



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

CAMPUS I

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EDUARDO BENEDITO NASCIMENTO DE BRITO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E ANTIMUTAGÊNICO DO
EXTRATO METANÓLICO DE *Anacardium humile* ATRAVÉS DO TESTE DE
MICRONÚCLEO**

CAMPINA GRANDE

2018

EDUARDO BENEDITO NASCIMENTO DE BRITO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E ANTIMUTAGÊNICO DO
EXTRATO METANÓLICO DE *Anacardium humile* ATRAVÉS DO TESTE DE
MICRONÚCLEO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Estadual da Paraíba, Campus I, na
forma de artigo, como requisito obrigatório para a
conclusão do curso de Bacharel em Ciências
Biológicas.

CAMPINA GRANDE

2018

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

B862a Brito, Eduardo Benedito Nascimento de.
Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico do extrato metanólico de *Anacardium humile* através do teste de micronúcleo [manuscrito] : / Eduardo Benedito Nascimento de Brito. - 2018.
25 p. : il. colorido.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde , 2018.
"Orientação : Prof. Dr. Walclecio Morais Lira , Departamento de Biologia - CCBS."

1. Cajuí. 2. Extratos vegetais. 3. Metabólitos secundários.
21. ed. CDD 581.634

EDUARDO BENEDITO NASCIMENTO DE BRITO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E ANTIMUTAGÊNICO DO
EXTRATO METANÓLICO DE *Anacardium humile* ATRAVÉS DO TESTE DE
MICRONÚCLEO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual da
Paraíba, Campus I, na forma de artigo,
como requisito obrigatório para a conclusão
do curso de Bacharel em Ciências
Biológicas.

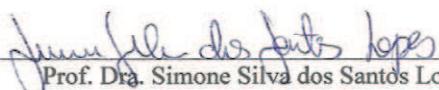
Área de concentração: Mutagênese

Aprovada em: 14/06/2018.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Walclécio Morais Lira
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)
Orientador



Prof. Dra. Simone Silva dos Santos Lopes
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)
Examinador



Prof. Dr. Délcio de Castro Felismino
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)
Examinador

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir embarcar nessa longa aventura e dela extrair tudo de melhor pelo caminho.

Aos meus pais, que são meus maiores exemplos e incentivadores para tudo que faço em minha vida.

Ao professor Walclecio Morais Lira, que me acolheu e me guiou durante essa jornada.

Aos integrantes e ex-integrantes do Núcleo de Mutagênese Ambiental (NUMA) que acrescentaram durante todo esse processo vivenciado, em especial às técnicas Andeilma e Silvana.

Aos colaboradores da pesquisa, o botânico Alexandre Gomes da Silva, a Prof. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, e a Ma. Bárbara de Azevedo Ramos.

A toda turma de Biologia Bacharelado 2014.1.

A Universidade Estadual da Paraíba e ao CNPq pelo fomento financeiro.

Ao professor André Luiz Machado Pessanha que me introduziu ao mundo científico.

A todos meus amigos, sejam aqueles adquiridos durante a graduação, em especial Anderson dos Santos, Betsy Dantas, Guilherme Gomes, Jefferson Nunes, Maraisa Olimpio, Rafaela Barbosa, entre outros, além daqueles que já me acompanham desde antes, como Carol Vieira e Isabela Almeida.

A Vitória Barbosa fica o meu o maior agradecimento, pois ela é a pessoa mais especial que já entrou em minha vida, tornando-se minha guia e melhor companhia, iluminando meus passos, decisões e sendo essencial para que eu obtivesse êxito durante essa caminhada, me acompanhando no término do ciclo da graduação e sendo a protagonista do início de nossa contínua estrada em conjunto.

“Acredite no amor, acredite na magia,
acredite nos seus sonhos.
Acredite em você mesmo.
Se você não o fizer, quem o fará?”

Jon Bon Jovi

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 07 |
| 2 | METODOLOGIA..... | 10 |
| 2.1 | Material Vegetal..... | 10 |
| 2.2 | Animais..... | 10 |
| 2.3 | Controles..... | 10 |
| 2.4 | Ensaio Mutagênico..... | 11 |
| 2.5 | Ensaio Antimutagênico..... | 11 |
| 2.6 | Obtenção do sangue, preparação das lâminas..... | 11 |
| 2.7 | Análises Citológicas..... | 11 |
| 2.8 | Análise Estatística..... | 12 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 12 |
| 3.1 | Avaliação Mutagênica..... | 12 |
| 3.2 | Avaliação Antimutagênica..... | 14 |
| 4 | CONCLUSÃO..... | 18 |
| | REFERÊNCIAS..... | 20 |
| | ANEXO A - MICRONÚCLEO..... | 24 |

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E ANTIMUTAGÊNICO DO EXTRATO METANÓLICO DE *Anacardium humile* ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO

Eduardo Benedito Nascimento de Brito¹

RESUMO

A medicina popular utiliza extratos vegetais para tratamento de variados distúrbios, como os inflamatórios e infecciosos, porém, a população não costuma saber aspectos científicos da planta, como sua capacidade de induzir/inibir danos ao organismo. *Anacardium humile* St. Hill, (Cajuí), pertence à família Anacardiaceae, encontrado em todo o país, predominantemente no Cerrado. O trabalho objetivou avaliar o potencial mutagênico e antimutagênico do extrato metanólico das folhas de *Anacardium humile* em células de sangue periférico de camundongos *Mus musculus* utilizando o teste de micronúcleo. Os animais foram distribuídos em sete grupos: controle positivo, negativo, além das concentrações 500mg/kg, 1000mg/kg e 2000mg/kg por peso corpóreo (p.c.) para o teste antimutagênico e 1000mg/kg/p.c. e 2000mg/kg/p.c. para o teste mutagênico, ambos constituídos por 3 machos e 3 fêmeas. O tratamento mutagênico teve aplicação do extrato via *gavage*, e o antimutagênico pelo extrato via *gavage* acrescido da ciclofosfamida via intraperitoneal. Como controle positivo, ciclofosfamida na proporção 50mg/kg intraperitoneal, e controle negativo água destilada via *gavage*. Após 30 horas, foi realizada coleta sanguínea via punção caudal para esfregação e preparo das lâminas, que foram coradas com Giemsa para contagem de 2000 eritrócitos policromáticos/lâmina. Constatou-se que não houve aumento significativo na média dos micronúcleos após aplicação do extrato, comparado com o controle negativo e apresentou significância no teste antimutagênico na comparação das doses com o controle positivo. Conclui-se que o extrato não apresentou potencial mutagênico, mas desempenhou atividade antimutagênica com redução de até 58% na frequência de micronúcleos, além disso, o sexo não contribuiu na inibição/indução de micronúcleos.

Palavras-chave: Cajuí. Metabólitos secundários. Extrato vegetal.

¹ Aluno de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual da Paraíba – Campus I.
Email: edudzbrito@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais no restabelecimento da saúde é uma prática globalizada, resultante do acúmulo secular de conhecimentos empíricos sobre a ação dos vegetais, em diversos grupos étnicos, sendo predominantemente os usuários de plantas medicinais e/ou medicamentos fitoterápicos pessoas adultas e idosas, que utilizam essa abordagem terapêutica, na concepção de que esta apresenta ausência de efeitos adversos, sendo tal concepção baseada na experiência diária que foi passada de geração em geração (ALEXANDRE, 2008; MENDANHA et al., 2010).

Nos últimos anos, notou-se a popularidade da ideia de que medicamentos a base de plantas e produtos naturais são mais seguros do que os medicamentos sintéticos, pois se propaga a ideia de que “o que é natural não faz mal”, pensamento este que não está correto, pois variações na concentração e utilização desses produtos podem acarretar em um aumento considerável de sua toxicidade, porém, essa propagação vem gerando um crescimento no consumo de fitofármacos (SILVA, C. R.; et al., 2008). Desde tempos remotos, os produtos naturais têm fornecido uma fonte infinita de drogas alternativas à medicina comumente empregada hoje em dia, como por exemplo, com o emprego de extratos vegetais, permitindo que os produtos oriundos de plantas dominem a farmacopeia humana há milhares de anos (RASKIN et al., 2004).

Portanto, o estudo com plantas medicinais utilizadas tradicionalmente é valioso em dois pontos distintos: primeiro como fonte de potenciais novas drogas quimioterápicas (agentes químicos produzidos por síntese química, ou seja, não possuem origem natural, mas utilizam como base o funcionamento das propriedades vegetais para a fabricação do fármaco); segundo, como medida de segurança para a população que faz uso contínuo, uma vez que a falta do conhecimento acerca do perfil fitoquímico da planta pode resultar em problemas na saúde do usuário, devido possivelmente aos efeitos tóxicos endógenos do vegetal (BOUHLEL et al., 2007).

As plantas produzem uma larga e diversa ordem de componentes orgânicos divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, enquanto os metabólitos secundários aparentemente não possuem relação com crescimento e desenvolvimento da planta, sendo úteis na proteção contra herbivoria através de citotoxicidade contra invasores e também sendo referidos como o princípio ativo da planta, pois exercem uma gama diversa de efeitos farmacológicos nos sistemas dos mamíferos (TAIZ; ZEIGER, 2006; KAUFMAN, 1999). No entanto, nem todos

os produtos metabólicos sintetizados possuem valor medicinal. Em todas as espécies existem ao mesmo tempo princípios ativos e substâncias inertes. Estas últimas determinam a eficácia da erva medicinal, acelerando ou retardando a absorção dos princípios ativos pelo organismo. Geralmente, numa mesma planta, encontram-se vários componentes ativos, dos quais um ou um grupo determinam a ação principal, sendo essas afirmações corroboradas por Negi et al., (2011).

No Brasil, a medicina popular utiliza um grande número de extratos de origem vegetal para o tratamento de vários tipos de distúrbios digestivos, incluindo a planta *Anacardium humile* St. Hil, também conhecida como cajuí, cajuzinho e caju-do-cerrado, pertencente à família Anacardiaceae, a qual possui cerca de 14 gêneros e 54 espécies, apresentando porte arbusto a subarbusto, chegando até 80 cm de altura, possuindo folhas alternas, simples, pecioladas a subsésseis e sem estípulas (SANNOMIYA, 2005). Possui fruto verdadeiro noz, acinzentado, brilhante e de semente única; pseudofruto (pedúnculo desenvolvido) vermelho, claviforme, além de polpa alva e succulenta (ALMEIDA, S., et al., 1998). Distingue-se das demais espécies na região Central do Brasil pelo porte arbóreo, sendo o principal cajueiro de importância econômica para esta região, considerada um *hotspot* mundial, ou seja, uma região que concentra alto nível de biodiversidade (VIEIRA et al., 2010; BARBOSA, 2015). Consegue ainda ocorrer em todas as regiões do Brasil, sendo nativa, sucedendo na Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado apresentando vegetação típica do último citado (SILVA-LUZ, 2013).

As plantas e os microorganismos são importantes fontes para a indústria biofarmacêutica no que tange à pesquisa de novas biomoléculas alvos para a prospecção de novos medicamentos, representando um grande potencial para ser explorado (LIMA et al., 2011). *Anacardium humile* possui escassos trabalhos sobre sua composição química, contrastando com toda sua importância biológica e socioeconômica, já que adicionalmente, o uso alimentar também é muito difundido. O pseudofruto apresenta sabor ácido, consumido *in natura* ou mesmo sob a forma de sucos, doces, geléias, sorvetes e compotas. Com a fermentação da polpa, obtém-se uma espécie de vinho ou aguardente. A amêndoa também é comestível, sendo consumida torrada (ALMEIDA, S., et al., 1998). Tais interesses aumentam a necessidade de gerar informações biológicas, na tentativa de adequar à exploração econômica, de modo que não haja utilização predatória ou, até mesmo, a extinção da espécie (LONDE, 2005).

A mutação é definida como qualquer alteração ocorrida no DNA, dividindo-se em duas grandes categorias: alterações gênicas e cromossômicas, ocorrendo na sequência de

nucleotídeos do DNA e no número ou estrutura dos cromossomos, respectivamente (LUCIO NETO, 2011), podendo ser de consequência súbita e herdável; na qual, também é a fonte primordial da variabilidade genética dos seres vivos, decorrente de modificações estruturais no material genético (ALMEIDA, J., 2005).

As mutações também podem ser causadas por indução a determinados agentes físicos, por agentes biológicos, ou por meio de agentes químicos. Estes agentes capazes de provocarem mutações, recebem o nome de agente mutagênico (FIGUEIREDO, 2015). Os agentes mutagênicos são capazes de invadir as células e dirigirem-se ao núcleo, causando alterações no material genético, no qual o acúmulo de danos no DNA pode levar a mudanças irreversíveis na sequência de nucleotídeos (CARDOSO et al., 2006). Há uma ampla variedade de agentes capazes de induzir lesões no DNA celular, na qual, algumas dessas alterações podem ser reparadas, restaurando dessa forma a função biológica da informação genética, porém, algumas lesões podem não ser reparadas ou reparadas inadequadamente, resultando em mutações. Algumas dessas mutações podem ser visualizadas como aberrações cromossômicas (GOLLIN, 2005).

Micronúcleos (MN) (Anexo A) são núcleos adicionais, separados do núcleo principal de uma célula, formado por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que não são incluídos no núcleo principal durante a mitose (RAMIREZ; SALDANHA, 2002). A formação de micronúcleos possibilita realizar a avaliação da atividade mutagênica de um agente por meio de análise dessas alterações (GOLLIN, 2005). Entre os ensaios biológicos para o monitoramento de indivíduos sob risco carcinogênico, destaca-se o teste do micronúcleo (MN) que é proposto como um método de avaliação de danos cromossômicos em células expostas a agentes genotóxicos (FENECH et al., 1999; HOLLANDA, 2008), sendo considerado padrão ouro, juntamente com a análise de aberrações cromossômicas e o teste cometa (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

Apesar de encontrarmos diversos trabalhos com o gênero *Anacardium*, não são muitos os que remetem as propriedades biológicas e farmacológicas de *A. humile* St. Hill., (LONDE, 2005). Com essa escassez de dados tão evidente e a tamanha utilização de *Anacardium humile* St. Hill, o objetivo do trabalho foi realizar a avaliação acerca do possível potencial mutagênico e antimutagênico da espécie *Anacardium humile* St. Hill, visto a sua amplitude de utilização pela população, determinando de tal forma se a espécie possui a capacidade de induzir ou inibir a formação de micronúcleos no organismo.

2 METODOLOGIA

2.1- Material vegetal

A coleta das folhas de *Anacardium humile* St-Hill ocorreu no Parque do Catimbau com coordenadas 8° 30' 57" S 37° 20' 59", em Buíque, Pernambuco. O material foi levado à estufa de circulação de ar forçado (40-45°C) por um período de três a quatro dias. A amostra continuou por consequente identificação conforme as técnicas taxonômicas e ficou depositada no Herbário IPA, do Instituto Agrônomo de Pernambuco. Na sequência, ocorreu o processamento do extrato com a utilização do solvente metanol (AhM).

O material vegetal foi coletado e identificado pelo botânico Alexandre Gomes da Silva e fornecido pela Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, atualmente professora da Universidade Federal de Pernambuco e pela Ma. Bárbara de Azevedo Ramos, atualmente doutoranda na Universidade Federal de Pernambuco.

2.2- Animais

Foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* (Swiss albino) com peso corpóreo variando entre 20-25 gramas, ambos provenientes do laboratório de Biogenética, presente no Complexo Três Marias situado na Universidade Estadual da Paraíba. Os animais foram acondicionados em caixas individuais de polipropileno tamponadas com grade durante o período necessário de tratamento, com suporte de água e ração *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura média de 25°C. Os camundongos foram distribuídos em grupos (sendo cada grupo constituído de 3 machos e 3 fêmeas) para cada tratamento realizado, com administração via *gavage* obedeceu-se ao limite de 0,1 mL/10gramas de peso corpóreo (p.c.) de cada uma das substâncias.

2.3- Controles

Foi estabelecido um grupo controle positivo, com o tratamento dos animais via intraperitoneal com a aplicação da ciclofosfamida na dosagem de 50mg/kg de peso corpóreo. O grupo controle negativo foi tratado *via gavage* com aplicação de água destilada observando o volume máximo 0,1mL/10 g/p.c

2.4- Ensaio Mutagênico

Para a avaliação do potencial mutagênico, os animais foram distribuídos em dois grupos de tratamentos os quais receberam *via gavage* doses do extrato nas concentrações de 2000 mg/kg e 1000 mg/kg. Por conta da escassez de recursos, foi optado pela realização do tratamento constituído por apenas dois grupos, sendo os de maiores concentrações.

2.5 Ensaio Antimutagênico

Para a avaliação do potencial antimutagênico, os animais foram distribuídos em três grupos de tratamentos utilizando as doses do extrato em 2000 mg/kg, 1000 mg/kg e 500 mg/kg, *via gavage*, receberam simultânea *via intraperitoneal*, ciclofosfamida na dosagem de 50 mg/kg/p.c.

2.6- Obtenção do sangue, preparação das lâminas

Decorridas 30 horas após a realização dos tratamentos, foi colhido em torno de 5 μ L (uma gota) de sangue dos animais por meio de punção caudal para então ser realizado o esfregaço em lâmina. Para cada animal foram preparadas duas lâminas e posteriormente codificadas aleatoriamente para análise em teste cego. Após 24 horas, essas lâminas foram fixadas no álcool metílico por 10 minutos e em seguida passaram por secagem à temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram coradas com Giemsa por 15 minutos e lavadas com água destilada para retirar o excesso de corante. As lâminas secas finalizadas ficaram armazenadas na geladeira até o instante da análise citológica.

2.7- Análises Citológicas

As análises citológicas foram realizadas por meio de microscopia óptica com aumento de precisão de 1000x. As análises ocorreram na contagem de 2000 eritrócitos policromáticos (PCE) por animal, ocorrendo uma verificação da frequência de células micronucleadas nos diferentes tratamentos realizados.

2.8- Análise Estatística

Foram empregados o teste-t Student e ANOVA com objetivo de comparar as médias encontradas nos resultados, tendo $P < 0,05$ para verificação via estatística das diferenças entre os grupos de tratamentos. Para avaliação do potencial mutagênico foi realizada uma comparação entre a média de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) de cada grupo de tratamento via extrato, com a média do controle negativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação Mutagênica

Os resultados que foram obtidos após a avaliação do potencial mutagênico do extrato metanólico de *Anacardium humile* estão apresentados na tabela 1 e posteriormente, representados na figura 1. De acordo com as análises estatísticas (empregando $p < 0,05$) não foram encontradas diferenças significativas na frequência de micronúcleos observadas entre as médias de cada tratamento via aplicação do extrato, em comparação com a média do controle negativo.

Tabela 1 – Avaliação do potencial mutagênico da atividade do extrato metanólico do *Anacardium humile*.

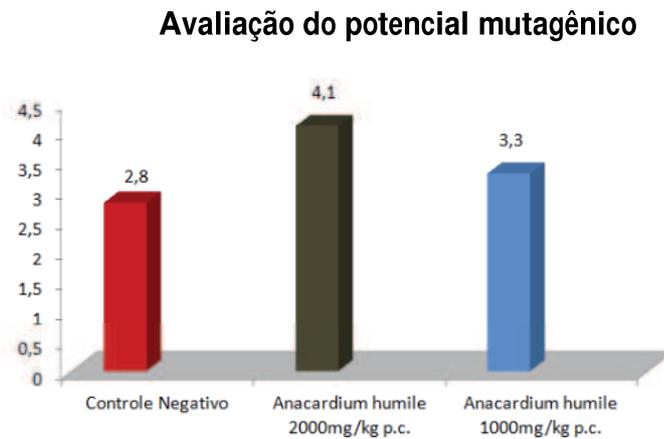
| Tratamento/Concentração | M1 | M2 | M3 | F1 | F2 | F3 | Média±SD |
|--------------------------------|----|----|----|----|----|----|-----------|
| Controle Positivo | 18 | 20 | 19 | 26 | 21 | 23 | 21.1±2.92 |
| Controle negativo | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 3 | 2.8±0.75 |
| <i>A. humile</i> 2000mg/kg p.c | 3 | 5 | 4 | 6 | 3 | 4 | 4.1±1.17 |
| <i>A. humile</i> 1000mg/kg p.c | 2 | 4 | 5 | 2 | 4 | 3 | 3.3±1.21 |

Controle negativo = Água destilada; Controle positivo = Ciclofosfamida 50 mg/kg p. c.; SD = Desvio Padrão; M= machos, F= Fêmeas; $p < 0,05$.

Fonte: Autoria própria

De acordo com os resultados encontrados, empregando $p < 0,05$, podemos afirmar que o extrato metanólico de *Anacardium humile* não causou efeito mutagênico nas concentrações utilizadas em experimento. Além disso, não foi encontrada nenhuma alteração causada pela diferença de sexos, visto que a quantidade de micronúcleos observada foi semelhante entre machos e fêmeas (Figura 2).

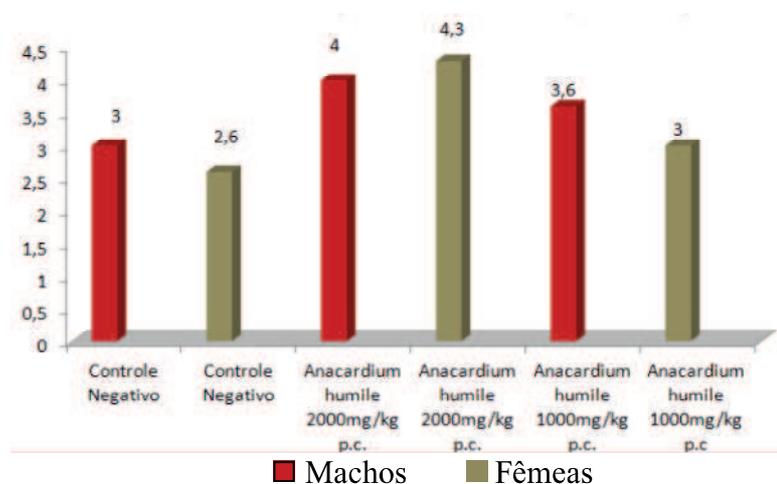
Figura 1 – Média de micronúcleos encontrados na contagem de 2000 PCE por dosagem de *Anacardium humile*.



Fonte: Autoria própria

A figura 1 nos apresenta os resultados obtidos à partir da avaliação do potencial mutagênico da *A. humile*, com a representação da média de micronúcleos encontrado por cada concentração, em comparação com a média do grupo controle negativo, utilizando $n = 6$. Percebe-se que a maior concentração (2000mg/kg p.c.) foi a que apresentou a maior média de micronúcleos, porém, tanto ela como a concentração mais baixa testada (1000mg/kg p.c.) não apresentaram resultados significativos quando comparados com o controle negativo.

Figura 2 – Média de micronúcleos encontrados por sexo na contagem de 2000 PCE por dosagem de *Anacardium humile*.



Fonte: Autoria própria

A figura 2 apresenta os resultados obtidos à partir da comparação da média de micronúcleos por sexos, utilizando $n = 3$, visto que essa comparação ocorreu com os animais dentro do mesmo grupo, para desta forma analisarmos se o sexo foi um fator contribuinte para

a indução de células micronucleadas. De acordo com os resultados estatísticos, novamente empregando $p < 0,05$, não foi encontrada significância nas médias de machos e fêmeas, indicando que o sexo não induziu a formação de micronúcleos.

3.2 Avaliação Antimutagênica

Os resultados encontrados após análise do potencial antimutagênico do extrato metanólico de *Anacardium humile* estão apresentados na tabela 2 e também representados na figura 3. De acordo com as análises estatísticas, foram encontradas diferenças significativas na frequência de micronúcleos observadas entre as médias de cada tratamento via aplicação do extrato, em comparação com a média do controle positivo, observando-se $p < 0,05$. Novamente, não foram encontradas diferenças significativas entre machos e fêmeas, como apresentado na figura 4. Os resultados dos testes de antimutagenicidade estão indicados em porcentagem de inibição, ou seja, a capacidade que os extratos possuem para inibir a ação do agente mutagênico conhecido.

Tabela 2 – Avaliação do potencial antimutagênico da atividade do extrato metanólico do *Anacardium humile*.

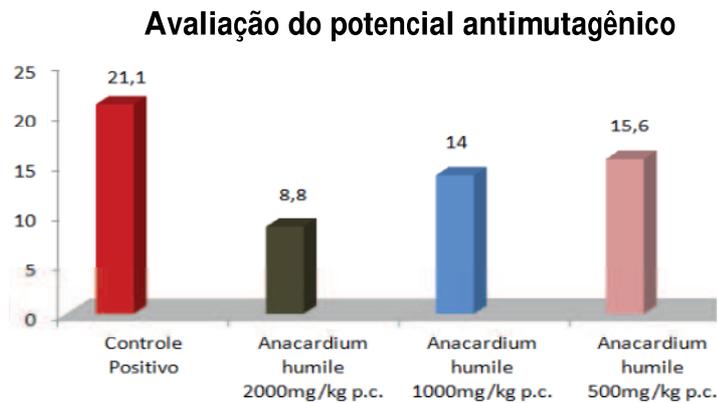
| Tratamento/Concentração | M1 | M2 | M3 | F1 | F2 | F3 | Média±SD |
|---------------------------------|----|----|----|----|----|----|-----------|
| Controle Positivo | 18 | 20 | 19 | 26 | 21 | 23 | 21.1±2.92 |
| Controle negativo | 2 | 3 | 4 | 2 | 3 | 3 | 2.8±0.75 |
| <i>A. humile</i> 2000mg/kg p.c. | 11 | 7 | 9 | 8 | 9 | 9 | 8.8±1.32 |
| <i>A. humile</i> 1000mg/kg p.c. | 14 | 12 | 13 | 17 | 14 | 14 | 14.0±1.67 |
| <i>A. humile</i> 500mg/kg p.c. | 16 | 16 | 15 | 14 | 18 | 15 | 15.6±1.36 |

Controle negativo = Água destilada; Controle positivo = Ciclofosfamida 50 mg/kg p. c.; SD = Desvio Padrão; M= machos; F= Fêmeas, $p < 0,05$.

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os resultados encontrados, empregando $p < 0,05$, podemos afirmar que o extrato metanólico de *Anacardium humile* causou efeito antimutagênico nas concentrações utilizadas em experimento. Além disso, não foi encontrada nenhuma alteração causada pela diferença de sexos, visto que a quantidade de micronúcleos observada foi semelhante entre machos e fêmeas (Figura 4).

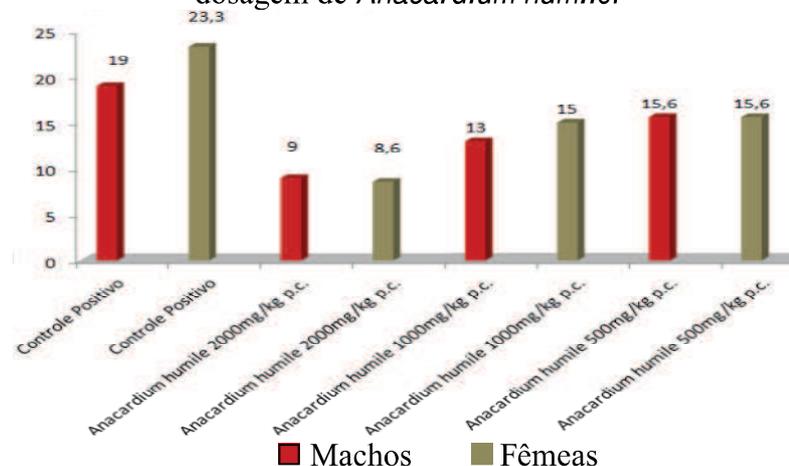
Figura 3 – Média de micronúcleos encontrados na contagem de 2000 PCE por dosagem de *Anacardium humile*.



Fonte: Autoria própria

A figura 3 nos apresenta os resultados obtidos à partir da avaliação do potencial antimutagênico da *Anacardium humile*, na qual podemos observar as médias das concentrações utilizadas em experimento, além da média do grupo controle positivo. Pode-se observar que com o aumento da concentração do extrato, ocorreu um maior poder redutor da quantidade de micronúcleos, sendo a maior concentração (2000mg/kg p.c.) apresentando a menor média de micronúcleos (8,8), enquanto que a menor concentração testada (500mg/kg p.c.) apresentou a maior média de micronúcleos (15,6). Empregando $p < 0,05$, foram encontradas diferenças significativas nas três concentrações analisadas do extrato em questão, quando elas tiveram a comparação de média com o controle positivo, indicando que o extrato possui capacidade antimutagênica, mais eficiente com a maior concentração aplicada.

Figura 4 – Média de micronúcleos encontrados por sexo na contagem de 2000 PCE por dosagem de *Anacardium humile*.



Fonte: Autoria própria

A figura 4 nos apresenta os resultados obtidos à partir da comparação da média de micronúcleos por sexos, utilizando $n = 3$, pois tal comparação foi realizada com os animais dentro do mesmo grupo, provando assim se o sexo foi um fator contribuinte para a redução de células micronucleadas. De acordo com os resultados estatísticos, utilizando $p < 0,05$, não foram encontrados resultados significantes nas médias de machos e fêmeas, indicando que o sexo não contribuiu para a inibição da formação de micronúcleos.

Loh, Er e Chen (2009) indicam que o cálculo de percentual de inibição é representado pela fórmula: $100 - [(T/M) \times 100]$, na qual, T é a média da concentração testada contendo o extrato e a ciclofosfamida, e M é a média encontrada no controle positivo. Os resultados apontaram um percentual de redução de 26,0% para a concentração de 500mg, 33,6% para a concentração de 1000mg e 58,2% para a concentração de 2000mg.

Não existe um consenso de interpretação desses valores dentro da literatura, porém foi utilizada a escala proposta por Neigi et al., (2003) e Lira et al., (2008), na qual quando o percentual de inibição mutagênico for inferior a 25%, este será considerado ausente; já efeito moderado será quando o percentual de inibição for entre 25% e 40% e, terá forte antimutagenicidade quando o percentual de inibição foi superior a 40%. Com isso, pode-se afirmar que o extrato apresentou um potencial redutor moderado nas concentrações de 500mg e 1000mg, além de apresentar um potencial redutor considerado forte na concentração de 2000mg.

A atividade antimutagênica encontrada no trabalho vai de acordo com a ação dos metabólitos secundários, que representam a atividade biológica dos vegetais, a partir de uma interface química entre as plantas e o ambiente em que a mesma está inserida, (CRUZ, et al., 2012). Ferreira (2005) realizou investigações fitoquímicas que permitiram a representação do *screening* fitoquímico de *A. humile*, indicando os seus principais grupos de constituintes químicos, possibilitando o isolamento de metabólitos secundários com destaque para os derivados do ácido gálico, catequinas e flavonoides. Esses achados indicam que sua ação, seja individual ou em conjunto, podem ter contribuído para a inibição da frequência de células micronucleadas.

O ácido gálico (AG) já havia sido encontrado na espécie *Anacardium occidentale*, de acordo com Miranda et al., (2013), sendo um derivado do ácido benzoico, de origem vegetal, e está presente em vários medicamentos devido as suas funções antioxidante e antimicrobiana. O AG também tem um papel importante nas inflamações, principalmente doenças alérgicas inflamatórias, em casos de diabetes e possui atividade antifúngica (BONIFÁCIO et al., 2017).

Flavonoides são compostos fenólicos naturais, presentes em espécies vegetais, sendo moléculas de baixo peso molecular que se encontram amplamente distribuídas no reino vegetal (CUNHA, 2014). Foram identificadas mais de 8.000 substâncias pertencentes a este grupo (KOIRALA et al., 2016). Esta variedade de compostos ocorre devido a uma grande combinação de diferentes açúcares e hidroxil (OH) como substituintes na estrutura química básica (VINAYAGAM; XU, 2015). As catequinas são derivadas dos flavonoides e possuem ação inibitória de danos no DNA e a peroxidação lipídica ocasionadas pelas espécies reativas de oxigênio. (SILVA, A, C; PEITZ DE LIMA, 2016). Os flavonoides e as catequinas apresentam uma série de propriedades medicinais, dentre essas, antimicrobiana, antioxidante, quimioprotetora, termogênica, anti-inflamatória e anticarcinogênica (SCHIMTZ et al., 2005).

Gontijo et. al., (2014) já havia demonstrado a presença de taninos e flavonoides agindo com atividade antimutagênica moderada nos testes realizados com extrato de *Ocimum gratissimum* L., indo de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, indicando o poder redutor de mutagenicidade desses compostos.

Edenharder e Grunhage (2003), já haviam demonstrado que a presença de uma carbonila no carbono 4 dos flavonoides, auxiliados pela existência de uma estrutura planar ao lado da função ceto são essenciais para atividade antimutagênica, corroborando os dados encontrados por esse estudo.

Gobbo-Neto & Lopes (2007) informam que alguns fatores podem contribuir para variações nos resultados de mutagenicidade e antimutagenicidade, como determinadas diferenças na composição química constituinte nos órgãos da planta, variações nas épocas de coleta, nos ambientes nos quais se encontram, nos nutrientes que a espécie recebeu e até mesmo o modelo de cultivo.

Também seria de extrema importância a integração dos resultados encontrados nesse estudo, buscando promover o conhecimento para a população que faz uso cotidiano dessas espécies com fins medicinais, visto que a adaptação dessas informações auxiliaria no processo de moldagem do saber, sendo importante um suporte das Secretarias Municipais de Saúde, servindo de incentivo para atividades de cultivo, processamento e difusão local (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005), visto que as preparações fitoterápicas correspondem a 25% do receituário médico dos países desenvolvidos e 80% dos países em desenvolvimento; apesar do amplo uso dos fitomedicamentos pela população, poucos estudos têm sido feitos para avaliar a eficácia terapêutica e a toxicidade, citotoxicidade das preparações fitoterápicas e o uso de preparações a base de plantas (SILVA; MOURA; LUCIO NETO, 2015).

4 CONCLUSÃO

Com base nas informações obtidas no presente estudo, pode-se concluir que o extrato metanólico das folhas de *Anacardium humile* não induziu aumento significativo na frequência de eritrócitos micronucleados nas concentrações testadas, indicando que o extrato não apresenta potencial mutagênico, além de que a diferença entre sexos não provocou uma variação na indução ou inibição disforme da quantidade de micronúcleos.

Também observou-se uma diminuição significativa na quantidade de células micronucleadas, podendo-se dessa forma concluir que o extrato apresentou ação considerada antimutagênica em todas as doses analisadas, possuindo um poder redutor considerado de moderato à forte, sendo mais redutor com a maior elevação da concentração do extrato analisada.

Contudo, a realização de novos estudos é de vital importância, pois possibilitam a erradicação de dúvidas sobre tais espécies que são tão comumente empregadas na medicina popular, evitando que os indivíduos corram risco de adquirir malefícios provenientes dessa utilização às cegas. Além disso, novos testes poderiam ser empregados para realizar comparações entre os resultados, como a utilização de outras partes do vegetal, outra forma do extrato testado, seja em forma bruta ou com outros solventes, além da validação por meio de outros testes, como por exemplo, os testes cometa e de Ames.

EVALUATION OF THE MUTAGENIC AND ANTIMUTAGENIC POTENTIAL OF THE METHANOLIC EXTRACT OF *Anacardium humile* THROUGH MICRONUCLEUS TEST

Eduardo Benedito Nascimento de Brito¹

ABSTRACT

Popular medicine uses a large number of plant extracts for treatment of various disorders, such as inflammatory and infectious, however, the population does not usually know scientific aspects of the plant, such as the ability to induce / inhibit damage in the human body. *Anacardium humile* St. Hill, (Cajuí), belongs to the family Anacardiaceae, being found in all the country, predominantly in the Cerrado. The objective of this work was to evaluate the mutagenic and antimutagenic potential of the methanolic extract of *Anacardium humile* in peripheral blood cells of *Mus musculus* mice using the micronucleus test. The animals were divided in seven groups: a controls positive, negative, in addition to the concentrations 500mg/kg, 1000mg/kg and 2000mg/kg by body weight (b.w.) for the antimutagenic test and 1000mg/kg/b.w. and 2000mg/kg/b.w. for the mutagenic test, both consisting of 3 males and 3 females. The mutagenic treatment was given by the application of the extract via gavage, while the antimutagenic was given by the extract via gavage plus cyclophosphamide via intraperitoneal. As a positive control, cyclophosphamide in the proportion 50mg / kg intraperitoneal, and negative control distilled water through gavage. After 30 hours, the blood collection was performed through caudal puncture for smearing and preparation of the slides, which were stained with Giemsa for counting 2000 polychromatic erythrocytes / slide. It was verified that there was no significant increase in the mean micronuclei after application of the extract, compared to the negative control and presented significance in the antimutagenic test in the comparison of doses with the positive control. It was concluded that the extract didn't present mutagenic potential, but it performed antimutagenic activity with a reduction of up to 58% in the micronuclei frequency, besides, sex didn't contribute to the inhibition/induction of micronuclei.

Keywords: Cajuí. Secondary metabolites. Vegetable extract.

¹ Student in Biological Sciences at the State University of Paraíba - Campus I.
Email:edudzbrito@gmail.com

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C. M. Interactions between drugs and ginkgo or ginseng herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 117-126, 2008.
- ALMEIDA, S. P. et al. Cerrado: espécies vegetais úteis. **Planaltina: Embrapa-CPAC**, v. 464, 1998.
- ALMEIDA, J. X. et al. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) através do teste de micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) in vivo. **Revista de biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 2, 2005.
- ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro-conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista espaço para a saúde**, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.
- BARBOSA, K. F.; **Higroscopicidade e criopreservação de aquênios de *Anacardium Humile* St. Hill**. 52 f. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, IFG, 2015.
- BONIFÁCIO, B. B. et al. Determinação da atividade antimicrobiana do ácido gálico para formulações dermatológicas. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 38, 2017.
- BOUHLEL, I. et al. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in different extracts from the leaves of *Acacia salicina* from the center of Tunisia. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, n. 1, p. 56-63, 2007.
- CAILLET, S. et al. Umu test applied for screening natural antimutagenic agents. **Food chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1699-1707, 2011.
- CARDOSO, C. R. P. et al. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Toxicology**, v. 225, n. 1, p. 55-63, 2006.
- CRUZ, W. P. et al. Nutrition and genetics in the occurrence of pests, natural enemies and attack leaf miner in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, n. 1, v. 3, p. 74-81, 2012.

CUNHA, A. P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. s.l. : Fundação Calouste Gulbenkian, 2014.

EDENHARDER, R.; GRÜNHAGE, D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. **Mutation Research**, v. 540, n. 1, p. 1 – 18, 2003.

FENECH, M. et al. The Human MicroNucleus Project—an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 428, n. 1, p. 271-283, 1999.

FERREIRA, A. L. et al. **Atividade antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae)**. 142 f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Unicamp 2005.

FIGUEIREDO, J; **Agentes Mutagênicos**. 2015. Disponível em:
<<http://knoow.net/ciencterravida/biologia/agentes-mutagenicos/>> Acesso em 05 de Maio de 2017.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n.2, p.371-81, 2007.

GOLLIN, S. M. Mechanisms leading to chromosomal instability. **Seminars In Cancer Biology**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.33-42, fev. 2005.

GONTIJO, D. C.; FIETTO, L. C.; LEITE, J. P. V. Avaliação fitoquímica e atividade antioxidante, antimutagênica e toxicológica do extrato aquoso das folhas de *Ocimum gratissimum* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 874-880, 201

HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 659, n. 1, p. 93-108, 2008.

KAUFMAN, P. B. et al. **Natural Products Isolation from Plants**. Boca Raton: CRC Press, FL, 1999.

KOIRALA, N. et al. Methylation of flavonoids: chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. **Enzyme and microbial technology**, v. 86, p. 103-116, 2016.

LIMA, T. B. et al. In vivo effects of cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC.) leaf extracts on diarrhea treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

LIRA, W. M. et al. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. **Journal of medicinal food**, v. 11, n. 1, p. 111-119, 2008.

LOH, D. S. Y.; ER, H. M.; CHEN, Y. S.. Mutagenic and antimutagenic activities of aqueous and methanol extracts of *Euphorbia hirta*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 406-414, 2009.

LONDE, L. N. **Indução de respostas morfogênicas em *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae) e análise da divergência genética entre populações.** 165 f. Dissertação (Mestrado), Instituto de Genética e Bioquímica, UFU, 2005.

LÚCIO NETO, M. P., **Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil) – imidazolidina-2,4-diona em células eucarióticas.** 130 f. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPI, 2011.

MENDANHA, D. M. et al. Modulatory effect of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p. 69-77, 2010.

MIRANDA, G. S. et al. In vitro antibacterial activity of four plant species at different alcoholic contents. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 1, p. 104-111, 2013.

NEGI, J. S.; SINGH, P; RAWAT, B, Chemical constituents and biological importance of swertia: A review. **Current Research In Chemistry**, v. 3, p. 1-15, 2011.

NEGI, J.S., G. K.; JENA, B. S. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. **Food Chemistry**, v. 80, p. 393 – 397, 2003.

RAMIREZ, A; SALDANHA, P. H.. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. **Genet Mol Res**, v. 1, n. 3, p. 246-260, 2002.

RASKIN, I; RIPOLL, C. Can an apple a day keep the doctor away?. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 27, p. 3419-3429, 2004.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K.. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

SANNOMIYA, M. et al. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 1, p. 1-6, 2005.

SCHMITZ, W. et al. O chá verde e suas ações como quimioprotetor. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 26, n. 2, p. 119-130, 2005.

SILVA, A. C.; PEITZ DE LIMA, C. Chá verde, *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, no tratamento da obesidade. **Anais do EVINCI-UniBrasil**, v. 2, n. 1, p. 297-297, 2016.

SILVA, A. E. P.; MOURA, J. W. M.; LÚCIO NETO, M. P. Avaliação Tóxica, Citotóxica, Genotóxica e Mutagênica da *Turnera ulmifolia* L. (Chanana) em células eucarióticas. **Revista Saúde em foco**, Teresina, v. 2, n. 1, p. 25-48, 2015

SILVA, C. R. et al. Assessment of antimutagenic and genotoxic potential of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) aqueous extract using in vitro assays. **Toxicology in vitro**, v. 22, n. 1, p. 212-218, 2008.

SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R. Anacardiaceae in: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil>>. Acesso em: 30 de Abril de 2017.

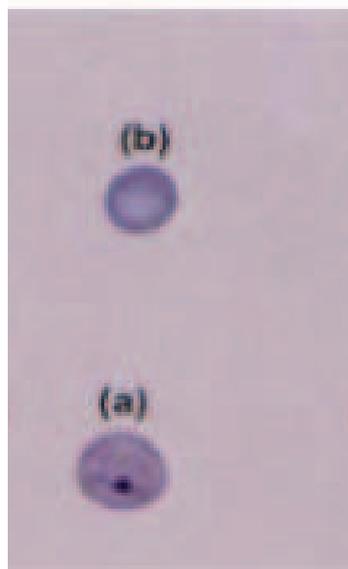
TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4. ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2006.

VIEIRA, R. F. et al. **Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil**. Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.

VINAYAGAM, R.; XU, B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. **Nutrition & Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 60, 2015.

ANEXO

ANEXO A – MICRONÚCLEO



(a) Eritrócito Policromático Micronucleado; (b) Eritrócito Policromático ausente de micronúcleo.
Fonte: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. *Mutagênese Ambiental*, 1ª edição, Editora Ulbra, 2003, p. 189.