; Abbondandolo,A.(1998).Micronucleus analysis in peripheral Blood lymphocytes from melanoma patients treated with dacarbazine. Anticancer Res., 18: 1967-1971.

Mohan, N. & Meltz, M.L. (1994). Induction of nuclear factor after low dose Ionizing radiation involves a reactive oxygen intermediate signaling pathway. Radiat.Res., 140(1): 97-104.

Morre, D.J.; De Cabo, R.; Farley, C.; Oberlies, N.H.; MacLaughlin, J.L. (1995). Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase a ctivity of HELA and HL - 60, but not liver, plasma membranes. Life Sci., 56: 343-348.

Müller, H.J. (1927). The problem of genic modification. V. Int.Cong. Berlin, Z. Ind. Abst. Vererb. Leher., 1 (Suppl.): 224-260.

Nepomuceno, J.C.; Ferrari, I.; Spanó, M.A.; Centeno, A.J. (1997). Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of Cyprinus carpio exposed to metallic mercury. Environ. and Mol.Mutag., 30: 293-297.

Nguyen, T.; Fluss, L.; Madej, R.; Ginther, C.; Leighton, T. (1989). The distribuition of mutagenic activity in red, rose and white wines. Mut.Res., 233: 205-212

Oberlies, N.H.; Jones, J.L.; Corbett, T.H.; Fotopoulos, S.S.; MacLaughlin, J.L. (1995). Cancer Lett., 96: 55-58.

Oberlies, N.H.; Chang, C.-J.; MacLaughlin, J.L. (1997). Structure - activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins agaisnt mutidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/ Adr) cells. J.Med.Chem., 40: 2102-2106.

Oliveira, M.; Fioravanti, C . & Leite, M. (1994). A farmácia feita em casa. Globo Ciências, 33: 35-42.

Panichpol, K. & Waterman, P.G. (1978). Phytochem., 17: 1363.

Parton, J.W.; Hoffman, W.P.; Garriot, M.L. (1996). Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system. Mut.Res., 370: 65-73.

Pereira, C.A. (1992). Plantas exóticas e Intoxicação na veterinária. Editora UFG- GO.

Pollo-Zafra, C.M.; Gonzáles, C.M.; Estornell, E.; Sahpaz, S.; Cortes, D. (1996). Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. Elsevier Sci., 42(2): 253-271.

Pollo-Zafra, C.M.; Figadère, B.; Gallardo, T.; Tormo, R.J.; Cortes, D. (1998). Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action. Phytochem., 48(7): 1087-1117.

Preston, R.J.; Au, W.; Bender, M.A.; Brewen, J.G.; Carrano, A.V.; Heddle, J.A.; MacFee, A.F.; Wolff, S.; Wasson, J.S. (1981). Mammalian in vivo and in Vitro cytogenetic assays. A report of the U.S. EPA´s Gene-Tox Program. Mut.Res., 87: 143-188.

Preston, R.J. (1995). Genetic injury. Pathology of Environmental and Occupational Disease. St. Louis, Mosby - Year Book Inc. Craighead, J.E. (ed.).

Purchase, I.F.H. (1982). An appraisal of predictive tests for carcinogenecity.

Mut.Res., 99: 53-71.

Rabello-Gay, M.N.; Rodrigues, M.A.L.R.; Monteleone-Neto, R. (1991). Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese – Métodos e Critérios de Avaliação. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética.

Ramel, C.; Alekperov, U.K.; Ames, B.N.; Kada, T.& Wattenberg, L.W. (1986). Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. Mut.Res., 121: 211-223.

Ranaldi, R. ; Bassani, B. ; Villani, P. ; Lombardi, C. C. ; Tanzarella, C. ; Pacchierotti, F. (1998). Measurement and characterization of micronuclei in cultured primary lung cells of mice following inhalation exposure to benzene. Mutag.,13: 453-460.

Rauscher, R.; Edenharder, R.; Platt, K.L. (1998). In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. Mut.Res., 413: 129-142.

Rizzini, C.T.; Pereira, N.A.; Mors, W.B.(1986). Revisão das plantas brasileiras tidas como ativas contra peçonhas animais, especialmente cobras. NPPN/UFRJ.

Rupprechet, J.K.; Hui, Y-H. & McLaughlin, J.L., (1990). J.Nat.Prod., 53:237.

Salamone, M.F.& Heddle, J.A. (1983). The bone marrow micronucleus assay: rationale for a revised protocol Chemical Mutagens Principles and Methods for their Detection, 8: 11-49.

Sangwan, N.S.; Shanker, S.; Rajender, S.; Sushil, K. (1998). Plant derived products as antimutagens. Phytotherapy Res., 12: 389-399.

Santos, P.L.; Boaventura, M.A.D.; Oliveira, A.B.; Oliveira, A.B. (1992). Livro de Resumos do XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Curitiba, no169.

Santos, P.L.; Boaventura, D.A. (1994). Crassiflorina, uma acetogenina tetra-Hidrofurânica citotóxica de Annona crassiflora (araticum). Química Nova, 17(5): 387-391.

Santos, P.L.; Boaventura, M.A.D.; Sun N.J.; Cassady, M.J. & Oliveira, A.B. (1995). Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from Annona crassiflora

seeds. Elsev. Sci., 42: 705-707.

Schimid, W. (1975). The micronucleus test. Mut.Res., 31: 9-15.

Silva, E.L.M.; Roblot, F.; Mahuteau, J.; Cavé, A. (1996). Coriadienin, the first Annonaceous acetogenin with two double bonds isolated from Annona coriaceae. J.Nat.Prod.,59: 528-530.

Singer, B. (1996). DNA damage: chemistry, repair and mutagenic potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 23: 2-13.

Spandidos, D.A. & Wilkie, N.M. (1984). Tumorigenic conversion of early-passage rodente cells can be achieved with a single activated human oncogens. Cancer Cells, 2: 495-500.

Steinmetz, K.A. & Potter, J.D. (1991). Vegetables, fruits and cancer : II mechanisms. Cancer Causes Control, 2: 427-442.

Sugimura, T.; Sato, S.; Nagao, M.; Yahagi, T.; Matsushima, T.; Seino, Y.; Takeuki, M. & Kawachi, T. (1976). Overlapping of carcinogens and mutagens. Fundamentals in Cancer Prevention. Magee, P.N. et al. (eds). University of Tokyo Press, Tokyo. pp. 191-215.

Sukumaran, K. & Kuttan, R. (1995). Inhibition of tobacco-induced mutagenesis by eugenol and plant extracts. Mut.Res., 343: 25-30.

Titenko, -H.N.; Jacob, R.A.; Shang, N.; Balaraman, A.; Smith, M.T. (1998). Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. Mut.Res., 417: 104-114.

Van Der Eb, A.J.; Bernards, R.; Schrier, P.I.; Bos, J.C.; Vaessen, R.T.M.J.; Jochemsen, A.G. & Melief, C.J.M. (1984). Altered expression of cellular in adenovirus-transformed cells. Cancer Cells, 2: 501-510.

Verhagen, H.; Van Poppel, G.; Willems, M.I.; Boggards, J.J.P.; Rompelberg, C.J.M.; Van Bladeren, P.J. (1993). Cancer – prevention by natural food constituents. Ins.Food ingredients, 1/2: 22-29.

Verhagen, H.; Feron, V.J. (1994). Cancer prevention by natural food constituents - the lesons of toxicology transposed to antigenotoxicity and carcinogenicity. Proceedings of the International Conference Euro Food Tox IV "Bioactive substances in food of plant origin", Vol.2, Session 8, "Dietary Cancer Prevention", Centre for Agrotechnology and Veterinary

Sciences, Olsztyn, pp. 463-478. Koziowska, H.; Fornal, J.; Zdunczyk, Z. (Eds).

Vijg, J. (2000). Somatic mutations and aging: a re-evaluation. Mut. Res., 447(1): 117-135.

Villalobos, P.; Flores, M.A.R.; Meneses, M.A.; Tavera, L.; Balcazar, M.; Lopez, L.; Gomez, A.S. (1999). Genetic effects observed in tetrads of Tradescantia induced by radon. Mut.Res., 426: 215-219.

Yamamoto, K.I. & Kikuchi, Y. (1980). A comparation of diameters of micronuclei induced by clastogens and spindle poisons. Mut.Res., 71: 127-131.

Waters, M.D.; Brady, A.L.; Stack, H.F.& Brockman, H.E. (1990). The concepty of activity profiles of antimutagens. Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II. Kuroda, I.; Shankel, D.M. & Waters, M.D. (eds). Plenun Press, New York. pp.87-104.

Wu, X.; Skog, K.; Jägerstad, M. (1997). Trigonelline, a naturally occurring constituent of green coffee beans behind the mutagenic activity of roasted coffee? Mut.Res., 391: 171-177.

Capítulo 1

Detecção da Atividade Mutagênica da *Annona crassiflora* Mart. (araticum) pelo Teste do Micronúcleo em Camundongos.

Francinez Linhares Ferreira

Universidade Federal de Goiás.
Instituto de Ciências Biológicas.
Departamento de Biologia Geral.
Laboratório de Radiobiologia de Microrganismos e Mutagênese.

Palavras chaves: *Annona crassiflora* Mart., mutagenicidade, micronúcleo, camundongo.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o consumo de produtos naturais, incluindo o uso de extratos de plantas medicinais tem aumentado significativamente em todo o mundo. No Brasil, a situação não tem sido diferente. A imensa biodiversidade da nossa flora, estimada em 120 mil espécies, tem propiciado uma procura cada vez maior dos recursos advindos da natureza.

Sendo o cerrado a segunda maior zona vegetal do Brasil abrangendo dois milhões de km^2, correspondendo a 25% da superfície do território, é de se esperar que as espécies que compõem esta vegetação exerçam forte influência na medicina popular.

Annona crassiflora Mart., popularmente conhecida como araticum, é uma planta da família Annonaceae encontrada nos cerrados do Brasil. Esta planta contém acetogeninas com significante ação citotóxica, antitumoral, pesticida, antimicrobiana e antiparasitária (Ruprechet *et al*., 1990; Fang *et al*., 1993). Suas folhas, cascas, frutos e sementes são utilizados tradicionalmente pela população como fitoterápico com seguintes propriedades farmacológicas: tonificante, adstringente, antisifilítico, antirreumático, antidiarréico e antipediculose (Correia, 1926; Cruz, 1979).

No presente trabalho, foi avaliada a atividade mutagênica da planta *Annona crassiflora* Mart. utilizando-se o teste do micronúcleo (MN) em eritrócitos da medula óssea de camundongos *Mus musculus*. A toxicidade

dessa planta foi determinada pela Dose Letal para a metade dos animais (DL_{50}) e pela relação de eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC).

2. MATERIAL E MÉTODOS

a) **Animais**

Para realizar o teste do micronúcleo foram utilizados camundongos machos, saudáveis, da espécie *Mus musculus* out bred linhagem Swiss Webster, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG), apresentando peso corpóreo entre 30 e 45 gramas (Balança Marte) e faixa etária entre 2 e 3 meses no dia do experimento.

Tais camundongos tiveram livre acesso à água natural e ração comercial, mantendo-se acondicionados em gaiolas de plástico de tamanho 40,0 x 33,5 x 16,5 cm, forradas com serragem de madeira, trocada diariamente. O ambiente foi controlado em temperatura de $25^{o} \pm 2^{o}$ C, umidade de 60% ± 10% e com claridade luminosa diurna. Em cada gaiola foram colocados 5 (cinco) animais no máximo e, somente após 5 (cinco) dias de permanência no Laboratório de Radiobiologia de Microrganismos e Mutagênese da Universidade Federal de Goiás (UFG), e que se iniciaram as atividades experimentais.

O número de camundongos *Mus musculus* utilizado foi de:

80 (oitenta) para a avaliação da DL_{50};

75 (setenta e cinco) para o tratamento com o extrato da planta;

20 (vinte) para os controles negativos e controle positivo.

b) **Substância Testada**

Extrato bruto etanólico de folhas de araticum (obtido do Laboratório de Produtos Naturais/IQ/UFG), diluído em 75% de água destilada estéril e 25 % de etanol P.A. (diluente- etanol 25%), nas dosagens estabelecidas na TABELA I.

TABELA I - Doses e tempos de administração de *Annona crassiflora* Mart.

Tratamento	**DL_{50}** (%)	Dose (mg/kg)	**Tempos** (h)
Extrato bruto etanólico de folhas de araticum	5	10	24, 48, 72
	10	20	24, 48, 72
	25	50	24, 48, 72
	50	100	24, 48, 72
	80	160	24, 48, 72
Controle Positivo- MMC (*)	80	4,0	36
Controle Negativo- Água destilada	-	10	48
Controle Negativo- Diluente (etanol 25%)	-	10	48
Controle – Solução Aquosa de folhas de araticum	25	50	48

(*) Dose usada correspondente a 80% da DL_{50} (Salamone *et al*., 1980), dissolvida em água destilada estéril (dose única).

c) **Meios e Soluções**

- Tampão fosfato

TABELA II - Composição tampão fosfato

SOLUÇÃO A	SOLUÇÃO B
Na_2 HPO_4 . 12 H_2O.....17,9 g Água destilada .....100 ml	NaH_2PO_4 . H_2O.....34,5 g Água destilada.....500 ml

Misturar 74 ml da Solução A com 426 ml da Solução B e acrescentar 1.500 ml de água destilada. pH = 6,8.

- Corante Giemsa

TABELA III - Composição Corante Giemsa

COMPOSIÇÃO	QUANTIDADE
Solução Giemsa	9 ml
Solução tampão fosfato	100 ml
Água destilada	100 ml

Após preparação, filtrar em papel de filtro.

Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso.

2.1 Procedimentos experimentais

2.1.1 Avaliação da DL_{50} do araticum

Os camundongos foram randomicamente divididos em grupos de 10 animais para cada dose. Após pesagem e identificação de cada animal, os grupos foram tratados com extrato bruto etanólico de folhas de araticum dissolvido em 25% de etanol mais 75% de água, via intraperitoneal (i.p.), com doses de 100, 150, 250, 300, 400 e 500 mg/kg, além dos controles negativos.

A punção executada do lado esquerdo do abdome do camundongo (porção maio do intestino delgado) seguiu uma dinâmica adequada visando a não lesar órgãos e víceras e a administração do volume indicado (10 ml/Kg) através de penetração única, evitando assim, provável estresse da cobaia (Kado *et al*., 1998).

Foi observada a taxa de mortalidade nos períodos de 5, 15, 30 min., 1, 2, 4, 24, 48 até 72 horas. Ao término dos tempos estabelecidos, o número de sobreviventes foi contado e representado em gráfico, onde o eixo das abscissas corresponde às doses administradas e o das ordenadas, ao percentual de sobrevivência.

2.1.2 Avaliação da atividade mutagênica do araticum pelo teste do micronúcleo

Os camundongos foram divididos em grupos de 5 animais para cada dose e tempo. Após pesagem e identificação de cada animal, os grupos foram tratados com extrato bruto etanólico de folhas de araticum dissolvido em 25% de etanol mais 75% de água, via i.p., com doses correspondentes à 5, 10, 25, 50 e 80% da DL_{50}, anteriormente determinada. Decorridos os tempos, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical removendo-se os fêmures. Após extração femural, as epífises foram cortadas e a medula óssea lavada com 1,0 ml de soro bovino fetal em temperatura a 37^{o} C, utilizando-se seringa descartável de $1cm^3$. Com a mesma seringa, a medula foi aspirada e transferida para um tubo cônico de centrífuga. Após 5 minutos de centrifugação a 300 x g, o sobrenadante foi descartado com a ajuda de pipeta de Pasteur e o botão de células homogeneizado em 50 μl de soro fetal bovino (suspensão celular).

Para o processo de preparação laminar foi utilizado uma gota de 10 μl da suspensão celular em lâmina de vidro, limpa, seca e desengordurada, onde foi realizada a técnica convencional do esfregaço. Após secagem do esfregaço em temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em etanol P.A. por 5 minutos e depois de secas, coradas com o corante Giemsa, diluído em tampão

fosfato (pH 6,8), por 15 minutos (Schimid, 1975 e 1976). Foram realizadas 03 lâminas por animal.

A análise da freqüência de micronúcleos nos eritrócitos foi processada contando-se 1.000 eritrócitos policromáticos (EPC) por animal, enfatizando-se somente MN nos EPC. Os resultados obtidos de cada tratamento e tempo foram comparados com grupo controle usando análise estatística pelo teste t-Student.

Também, foi realizada a contagem dos eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) a fim de computar a relação EPC/ENC.

3. RESULTADOS

3.1 Dose Letal para 50% dos animais após tratamento com extrato bruto etanólico de folhas de araticum

O resultado obtido para DL_{50} após tratamento com extrato de *Annona crassiflora* é mostrado na FIGURA I. Pela figura pode-se observar que na dose de 100 mg/kg não foi constatado nenhuma morte. Verificou-se mortalidade a partir da dose de 150 mg/kg, sendo que na dose de 400 mg/kg já foram observados 100% de óbitos.

A DL_{50} foi estimada pelo gráfico e o valor obtido foi de 205mg/kg, entretanto o valor utilizado foi de 200 mg/kg (FIGURA I).

O tempo dos óbitos, a dose e o número de animais encontram-se relacionados na TABELA IV. Pela tabela pode-se observar que a maioria das mortes (32) ocorreu no tempo entre 0 (Zero) e 24 horas e que após esse tempo, somente 6 camundongos foram a óbito.

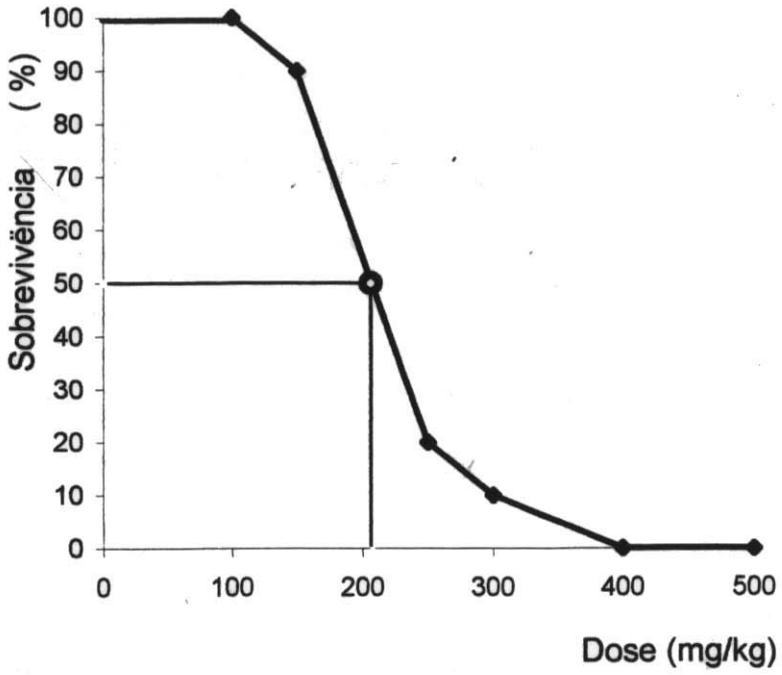

FIGURA I- Sobrevivência dos camundongos *Mus musculus* em função da dose de araticum.

TABELA IV- Sobrevivência de camundongos *Mus musculus* em função da dose de araticum.

Grupo	Nº Animais	Dose mg/kg	Morte	Sobre-viventes	% Morte	Óbito até 4h	Óbito até 24h	Óbito até 48h	Óbito até 72 h
C (*)	10	0	0	10	0	-	-	-	-
C (**)	10	0	0	10	0	-	-	-	-
1	10	100	0	10	0	-	-	-	-
2	10	150	1	9	10	-	-	-	1
3	10	250	8	2	80	2	4	1	1
4	10	300	9	1	90	1	6	2	-
5	10	400	10	0	100	4	6	-	-
6	10	500	10	0	100	6	3	-	1
Total	80	-	38	42	-	13	19	3	3

(*) Controle Negativo – Água destilada estéril.

(**) Controle Negativo – Diluente (etanol 25%).

3.2 Avaliação da citoxicidade do extrato bruto etanólico de folhas de araticum

Os camundongos tratados com extrato de folhas apresentaram os seguintes sintomas; espasmos abdominais contínuos, fezes amolecidas, diminuição da diurese e do apetite. Após 24 horas, todos os camundongos apresentaram aumento na temperatura corpórea e queda de peso. Tais sintomas foram observados no controle referente à solução aquosa da planta (50 mg/Kg). Entretanto, esses não foram constatados nos controles negativos referentes à água destilada estéril e ao diluente (etanol 25%).

Os resultados obtidos da relação EPC/ENC na medula óssea de camundongos tratados com diferentes dosagens do extrato da planta são mostrados na TABELA V.

Pela tabela pôde-se observar que nas doses 10 mg/kg e 20 mg/kg, em todos os tempos analisados, a relação EPC/ENC manteve-se aproximadamente 1:1. A relação EPC/ENC para o tempo pós-tratamento de 24 horas na dose de 50 mg/kg foi de 0,61 e na dose de 100 mg/kg foi de 0,46 e no tempo de 48 horas foi de 0,48 e 0,47. Para as doses citadas acima, no tempo de 72 horas, a relação EPC/ENC foi de 1,19 e 1,17.

Os animais que foram submetidos à administração de 160 mg/kg apresentaram uma relação EPC/ENC de 0,49, 0,45 e 0,46, nos tempos 24h, 48h e 72 horas, respectivamente.

Os resultados obtidos dos controles, após 48 horas do tratamento, apresentaram relação EPC/ENC de 0,97 para a água destilada estéril, 1,06 para o diluente (etanol 25%) e 0,52 para o extrato aquoso da planta (50 mg/kg). No controle positivo (MMC), a relação observada foi de 0,32, após 36 horas da administração.

TABELA V - Freqüência de micronúcleos em EPC/ENC após tratamento com extrato de araticum em diferentes doses e tempos.

Dose (mg/kg) EPC/ ENC	Tempo (horas)	Nº de Animais	Dados Individuais EPCMN/1000	X ± S	
	24	05	03-04-02-02-02	2,6 ± 0,89	0,83
10	48	05	02-02-02-03-01	2,0 ± 0,71	0,93
	72	05	02-01-01-02-02	1,6 ± 0,55	0,87
	24	05	02-02-03-03-02	2,4 ± 0,55	0,97
20	48	05	02-02-01-03-02	2,0 ± 0,71	0,85
	72	05	02-03-02-02-01	2,0 ± 0,71	0,98
	24	05	05-05-03-04-02	3,8 ± 1,30	0,61
50	48	05	03-02-02-01-01	1,8 ± 0,84	0,48
	72	05	04-03-01-02-02	2,4 ± 1,14	1,19
	24	05	02-01-03-04-02	2,4 ± 1,14	0,46
100	48	05	04-01-02-01-02	2,0 ± 1,22	0,47
	72	05	03-02-03-02-01	2,2 ± 0,84	1,17
	24	05	03-03-02-03-01	2,4 ± 1,79	0,49
160	48	05	03-01-03-01-02	2,0 ± 1,00	0,45
	72	05	02-02-02-01-01	1,6 ± 0,55	0,46
C(-)*	48	05	01-02-02-01-03	1,8 ± 0,84	0,97
C(-)**	48	05	02-01-03-04-02	2,4 ± 0,55	1,06
C ***	48	05	03-02-01-02-02	2,0 ± 0,71	0,52
C(+)•	36	05	13-18-24-25-19	19,8 ± 4,87	0,32

* Água destilada ** Diluente (etanol 25%)

*** Solução aquosa do extrato vegetal (50 mg/kg) • MMC-(4,0 mg/kg).

3.3 Avaliação da atividade mutagênica do extrato bruto etanólico de folhas de araticum

O efeito mutagênico do extrato de araticum em camundongos *Mus musculus* foi avaliado mediante a freqüência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN).

Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA V, na qual pôde observar que para todas as doses administradas, 10, 20, 50, 100 e 160 mg/kg e tempos pós-tratamento de 24h, 48h e 72 horas, não foi constatado aumento na indução da freqüência de MN em relação ao controle negativo (diluente-etanol 25%). A média máxima, 3,8 MN, foi observada no tempo de 24 horas após tratamento com a dose de 50 mg/kg, enquanto que a menor média de 1,6 é relativa à dose de 160 mg/kg após 72 horas do tratamento.

Os controles (diluente-etanol 25%) e solução aquosa do extrato de araticum (50 mg/kg), também não apresentaram diferenças em relação ao controle negativo para água destilada estéril. Para o controle positivo foi observada uma freqüência de 19,8 MN.

4. DISCUSSÃO

4.1 Justificativa

Para a análise tóxica e genotóxica do extrato de *Annona crassiflora* Mart.(araticum) foi utilizada solução preparada no momento do uso, composta de extrato bruto etanólico de folhas de araticum diluída em 25% de etanol P.A. e 75% de água destilada estéril. A utilização do etanol foi necessária para a perfeita homogeneização da solução deste extrato vegetal, que sendo rico em clorofila é pouco solúvel em água (Stryer, 1987).

A abordagem experimental utilizada em nossa investigação foi realizada através do teste do micronúcleo que é um ensaio genético, o qual permite a detecção de atividade mutagênica, analisando a freqüência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos da medula óssea. Esse teste apresenta grande sensibilidade e facilidade na obtenção de um número amplo de células com padrão morfológico claro e definido, onde os MN são facilmente identificados (Rabello-Gay *et al*., 1991; Hayashi *et al*., 1994).

Na avaliação da atividade mutagênica de agentes físicos, químicos e biológicos, os testes com animais de laboratório, especificamente roedores, oferecem grandes vantagens. A primeira, sem dúvida, é a capacidade de metabolização que o animal possui, que nunca pode ser totalmente reproduzida n um sistema *in vitro.* Nos ensaios *in vivo*, pode-se utilizar as condições de exposição a que o homem está sujeito, seja por via de

administração, duração do tratamento (agudo ou crônico) ou condições nutricionais. Outro aspecto importante é a especificidade do órgão-alvo quanto à atividade mutagênica da substância em estudo. No teste *in vivo* um animal pode ser utilizado simultaneamente para vários testes, dando informação sobre diferentes tipos de danos genéticos e condições de avaliação de sinergismos ou antagonismos com diferentes dietas; enfim, toda uma gama de situações que reproduzam, o melhor possível, as condições da exposição humana (Connor *et al.*, 1979; Rabello-Gay *et al*., 1991; Sena, 1997).

Conforme Preston e colaboradores (1981), a sexualidade apresenta-se diferenciada com relação à freqüência de MN, sendo que no macho a freqüência de micronúcleos é maior que na fêmea. Em contrapartida, de acordo com Parton e colaboradores (1996), esta característica não foi confirmada, ou seja, não houve diferença significativa na indução da freqüência de micronúcleos para os dois sexos.

O presente trabalho foi realizado utilizando-se o modelo experimental camundongos machos *Mus musculus out bred* linhagem Swiss Webster, por se tratarem de animais de pequeno porte, fácil manuseio, reprodução rápida e metabolismo semelhante ao do homem, além das explanações descritas anteriormente.

Do ponto de vista técnico, a administração via intraperitoneal foi escolhida pela sua simplicidade e por maximizar a exposição da medula óssea aos agentes químicos (Preston *et al*., 1981). Entretanto, um outro ponto que deva ser levado em consideração é a detoxificação metabólica de muitos mutagênicos durante a passagem pelo trato gastro-intestinal que podem ser

inativados antes de atingirem as células alvo (De Flora, 1998).

A estratégia escolhida no presente estudo para a detecção de aberrações cromossômicas em células provenientes da medula óssea de camundongos, realizada nos tempos de 24, 48 e 72 horas após tratamento único, é concordante com MacGregor e colaboradores (1987), que recomendaram três coletas obtidas entre 20 e 72 horas após o tratamento. É sabido que, durante um período de 10 a 24 horas, os eritrócitos jovens são policromáticos (EP) e computando os micronúcleos apenas nesse tipo de célula pode-se indicar que esses se formaram na mitose anterior na presença do agente mutagênico (Heddle, 1973; Schmid, 1975).

Ainda neste contexto, o presente estudo restringiu-se à análise da freqüência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos por considerar que, quando a proliferação normal das células da medula está prejudicada, esta é invadida por sangue periférico e a relação 1:1 é distorcida em favor das células vermelhas maduras (Rabello-Gay *et al*., 1991).

4.2 Análise da atividade tóxica e mutagênica do araticum em camundongos

As primeiras evidências experimentais das Annonaceas, foram obtidas desde o início da década de 80 (Jolad *et al*., 1982). Posteriormente, uma série de trabalhos experimentais, utilizando protocolos *in vitro* e *in vivo*, confirmou

a atividade citotóxica desta família, inclusive do gênero *Annona crassiflora* Mart. (Santos *et al*., 1992, 1994 e 1995; Morre *et al*., 1995; Oberlies *et al*., 1995, 1997). No presente trabalho, também foi confirmada pela relação EPC/ENC.

Pelos resultados obtidos (TABELA V) pôde-se observar que para as dosagens de 10mg/Kg e 20mg/Kg, em todos os tempos pós-tratados, a relação EPC/ENC permaneceu inalterado. Este fato sugeriu que para essas doses utilizadas não foi verificada a citotoxicidade medular. Já nas doses de 50 mg/Kg e 100 mg/Kg no tempo de 24 horas esta relação foi de 0,61 e 0,46 e no tempo de 48 horas foi de 0,48 e 0,47. Para ambas doses no tempo de 72 horas, a relação de EPC/ENC retornou ao nível normal, provavelmente, devido à eliminação do extrato. Para os camundongos tratados com a dose de 160 mg/Kg, a relação obtida foi de 0,49, 0,45 e 0,46, respectivamente para os tempos de 24, 48 e 72 horas pós-administração. Isto demonstrou que para a dose mais elevada a ação citotóxica foi mais evidenciada por não ter sido verificado o retorno da relação EPC/ENC ao nível normal no tempo de 72 horas. Este fato indicou que em dose mais elevada, possivelmente, ocorreu inibição da divisão e/ou da maturação das células precursoras dos eritrócitos, prejudicando, desta maneira, a renovação dos eritrócitos polcromáticos (Zetterberg *et al*., 1997). Assim, pôde-e concluir que a citotoxicidade do araticum foi dependente da dose. De modo geral, quanto maior a dose, maior

foi ação citotóxica. O retorno da relação EPC/ENC ao nível normal para as dose elevadas pôde ser atribuído à eliminação do extrato, recuperando, dessa maneira, a ativação da eritropoiese. Entretanto, na dose mais elevada (160 mg/Kg) a normalidade dessa taxa não foi observada no tempo de 72 horas, provavelmente, em decorrência da acentuada atividade tóxica da planta.

No presente trabalho, a DL_{50}, foi de 200 mg/Kg e comparando esta dose com a do controle positivo – mitomicina C (5 mg/Kg) (Salamone *et al*., 1980), pôde-se inferir que a toxicidade da planta, baseada na DL_{50} é da ordem de 40 vezes inferior em relação à do controle positivo (MMC), entretanto, por se tratar de um extrato bruto, o valor encontrado indicou uma ação citotóxica considerável.

Assim, os resultados obtidos na relação EPC/ENC e DL_{50} forneceram indícios de que o extrato bruto de folhas de araticum exibiu atividade tóxica.
da solução aquosa do extrato e o do extrato diluído em 25% de etanol indicaram que o diluente (etanol 25%), utilizado no presente trabalho, não interferiu na atividade citotóxica da planta em estudo.

Pelos resultados obtidos da mutagenicidade da *Annona crassiflora* pelo teste do micronúcleo, foram observados que os eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) apresentaram aspectos clássicos dos micronúcleos em células de mamíferos (Heddle & Carrano, 1977); não foram constatados MN unidos ou aderidos ao núcleo conforme os visualizados por Hooftaman & Raat (1982). Os MN detectados foram de tamanho regular e semelhante aos provocados pelo controle positivo – Mitomicina C.

Quanto à freqüência de micronúcleos induzida, avaliada somente em EPC, observou-se que para todas as doses e tempos pós-tratados, não foi

verificado um aumento estatisticamente significativo ($p>0,01$) de MN em comparação com o grupo controle (TABELA V). Em relação ao tempo de administração, a maior freqüência de EPCMN ocorreu no tempo de 24 horas, entretanto, não foi constatada uma diferença significativa ($p>0,01$) em relação aos outros tempos. Nos tempos de 48 e 72 horas, a diminuição da freqüência de MN, possivelmente, pôde ser atribuída à eliminação do extrato e/ou da inibição da divisão ou da maturação das células precursoras dos eritrócitos.

Os resultados do presente estudo mostraram que o extrato de folhas de araticum não induziu o aumento na freqüência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos de camundongos. Desta maneira, pôde-se concluir que a *Annona crassiflora* Mart. não apresentou atividade mutagênica nas condições experimentais descritas.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo nos permitiram concluir que o extrato de folhas de *Annona crassiflora* Mart. (araticum) apresentou atividade tóxica e não mutagênica.

A ação citotóxica foi verificada pela relação EPC/ENC e a toxicidade pela DL_{50} (200 mg/kg).

A atividade não mutagênica foi inferida pela não observação de aumento na freqüência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos da medula óssea dos camundongos em relação ao grupo controle.

RESUMO

O "araticum" (*Annona crassiflora* Mart.) é uma planta tipicamente brasileira encontrada nos cerrados do Brasil. Esta planta contém acetogeninas que apresentam propriedades citotóxica, antitumoral, antiparasitária e antimicrobiana. Suas folhas, cascas, frutos e sementes são utilizadas pela população para tratar várias doenças como diarréia, reumatismo e sífilis. No presente estudo, foi avaliada a atividade mutagênica do extrato bruto etanólico de folhas de araticum pelo teste do micronúcleo na medula óssea de camundongos. Doses de 10 mg/kg (5% da DL_{50}), 20 mg/kg (10% da DL_{50}), 50 mg/kg (25% da DL_{50}), 100 mg/kg (50% da DL_{50}) e 160 mg/kg (80% da DL_{50}) foram aplicadas, intraperitonealmente, em camundongos *Mus musculus*, em grupos de 5 animais para cada dose. As preparações citológicas foram realizadas em conformidade com a metodologia de Heddle. Para todas as doses aplicadas, a freqüência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) foi avaliada nos tempos de 24, 48 e 72 h. A citotoxicidade foi avaliada pela relação entre a freqüência de eritrócitos policromáticos e normocromáticos (EPC/ENC). Os resultados obtidos mostraram que o extrato bruto etanólico de folhas, para todas as doses testadas, não aumentou significativamente ($p>0,01$) a freqüência de eritrócitos policromáticos micronucleados. Dessa maneira, pôde-se concluir que o fitorápico araticum não exibiu atividade mutagênica. Entretanto, a atividade tóxica foi verificada pela DL_{50} e pela relação EPC/ENC.

ABSTRACT

The “araticum” (*Annona crassiflora* Mart.) is a typical brazilian plant found in cerrados of Brazil. This plant contains acetogenins that presents cytotoxic, antitumorigenic, antiparasitic and antimicrobial properties. Its leaves, barks, fruits and seeds are used by the population as therapeutic medicine to treat several diseases as diarrhoea, rheumatism and syphilis. In the present study we have evaluated the mutagenic activity of the crude ethanolic extract of leaves of araticum though quantification of micronuclei induced in mice bone marrow. Doses of 10 mg/kg (5% of LD_{50}), 20 mg/kg (10% of LD_{50}), 50 mg/kg (25% of LD_{50}), 100 mg/kg (50% of LD_{50}) and 160 mg/kg (80% of LD_{50}) were applied i.p. in mice *Mus musculus*, in groups of 5 (five) animals for each dose. The cytological preparations were made according to Heddle`s methodology. For all the applied doses, frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) was evaluated after 24, 48 and 72 h of treatment. The cytotoxicity was evaluated by ratio the between numbers of polychromatic and normochromatic erythrocytes (PCE/NCE). Ours results indicated an absence of significantly increased of micronuclei for all the doses tested ($p>0,01$). Thus, we concluded that the phytoterapic araticum did not present mutagenic activity under our experimental conditions. However, the toxic activity was observed upon analysis of LD_{50} and PCE/NCE ratio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Connor, T.H.; Meyne, J.; Molina, L.; Legator, M.S.(1979). A combined testing protocol approach for mutagenicity testing. **Mut.Res**., 64: 19-26.

Correia, M.Pio (1926). *Dicionário das plantas úteis e espécies exóticas*. Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro.

Cruz, G.L. (1979). *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Ed. Civilização Brasileira S.A., p.63-67.

De Flora, S. (1998). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mut.Res**., 402(1-2): 151-158.

Fang, X.P.; Rieser, M.J.; Gu, Z.M.; Zhao, G.X.; .; McLaughlin, J.L. (1993). Annonaceous acetogenins: an updated review. **Phytochem. Anal**., 4: 27-67.

Fang, X.P. ; Rong, S.; Gu, Z.M. ; Rieser, M.J. ; Hui, Y.H. ; McLaughlin, J.L. (1993). Structural revisions of some non - adjacent bis - tetrahydrofuran Annonaceous acetogenins. **J.Nat.Prod**., 56: 1095-1100.

Hayashi, M.; Tice, M.; MacGregor, J.T.; Anderson, D.; Blakey, D.H.; Kirsh-Volders, M.; Oleson Jr., F.B.; Pacchierotti, F.; Ronagna, F.; Shimada, H.; Sutou, S. ; Vannier, B. (1994). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleous assay. **Mut.Res**., 312: 293-304.

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

Heddle, J.A. & Carrano, A.V. (1977). The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by γ-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. **Mut.Res**., 44: 63-69.

Hooftaman, R.N. & Raat, W.K. (1982). Induction of nuclear anomalies micronuclei in the peripheral erythrocytes of the easten *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mut.Res**., 104: 147-152.

Jolad, S.D., Hoffmann, J.J.; Schram, K.H.; Cole, J.R. (1982). Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **J.Org.Chem**., 47: 3151- 3153.

Kado, N.Y.; Kuzmicky, P.A.; Piña, L.G.; Muntaz, M.M. (1998). Genotoxicity testing of methyl tertiary - butyl ether (MTBE) in the *Salmonella* microsuspension assay and mouse bone marrow micronucleus test. **Mut.Res**., 412: 131-138.

MacGregor, J.T.; Heddle, J.A.; Hite, M.; Margolin, B.H.; Ramel, C.; Salamone, M.F. ; Tice, R.R. ; Wild, D. (1987). Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mut.Res**., 189: 103-112.

Morre, D.J. ; De Cabo, R. ; Farley, C. ; Oberlies, N.H. ; MacLaughlin, J.L. (1995). Mode of action of bullatacin, a potent antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase activity of HELA and HL-60, but not liver, plasma membranes. **Life Sci**., 56: 343-348.

Oberlies, N.H.; Jones, J.L.; Corbett, T.H.; Fotopoulos, S.S.; MacLaughlin, J.L. (1995). **Cancer Lett**., 96: 55-58.

Oberlies, N.H. ; Chang, C.-J. ; MacLaughlin, J.L. (1997). Structure - activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins agaisnt multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells. **J.Med.Chem**., 40: 2102-2106

Preston, R.J.; Au, W.; Bender, M.A.; Brewen, J.G.; Carrano, A.V.; Heddle, J.A.; MacFee, A.F.; Wolff, S.; Wasson, J.S. (1981). Mammalian *in vivo* and *in vitro* cytogenetic assays. A report of the U.S. EPA´s Gene - Tox Program. **Mut.Res**., 87: 143-188.

Rabello - Gay, M.N. ; Rodrigues, M.A.L.R. ; Monteleone - Neto, R. (1991). *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese – Métodos e Critérios de Avaliação*. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética.

Rupprechet, J.K.; Hui, Y-H. & McLaughlin, J.L., (1990). **J.Nat.Prod**., 53:237.

Salamone, M.F. & Heddle, J.A.; Stuart, E.; Katz, M. (1980). Studies on 3 models agents, Mitomycin C, Cyclophosphamide an Dimethylbenzanthracene. **Mut.Res**., 74: 234-356.

Santos, P.L.; Boaventura, M.A.D.; Oliveira, A.B.; Oliveira, A.B. (1992). *Livro de Resumos do XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, Curitiba, número 169.

Santos, P.L.; Boaventura, D.A. (1994). Crassiflorina, uma acetogenina tetra-

hidrofurânica citotóxica de *Annona crassiflora* (araticum). **Química Nova**, 17(5): 387-391.

Santos, P.L. ; Boaventura, M.A.D. ; Sun N.J. ; Cassady, M.J. & Oliveira, A.B. (1995). Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds. **Elsev. Sci**., 42: 705-707.

Schimid, W. (1975). The micronucleus test. **Mut.Res**., 31: 9-15.

Schimid, W. (1976). The micronucleus test or cytogenetic analysis. *Principles and Mehtods for their Detection*. Hollaender, A. (ed.) Plenun, New York, pp.31-43.

Stryer, L. (1987). *Bioquímica*. Standford University. Guanabara Koogan, pp. 429.

Zetterberg, L.A. ; Grawé, J. ; Zetterberg, G. (1997). Eryrthropoiesis and the induction of micronuclei in mouse spleen determined by flow cytometry. Mut.Res., 394: 17-28.

Capítulo 2

Atividade Antimutagênica da *Annona crassiflora* Mart. (Araticum) pelo Teste do Micronúcleo em Camundongos.

Francinez Linhares Ferreira

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Geral
Laboratório de Radiobiologia de Microrganismos e Mutagênese.

Palavras chaves: *Annona crassiflora* Mart., antimutagenicidade, micronúcleos, camundongos.

1. INTRODUÇÃO

Um grande número de componentes naturais tem apresentado, em sistemas de ensaio *in vitro* e *in vivo*, importantes efeitos moduladores sobre as conseqüências da exposição a mutágenos e carcinógenos. Muitos desses compostos são constituintes naturais da dieta do homem (Wattenberg, 1983; Ramel *et al*., 1986; Verhagen *et al*., 1993 e 1994; Bronzetti, 1994; Draga *et al*., 1998), encontrados em frutas e vegetais, e têm sido considerados como agentes antimutagênicos e anticarcinogênicos (Steinmetz & Potter, 1991; Bronzetti *et al*., 1996; Chernomorsky *et al*., 1997).

Annona crassiflora Mart., popularmente conhecida como araticum, é uma planta da família Annonaceae encontrada nos cerrados do Brasil (Naves, 1999). Esta planta contém acetogeninas com significante ação citotóxica, antitumoral, pesticida, antimicrobiana e antiparasitária (Rupprechet *et al*., 1990; Fang *et al*., 1993; Santos *et al*., 1994 e 1995) e outras substâncias biologicamente ativas de grande valor medicinal e nutricional (Kanasawud & Crouzet, 1990; Santos *et al*., 1992; Pollo-Zafra *et al*., 1998). Suas folhas, cascas, frutos e sementes são utilizados tradicionalmente como fitoterápico no tratamento de várias doenças (Correia, 1926; Cruz, 1979; Almeida *et al*., 1998).

No presente trabalho foi avaliada a atividade antimutagênica da planta *Annona crassiflora* Mart. utilizando-se o teste do micronúcleo (MN) em eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos *Mus musculus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

a) Animais

Para a avaliação da atividade antimutagênica do extrato de araticum pelo teste do micronúcleo foram utilizados camundongos machos, saudáveis, da espécie *Mus musculus out bred* linhagem Swiss Webster, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG), apresentando peso corpóreo entre 30 e 45 gramas (Balança Marte) e faixa etária entre 2 e 3 meses no dia do experimento.

Os camundongos tiveram livre acesso à água natural e ração comercial, mantendo-se acondicionados em gaiolas de plástico de tamanho 40,0 x 33,5 x 16,5 cm, forradas com serragem de madeira, trocada diariamente. O ambiente foi controlado em temperatura de $25^{o} \pm 2^{o}$ C e com claridade luminosidade diurna. Em cada gaiola foram colocados 5 (cinco) animais e somente após 5 (cinco) dias de permanência no Laboratório de Radiobiologia de Microrganismos e Mutagênese da UFG é que se iniciaram as atividades experimentais.

O número de camundongos *Mus musculus* utilizado foi de:

- 15 (quinze) para os controles negativos e controle positivo.
- 25 (vinte e cinco) para o tratamento (extrato de araticum + mitomicina C).

b) Substância Testada

Extrato bruto etanólico de folhas de *Annona crassiflora* Mart. (obtido do Laboratório de Produtos Naturais/IQ/UFG), diluído em 75% de água destilada estéril e 25 % de etanol P.A. nas dosagens estabelecidas na TABELA I.

TABELA I - Doses e tempos de administração de *Annona crassiflora* Mart.

Tratamento	Doses			Tempos
	Extrato	+	MMC	
Extrato de araticum + Mitomicina C	10mg/kg (5% da DL50)	+	4,0mg/kg	36
	20mg/kg (10% da DL50)	+	4,0mg/kg	36
	50mg/kg (25% da DL50)	+	4,0mg/kg	36
	100mg/kg (50% da DL50)	+	4,0mg/kg	36
	160mg/kg (80% da DL50)	+	4,0mg/kg	36
Controle Positivo – MMC(*)	4,0 mg/kg			36
Controle Negativo- Água destilada	10 ml/kg			48

(*) Dose usada correspondente a 80% da DL_{50} (Salamone *et al*., 1980), dissolvida em água destilada estéril (dose única).

c) Meios e Soluções

- Tampão fosfato

TABELA II- Composição tampão fosfato

SOLUÇÃO A	SOLUÇÃO B
Na2 HPO4 . 12 H2O.....17,9 g Água destilada .....100 ml	NaH2PO4 . H2O .....34,5 g Água destilada.....500 ml

Misturar 74 ml da Solução A com 426 ml da Solução B e acrescentar 1.500 ml de água destilada. pH = 6,8.

- Corante Giemsa

TABELA III - Composição corante Giemsa

COMPOSIÇÃO	QUANTIDADE
Solução Giemsa	9 ml
Solução tampão fosfato	100 ml
Água destilada	100 ml

Após preparação, filtrar em papel de filtro
Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso.

2.1 Procedimentos experimentais

2.1.1 Avaliação da antimutagenicidade do extrato de aqraticum pelo teste do micronúcleo

Os camundongos foram randomicamente divididos em grupos de 5 animais para cada dose. Após pesagem e identificação de cada animal, os grupos foram tratados, via intraperitoneal, com doses de 10 mg/kg, 20mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg e 160 mg/kg do extrato bruto etanólico de folhas de araticum concomitantemente com Mitomicina C (4,0 mg/kg), além dos controles positivo e negativos.

Decorridos os tempos de administração, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical removendo-se os fêmures.

Após extração femural, as epífises foram cortadas e a medula óssea lavada com 1,0 ml de soro bovino fetal em temperatura a 37^{o} C, utilizando-se seringa descartável de 1 cm^3. Com a mesma, a medula foi aspirada e transferida para um tubo de centrífuga. Após 5 minutos de centrifugação a 300 x g, o sobrenadante foi descartado com a ajuda de pipeta de Pasteur e o botão de células homogeneizado em 50 μl de soro fetal bovino (suspensão celular).

Para a preparação da lâmina foi utilizada uma gota de 10 μl da suspensão celular em lâmina de vidro, limpa, seca e desengordurada, onde foi realizado a técnica convencional do esfregaço. Após secagem do esfregaço

em temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em etanol P.A. por 5 minutos e depois de secas, coradas com o corante Giemsa, diluído em tampão fosfato (pH=6,8), por 15 minutos (Schimid, 1975). Foram realizadas 03 lâminas por animal.

A análise da freqüência de micronúcleos nos eritrócitos foi processada contando-se 1.000 eritrócitos policromáticos (EPC) por animal, enfatizando-se somente MN nos EPC. Os resultados obtidos do tratamento simultâneo (co-tratamento) de extrato da planta e MMC foram comparados com grupo controle positivo (MMC) pelo teste t-Student.

Também, foi realizada a contagem dos eritrócitos normocromáticos a fim de computar a relação EPC/ENC.

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação da atividade antimutagênica do araticum em camundongos

O estudo da ação antimutagênica do extrato de araticum foi avaliado mediante co-tratamento (extrato de folhas e MMC) e análise da freqüência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) provenientes da medula óssea de camundongos *Mus musculus*.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela IV, na qual pôde-se observar que para a dose de 10 mg/kg do extrato vegetal + MMC (4,0 mg/kg), a freqüência EPCMN foi de 17,4. Foi observado um decréscimo da freqüência de MN nas dosagens de (20 mg/kg + MMC), (50 mg/kg + MMC) e (100 mg/kg + MMC), que foram: 9,6, 8,6 e 2,2, respectivamente. Devido à baixa freqüência de eritrócitos policromáticos apresentados na dosagem de (160 mg/kg + MMC), não foi possível computá-los e conseqüentemente não foi estabelecida a freqüência de EPCMN.

A média obtida de micronúcleos no controle positivo (MMC) foi de 19,8 e para os controles negativos observaram-se os seguintes valores: 1,8 para a água destilada estéril e 2,4 para o diluente (etanol 25%).

TABELA IV- Freqüência de micronúcleos em EPC e a relação EPC/ENC após tratamento simultâneo do extrato de araticum e mitomicina C.

Tratamento Extrato + MMC (mg/kg)	Tempo (hora)	n	Dados individuais EPCMN/1000	$\bar{x} \pm DP$	EPC/ENC
10 (5% DL50) + 4,0	36	05	15-14-17-22-19	17,4 ± 3,2	0,33
20 (10% DL50) +4,0	36	05	10-08-07-11-12	9,6 ± 2,07	0,48
50 (25% DL50) +4,0	36	05	09-11-08-09-06	8,6 ± 1,82	0,26
100 (50%DL50)+4,0	36	05	03-01-01-04-02	2,2 ± 1,30	0,13
C(-)*	48	05	01-02-02-01-03	1,8 ± 0,84	0,97
C(-)**	48	05	02-01-03-04-02	2,4± 0,55	1,06
C(+)•	36	05	13-18-24-25-19	19,8 ± 4,87	0,32

C(-)* - Controle negativo (água destilada estéril).
C(-)**- Controle negativo (diluente - etanol 25%).
C(+)• - Controle positivo (MMC – 4,0 mg/kg).
MMC- 80% da DL50 (4,0 mg/kg).

4. DISCUSSÃO

4.1 Justificativa

Na literatura já foram relatadas que várias espécies de Annonaceae do gênero *Annona,* contêm acetogeninas com significante ação citotóxica, antitumoral, pesticida, antimicrobiana e antiparasitária (Ruprechet *et al*., 1990; Fang *et al*., 1993, Pollo-Zafra *et al*., 1998). Recentemente, uma nova acetogenina (crassiflorina) foi isolada do extrato etanólico de sementes de *Annona crassiflora* e demonstrou, *in vitro*, significante atividade antitumoral contra linhagens de células humanas quando comparada com adriamicina, um agente conhecidamente antineoplásico (Santos *et al.*, 1995).

Considerando as atividades biológicas apresentadas, foi proposta no presente trabalho uma avaliação do possível efeito protetor do araticum contra às ações lesivas da mitomicina C (MMC), que é um agente alquilante bifuncional conhecidamente clastogênico de ação direta (Rompelberg *et al*., 1995).

Na avaliação da atividade antimutagênica do extrato de *Annona crassiflora* Mart. (araticum) a solução etanólica do extrato utilizada foi preparada no momento do uso. A utilização do etanol foi necessária para a perfeita homogeneização dessa solução que, sendo rica em clorofila, é pouco solúvel em água (Stryer, 1987).

O co-tratamento foi metodologia escolhida por possibilitar investigar reações que ocorrem preferencialmente a nível extracelular,entre o modulador

e o mutagênico (Kada *et al*., 1982; De Flora, 1998). O tempo pós-tratamento para a avaliação de freqüência de MN foi de 36 horas, no qual a MMC apresenta maior atividade mutagênica (Salamone *et al*., 1980).

No presente estudo, restringiu-se somente à análise da freqüência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos por considerar que vários compostos podem alterar a proliferação normal das células da medula e a relação de eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) é distorcida em favor dos ENC (Rabello-Gay *et al*., 1991).

4.2 Análise da atividade antimutagênica do araticum pelo teste do micronúcleo em camundongos

O tratamento simultâneo de MMC (4,0 mg/kg) e extrato de araticum (10 mg/kg) não causou uma proteção contra as ações lesivas da MMC ($p>0,01$). Nos demais co-tratamentos com 20 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg do extrato, constatou-se efeito significativo de proteção ($p<0,01$) pela diminuição da indução na freqüência de MN. A impossibilidade de se determinar a freqüência de EPCMN na medula óssea dos camundongos tratados com dose de 160 mg/kg é conseqüência da hipocelularidade de EPC em relação aos ENC. Este fato, possivelmente, pode ser atribuído a ação tóxica do tratamento simultâneo do extrato de folhas de araticum com MMC, prejudicando a divisão celular e/ou a maturação da hemopoese na medula,

promovendo, dessa maneira, a invasão medular por células normocromáticas provenientes do sangue periférico (Rabello-Gay *et al*., 1991; Zetterberg & Zetterbeg, 1997).

No presente trabalho foi verificado que o extrato do araticum protegeu contra às ações lesivas da MMC. Dessa maneira, este desempenhou um papel modulador na atenuação da mutagênese. Entretanto, pelas condições experimentais não foi possível elucidar o mecanismo de atuação desse extrato, mas como a MMC é um agente clastogênico de ação direta e já se conhece da literatura que o co-tratamento permite investigar as possíveis reações que ocorrem a nível extracelular, pôde-se inferir que o extrato de araticum tenha pelo menos uma participação extracelular na modulação da mutagênese, agindo como um desmutagênico.

5. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi observado que o extrato de araticum foi capaz de atenuar a ação clastogênica da Mitomicina C verificada pela diminuição na indução da freqüência de eritrócitos policromáticos micronucleados.

Dessa maneira, pôde-se concluir que o extrato de araticum exerceu atividade antimutagênica.

RESUMO

Annona crassiflora Mart. (araticum) é uma planta tipicamente brasileira encontrada nos cerrados do Brasil. Esta planta contém acetogeninas que apresentam propriedades citotóxica, antitumoral, antiparasitária e antimicrobiana. Suas folhas, frutos e sementes são utilizadas pela população como remédio para tratar diversas doenças como diarréia, reumatismo e sífilis. No presente estudo, foi avaliada a atividade antimutagênica do extrato bruto etanólico de folhas de araticum, na medula óssea de camundongos pelo teste do micronúcleo. Doses do extrato de folhas (10 mg/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg e 160 mg/kg) e MMC (4,0 mg/kg) foram co-administradas, via intraperitoneal, em camundongos *Mus musculus*, em grupos de 5 (cinco) animais para cada dose. As preparações citológicas foram realizadas conforme metodologia de Heddle. Para todas as doses aplicadas, a freqüência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) foi analisada 36 horas após tratamento. Os resultados obtidos mostraram que o extrato de folhas nas doses de 20 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg inibiram significantemente ($P<0,01$) a freqüência de micronúcleos (MN) induzidos pela MMC. Dessa forma, concluiu-se que o fitoterápico araticum exerceu efeito antimutagênico.

ABSTRACT

Annona crassiflora Mart. (*araticum*) is a typical brazilian plant found in cerrados of Brazil. This plant contains acetogenins that presents cytotoxic, antitumorigenic, antiparasitc and antimicrobial properties. Its leaves, barks, fruits and seeds are used by the population as therapeutic medicine to treat several diseases as diarrhoea, rheumatism and syphilis. In the present study we have evaluated the antimutagenic activity of the crude ethanolic extract of leaves of araticum through quantification of micronuclei induced in mice bone marrow. Doses of the extract (10mg/kg, 20mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg and 160 mg/kg) and MMC (4mg/kg) were co-applied i.p in mice *Mus musculus* in groups of 5 (five) animals for each dose. The cytological preparations were made in according to Heddle's methodology. For all the applied doses, frequency of micronucleated polychomatic erythrocytes (MNPCE) was evaluated after 36 h of treatment. The obtained results indicated that the crude ethanol extract from leaves ay doses of 20 mg/kg, 50 mg/kg and 100 mg/kg inhibited significantly reduced frequencies of micronuclei ($P<0.01$). Thus, we concluded that the phytoterapic *araticum* exerted an antimutagenic effect.

CONCLUSÕES GERAIS

Considerando os objetivos propostos neste trabalho e de acordo com os resultados obtidos, pôde-se concluir que o extrato de folhas de araticum (*Annona crassiflora* Mart.):

- Exibiu ação tóxica demonstrada pela DL_{50} e pela relação EPC/ENC.
- Não exerceu atividade mutagênica, uma vez que não foi aumentada a freqüência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos em relação ao grupo controle.
- Apresentou atividade antimutagênica que foi verificada pela redução da freqüência de eritrócitos policromáticos micronucleados induzidos pela mitomicina C.
- Apresentou perfil de um agente antitumoral, por ser citotóxico, não mutagênico e antimutagênico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, S.P.; Proença, C.E.B.; Sano, S.M.; Ribeiro, J.F. (1998). Planaltina, Brasília,EMBRAPA.

Bronzetti, G. (1994). Antimutagens in food. Trends Food Sci. Technol., 5: 390-395.

Bronzetti, G. ; Della, -C.C. ; Aretini, P. ; Fiorio, R. (1996). Antimutagenesis and anticancer effects. J.Environ.Pathol.Toxicol-oncol., 15(2-4): 59-64.

Chernomorsky, S.; Rancourt, R.; Virdi, K.; Segalman, A.; Poretz, R.D. (1997). Antimutagenicity, cytotoxicity and composition of chlorophyllin complex. Cancer Lett., 120: 141-147.

Correia, M.Pio (1926). Dicionário das plantas úteis e espécies exóticas. Ministério da Agricultura. Rio de Janeiro.

Cruz, G.L. (1979). Dicionário das plantas úteis do Brasil. Ed. Civilização Brasileira S.A., pp.63-67.

De Flora, S. (1998). Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mut.Res., 402(1-2): 151-158.

Draga, S. ; Vukovic, G.B. ; Knezevic, V.J. (1998). Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay - system. Mut.Res., 402(1-2): 51-57.

Fang, X.P. ; Rieser, M.J. ; Gu, Z.M. ; Zhao, G.X. ; McLaughlin, J.L. (1993). Annonaceous acetogenins: an updated review. Phytochem. Anal., 4: 27-67.

Fang, X.P. ; Rong, S. ; Gu, Z.M. ; Rieser, M.J. ; Hui, Y.H. ; McLaughlin, J.L. (1993). Structural revisions of some non - adjacent bis - tetrahydrofuran Annonaceous acetogenins. J.Nat.Prod., 56: 1095-1100.

Kada, T.; Inoue, T. & Maniki, M. (1982). Environmental desmutagens and antimutagens. Environ.Mutag. and Plant Biol. Kleokowsky, E. J. (ed.). Praeger, New York. pp. 113-152.

Kanasawud, P. & Crouzet, J.C. (1990). Mechanism of formatos of volatile Compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. β-carotene degradation. J.Agric.Food Chem., 38: 237-243.

Naves, R.V. (1999). Espécies frutíferas nativas dos cerrados de Goiás: caracterização e influência do clima e dos solos. Goiânia, UFG, pp. 205-206.

Pollo-Zafra, C.M.; Figadère, B.; Gallardo, T.; Tormo, R.J.; Cortes, D. (1998). Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action. Phytochem., 48(7): 1087-1117.

Rabello - Gay, M.N. ; Rodrigues, M.A.L.R. ; Monteleone-Neto, R. (1991). Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese – Métodos e Critérios de Avaliação. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética.

Ramel, C.; Alekperov, U.K.; Ames, B.N.; Kada, T. & Wattenberg, L.W.(1986). Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. Mut.Res., 121: 211-223.

Rupprechet, J.K.; Hui, Y-H. & McLaughlin, J.L. (1990). J.Nat.Prod., 53:237.

Salamone, M.F. & Heddle, J.A. ; Stuart, E. ; Katz, M. (1980). Studies on 3 models agents, MitomycinC, Cyclophosphamide an Dimethylbenzanthracene. Mut.Res., 74: 234-356

Santos, P.L. ; Boaventura, M.A.D. ; Oliveira, A.B. ; Oliveira, A.B. (1992). Livro de Resumos do XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Curitiba, número 169.

Santos, P.L.; Boaventura, D.A. (1994). Crassiflorina, uma acetogenina tetra-Hidrofurânica citotóxica de Annona crassiflora (araticum). Química Nova, 17(5): 387-391.

Santos, P.L. ; Boaventura, M.A.D.; Sun N.J. ; Cassady, M.J. & Oliveira, A.B. (1995). Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from Annona crassiflora seeds. Elsev. Sci., 42: 705-707.

Schimid, W. (1975). The micronucleus test. Mut.Res. , 31: 9-15.

Steinmetz, K.A. & Potter, J.D. (1991). Vegetables, fruits and cancer : II mechanisms. Cancer Causes Control, 2: 427-442.

Stryer, L. (1987). Bioquímica. Standford University. Guanabara Koogan, pp. 429.

Verhagen, H. ; Van Poppel, G. ; Willems, M.I. ; Boggards, J.J.P. ; Rompelberg, C.J.M. ; Van Bladeren, P.J. (1993). Cancer - prevention by natural food constituents. Ins.Food Ingredients, 1/2: 22-29.

Verhagen , H. ; Feron , V.J. (1994). Cancer prevention by natural food constituents – the lesons of toxicology transposed to antigenotoxicity and carcinogenicity. Proceedings of the International Conference Euro Food Tox IV "Bioactive substances in food of plant origin", Vol.2, Session 8, "Dietary Cancer Prevention", . Koziowska, H. ; Fornal, J. ; Zdunczyk, Z. (Eds). Centre for Agrotechnology and Veterinary Sciences, Olsztyn, pp. 463-478

Zetterberg, L.A.; Grawé, J.; Zetterberg, G.(1997).Eryrthropoiesis and the induction of micronuclei in mouse spleen determined by flow cytometry. Mut.Res., 394: 17-28.

Wattemberg, L.W. (1983). Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. Cancer Res., 43(Suppl.): 2448s-2453s