



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

THAÍS ARAÚJO DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO EXTRATO ETANÓLICO DA
FOLHA DE *Hymenaea courbaril* L. ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM
SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS**

CAMPINA GRANDE - PB

2019

THAÍS ARAÚJO DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO EXTRATO ETANÓLICO DA FOLHA DE *Hymenaea courbaril* L. ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS

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

Área de concentração: Mutagênese

Orientador: Prof. Dr. Walclécio Morais Lira

CAMPINA GRANDE - PB

2019

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.

N244a Nascimento, Thaís Araújo do.
Avaliação do potencial mutagênico do extrato etanólico da folha de *Hymenaea courbaril* L. através do teste de micronúcleo em sangue periférico de camundongos [manuscrito] / Thaís Araujo do Nascimento. - 2019.
22 p.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2019.
"Orientação : Prof. Dr. Walclécio Morais Lira ,
Coordenação de Curso de Biologia - CCBS."
1. Jatobá. 2. Mutagenicidade. 3. Extrato vegetal. I. Título
21. ed. CDD 581.634

THAÍS ARAÚJO DO NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO EXTRATO ETANÓLICO DA
FOLHA DE *Hymenaea courbaril* L. ATRAVÉS DO TESTE DE MICRÔNÚCLEO EM
SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS

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

Área de concentração: Mutagênese

Aprovada em: 09/08/2019.

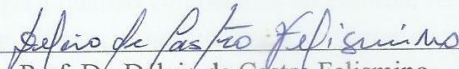
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Walclécio Morais Lira

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

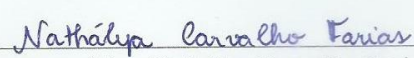
Orientador



Prof. Dr. Dêlcio de Castro Felismino

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Examinador



Msc. Nathália Carvalho Farias

Msc. Nathália Carvalho Farias

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Examinador

"Não só isso, mas nos gloriamos até das tribulações. Pois sabemos que a tribulação produz a paciência, a paciência prova a fidelidade e a fidelidade, comprovada, produz a esperança. E a esperança não engana."

Romanos 5, 3-5.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pois sem Ele a concretização desse momento não teria sido possível, pois nas horas de angústia e medo era Ele quem segurava na minha mão e me sustentava para eu não desistir. A Nossa Senhora, a virgem Maria, que me conduziu para mais perto do seu filho Jesus e intercedeu por mim, protegendo e acalentando quando preciso me dando colo e carinho de mãe.

Aos meus pais, os meus maiores incentivadores e exemplos de determinação, por todo o apoio e encorajamento ao longo desses anos, me ajudando sempre que possível e estando junto comigo em todas as horas. Aos meus irmãos, que sempre torceram por mim e se preocupavam quando algo não ia bem.

Ao professor Walclécio Morais Lira, pelo acolhimento desde que cheguei ao laboratório, mesmo ainda estando em fase inicial do curso, pela orientação ao longo desses anos, pelo apoio, paciência e ensinamentos repassados.

Aos integrantes do NUMA (Núcleo de Mutagênese Ambiental), que me ajudaram e também contribuíram no desenvolvimento de forma direta ou indiretamente dessa pesquisa, em especial, as técnicas Andeilma e Silvana, que não mediram esforços para me ajudar.

A Universidade Estadual da Paraíba e a CNPq, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento da pesquisa.

A todos os professores da graduação ao longo desses quatro anos de curso, pelos ensinamentos, pela paciência e dedicação, em especial Avany Gusmão e Joseline Molozzi nossas madrinhas de turma, e aos demais professores por todo o conhecimento compartilhado, gratidão.

A todos os meus colegas de turma que estiveram comigo durante toda essa caminhada, em especial, Carlos Augusto, Joyce Cordeiro, Thalita Marinho, Ingrid Cunha, Ketley Cristinne, Igor Eloi e Melhem Anna por todo apoio e companheirismo na vida acadêmica e também pessoal.

A Mário Herculano, por toda ajuda e auxílio nos momentos de desespero em que precisei de ajuda e não hesitou em ajudar e contribuir da maneira que podia, muito obrigada.

A Talyson Silva, pela ajuda, paciência e auxílio na hora da correria e agonia em que alguma impressão de documento saia com algum erro de digitação, obrigada pelo suporte e descontos necessários (risos).

As minhas amigas Isabelle Montenegro e Thaís Almeida por estarem comigo em todos os momentos bons e ruins, por aguentarem minhas crises de ansiedade, medo e as

reclamações diárias. Por todo o apoio e incentivo ao longo desses anos, o meu muito obrigado.

Ao pessoal das longas e incansáveis viagens diárias de ida e volta para casa no ônibus, pelas risadas nos dias de cansaço, pelas conversas, pela amizade e pelo companheirismo, a ida e volta para casa de todos os dias não teria sido alegre e divertida sem a companhia de vocês, Uberlan, Cícero, Gisele, Alessandra e Danilo.

Enfim. A todos, o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 8 |
| | 1.1 <i>Hymenaea courbaril</i> L. | 9 |
| | 1.2 Teste de micronúcleo | 10 |
| 2 | METODOLOGIA | 12 |
| | 2.1 Obtenção do extrato etanólico | 12 |
| | 2.2 Animais | 13 |
| | 2.3 Ensaio Mutagênico..... | 13 |
| | 2.4 Coleta do sangue e preparo das lâminas | 13 |
| | 2.5 Análise citológica | 14 |
| | 2.6 Análise estatística | 14 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 14 |
| | 3.1 Avaliação Mutagênica | 14 |
| 4 | CONCLUSÃO | 18 |
| | REFERÊNCIAS | 19 |

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DO EXTRATO ETANÓLICO DA FOLHA DE *Hymenaea courbaril* L. ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS

Thaís Araújo do Nascimento¹

RESUMO

A *Hymenaea Courbaril* L. (Jatobá), pertencente à família Fabaceae (Leguminosae) é uma planta com ampla distribuição geográfica, muito utilizada como fonte terapêutica para várias enfermidades com efeito vermífugo, antimicrobiano e antioxidante. Com base na crença de que produtos naturais não causam efeitos adversos. Este estudo foi realizado no intuito de avaliar o possível potencial mutagênico do extrato etanólico do jatobá nas doses de 500mg 1000mg e 2000mg/kg p.c. através do teste de micronúcleo em sangue periférico de camundongos. Os animais foram distribuídos em cinco grupos, cada grupo formado por três machos e três fêmeas recebendo as respectivas dosagens de tratamento aplicado via *gavage*. Foi estabelecido um grupo controle positivo no qual os animais foram tratados com ciclofosfamida (50mg/kg p.c.) via intraperitoneal e um grupo controle negativo tratado com água destilada via *gavage*. Após 30 horas do tratamento, foi realizada a coleta sanguínea para o esfregaço e preparo das lâminas, sendo coradas com Giemsa e analisadas em microscopia óptica. Foram observadas diferenças significativas apenas para a dosagem de 2000mg/kg quando comparadas ao controle negativo, apresentando potencial mutagênico. Porém, nas dosagens de 500mg/kg e 1000mg/kg não apresentou significância. Portanto, o extrato etanólico do Jatobá apresentou potencial mutagênico apenas na dosagem de 2000mg/kg.

Palavras-chaves: Jatobá; Mutagenicidade; Extrato vegetal.

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são muito utilizados no restabelecimento da saúde de forma generalizada, sendo algumas vezes, a única fonte de medicação que a população tem acesso, resultado do acúmulo secular de conhecimentos empíricos sobre a ação dos vegetais, em diversos grupos étnicos, predominantemente, utilizados por pessoas adultas e idosas que utilizam na concepção de que a fitoterapia é uma alternativa que apresenta ausência de efeitos adversos (ALEXANDRE, 2005). No entanto, o uso desordenado e a falta de conhecimento podem ser prejudiciais à saúde (FRESCURA, 2012) podendo causar efeitos indesejáveis,

apresentar toxicidade e contra-indicações de uso, acarretar intoxicação e, em caso extremo, a morte.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) vem estimulando a utilização de medicamentos fitoterápicos, como novas alternativas terapêuticas no tratamento de determinadas enfermidades devido ao potencial terapêutico das plantas medicinais. Essa utilização se dá através dos extratos ou dos óleos essenciais, que vem apresentando um crescimento considerável graças ao desenvolvimento de ensaios farmacológicos e aumento do interesse pela pesquisa de novos medicamentos com ação antimicrobiana (LEITE, 2009).

Segundo Alexandre (2005), a fitoterapia torna-se um alvo fácil para automedicação sem responsabilidade, devido à infinidade de plantas medicinais existentes e o desconhecimento dos consumidores sobre o risco de toxicidade que a planta pode apresentar, já que as propriedades terapêuticas não são aplicáveis a todas as espécies. Essa facilidade também se dá pelas dificuldades encontradas por profissionais da área da saúde de encontrarem informações de qualidade a respeito da utilização correta de plantas medicinais.

Há evidências de que muitas plantas utilizadas no dia a dia apresentam compostos químicos alteráveis que podem ser nocivos à saúde (FRESCURA, 2012). As plantas produzem uma diversidade de compostos orgânicos divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento energético, enquanto os metabólitos secundários aparentemente não possuem relação com o crescimento e desenvolvimento da planta, dividindo-se em três grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, e estão envolvidos no processo de defesa da planta (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Algumas vezes, o uso de extratos vegetais e fitoquímicos, como também, o consumo de chás e infusões com finalidades medicinais, tornam-se a única fonte de medicação que a população tem como forma de acesso aos cuidados básicos de saúde, devido à infinidade de utilizações que apresentam e a grande variabilidade existente (GONÇALVES, 2005). Porém, a falta de conhecimento sobre a possível toxicidade que a planta pode apresentar, pode acarretar efeitos inesperados, por isso, o uso deve ser regrado e monitorado, visando alertar aos consumidores sobre os efeitos ou os danos indesejáveis para a saúde (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

1.1 *Hymenaea courbaril* L.

Hymenaea courbaril é popularmente conhecida como jatobá, pertence à família Fabaceae (Leguminosae), sendo uma árvore de grande porte atingindo geralmente, 30 a 45m de altura, possui um fuste cilíndrico, normalmente reto e de copa ampla (COSTA et al., 2011). Possui um súber áspero, de cor acinzentada, suas folhas são compostas, alternas, pecioladas, bifoliada, coriáceas, falciformes ou ovais. Sua inflorescência se dá em panículas terminais e possui frutos do tipo legume indeiscente, lenhoso, quando está no período imaturo apresenta cor verde, quando maduro fica marrom escuro e preto quando velho, tendo entre 8 a 15cm de comprimento. O fruto apresenta de 2 a 6 sementes, envoltas por uma farinha comestível com valor nutritivo, que serve de consumo para a população carente e para animais roedores (CARAVALHO-FILHO et al., 2003; GORCHOV et al., 2004).

O jatobazeiro floresce durante a estação seca e frutifica depois de 3 a 4 meses (SHANLEY, 2010). Encontram-se cerca de quinze espécies no gênero *Hymenaea L.*, distribuídas pelo México, partes tropicais da América Central e do Sul. Das espécies observadas, treze ocorrem no Brasil, entre elas, a *Hymenaea courbaril L.* (COSTA et al., 2011). Sendo utilizada pela população, principalmente no combate a afecções pulmonares, entretanto, foi relatado efeito vermífugo, antifúngico, antioxidante (FERNANDES et al., 2005). A casca é muito utilizada para fazer chá contra gripe, bronquite, cistite, catarro no peito, diarreia, vermes, fraqueza, cólicas, infecções na bexiga e no auxílio da digestão e no tratamento do câncer de próstata (MARINHO et al, 2010).

A maioria das espécies desse gênero possui valor econômico, devido à madeira valorizada por sua durabilidade, sendo muito utilizada na construção civil, na zona urbana e zona rural para produzir canoas. Possuem também usos variados na medicina popular (FERREIRA; SAMPAIO, 1999; VERAS et al., 2010).

Alguns fitoquímicos, são encontrado na *H. courbaril* dentre eles, os terpenos e compostos fenólicos com comprovada propriedade antimicrobiana. A folha possui uma substância química denominada terpenoide, que é utilizada para matar fungos e repelir saúvas e lagartas (SHANLEY, 2005). Os terpenos apresentam várias atividades biológicas, como proteção contra infecções e ataques de insetos (FERNANDES et al., 2005). Gonçalves et al. (2005) verificaram que o extrato das cascas de *H. courbaril* apresentou atividade antimicrobiana contra isolados de *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus*.

1.2 Teste de micronúcleo

No decorrer da vida, o DNA sofre alterações que podem causar mudanças na sequência do DNA de um gene, sendo denominada mutação. As mutações dividem-se em duas 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 de extrema importância como fonte primordial da variabilidade genética dos seres vivos, resultante de modificações estruturais ocorridas no material genético (ALMEIDA E XAVIER, 2005). No ambiente celular, as moléculas de DNA não possuem uma estabilidade absoluta e cada par de bases em uma dupla hélice tem a probabilidade de sofrer mutação (GRIFFITHS, 2009).

A ação de qualquer agente químico genotóxico aparentemente induz o aumento na frequência de micronúcleos. Os tecidos que realizam multiplicação celular podem ser acarretados por aberrações cromossômicas. Para que seja possibilitada a avaliação dos efeitos que agentes mutagênicos podem acarretar é necessário que a amostra esteja em constante divisão mitótica, o que irá possibilitar a identificação dos efeitos tóxicos e as alterações ocorridas ao longo de um ciclo celular (STURBELLE, 2010).

Micronúcleo (MN) é um corpúsculo cromatínico adicional e separado do núcleo principal de uma célula, seu aparecimento se dá pela formação de cromossomos ou fragmentos do mesmo que não são incluídos no núcleo principal durante processo de divisão celular, a mitose (RIEGER, 1968; SCHMID, 1975; RAMIREZ; SALDANHA, 2002). A denominação micronúcleo se dá pela morfologia e composição que é idêntica ao núcleo da célula de origem (SILVA, 2014). Schimidt W., foi o primeiro a descrever o teste de micronúcleo, em 1975 (FLORES, YAMAGUCHI, 2008).

Muitos trabalhos foram realizados tentando postular a relação existente entre o tamanho do micronúcleo e o tipo de alteração cromossômica. Esses estudos realizados mostraram que os fragmentos cromossômicos originavam os micronúcleos menores, enquanto os micronúcleos maiores eram formados por cromossomos inteiros. Essa associação contribuiu para classificar os agentes mutagênicos em clastogênicos, ou seja, compostos que induzem a perda de fragmentos cromossômicos ou aneugênicos que são aqueles que induzem a perda de cromossomos inteiros por segregação cromossômica anormal (VANDERKERKEN et al., 1989).

Um dos ensaios biológicos utilizados como teste de avaliação toxicológica é o teste de micronúcleo (MN), que avalia os danos cromossômicos ocasionados em células expostas a agentes genotóxicos (FENECH et al., 1999; HOLLANDA, 2008). O teste de micronúcleo apresenta uma importância significativa devido à rapidez dos resultados e a facilidade de

realização. Sendo assim, essa técnica tornou-se bastante utilizada, por fornecer resultados com suporte estatístico, além de permitir detectar propriedades genotóxicas a sua utilização garante a segurança de inúmeras substâncias nos mais diversos campos da pesquisa, identifica e avalia diversos fatores que podem trazer algum dano ao DNA de diferentes tecidos, podendo determinar a extensão do dano causado por um agente do ambiente, a partir da presença de micronúcleos nas células no processo de divisão celular do tecido acometido (FENECH et al., 1999; HOLLANDA, 2008). Essa avaliação do potencial mutagênico se faz necessária para incrementar a segurança do uso de plantas medicinais feita pela população.

Os danos causados no DNA pela exposição a agentes mutagênicos são expressos em micronúcleos (MN) após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da quantidade de células em que estão se dividindo (FENECH, 1997). Assim, o aumento na frequência de micronúcleos é um biomarcador de efeitos genotóxicos que refletem a exposição de agentes clastogênicos ou aneugênicos (ALBERTINI, et al., 2000). Portanto, é de extrema relevância para a Toxicologia Genética e Ambiental a realização do teste de micronúcleo que detecta mutações cromossômicas (BONASSI, 2003).

Há um crescente desenvolvimento em avaliações de impactos ambientais, genéticos e de mudança no estilo de vida sobre a estabilidade genômica na população humana. Visto que, a planta possui uma ampla variedade de utilizações com várias finalidades, dentre elas, a importância medicinal, econômica e culinária, entre outras finalidades, ainda assim é necessário incrementar novos estudos (SHANLEY, 2005).

Portanto, este trabalho objetivou determinar o possível potencial mutagênico do extrato da folha de jatobá e contribuir com o aumento de informações a cerca do conhecimento científico e popular.

2 METODOLOGIA

2.1 Obtenção do extrato etanólico

Esta fase foi realizada no Laboratório de Fitoquímica/CCBS/UEPB/Campus I, Campina Grande, PB.

As folhas de *Hymenaea Courbaril* (jatobá) foram coletadas, a partir de plantas adultas selecionadas, respeitando-se suas características fitossanitárias, na localidade São José da Mata (7°11'55.5"S 35°58'57.1"W), município de Campina Grande, estado da Paraíba, sendo a

área selecionada após estudo prévio. A exsicata foi depositada no Herbário Manoel Arruda Câmara (ACAM), Universidade Estadual da Paraíba sob n° 1932.

Após a coleta, as folhas foram embaladas em sacos de papel tipo Kraft, sendo, posteriormente, submetidas ao processo de secagem, em estufa de ventilação forçada, à 40 ± 1 °C, até estabilização da umidade. Após a secagem, o material seco foi triturado em um moinho do tipo Willey®, no qual foi obtido um pó, em seguida peneirado em tamis de numeração 10 mesh. A partir do material vegetal moído e peneirado (pó) foi obtido o extrato etanólico a 96%, na proporção de 100 g do pó vegetal: 0,50 L álcool etanólico, através do método por maceração a frio (PRISTA, 1990), por cinco dias. Posteriormente, o extrato etanólico foi submetido ao processo de filtração, e o produto resultante foi submetido, novamente, a maceração a frio, por mais 5 dias. Em seguida, o extrato foi filtrado e submetido a rotaevaporação a temperatura de 60°C e velocidade de 40 rpm. Após o processo, foi obtido o extrato etanólico concentrado.

2.2 Animais

Foram utilizados camundongos da espécie *Mus Musculus* (Swiss albino) com peso corpóreo variando entre 25 ± 2 gramas, provenientes do laboratório de Biogenética, presente no Complexo Três Marias situado na Universidade Estadual da Paraíba. Os animais foram mantidos em caixas individuais de polipropileno, com tampa-grade, durante o período de tratamento, com água e ração *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura média de 25°C. Os camundongos foram distribuídos em cinco grupos (sendo cada grupo constituído de 3 machos e 3 fêmeas) para cada tratamento realizado, com administração de 0,1 mL de cada uma das substâncias para cada 10 gramas de peso corpóreo.

2.3 Ensaio Mutagênico

Três grupos receberam os tratamentos com as doses do extrato diluído com água destilada em 2000mg/kg, 1000mg/kg e 500mg/kg, via *gavage*. Um grupo foi tratado com água destilada formando o controle negativo e o outro grupo foi tratado com o agente clastogênico ciclofosfamida capaz de induzir uma mutação (50mg/kg p.c.) dissolvida em água destilada em um volume máximo de 0,1mL para cada 10g de p.c., sendo o tratamento via intraperitoneal, formando o controle positivo.

2.4 Coleta do sangue periférico e preparo das lâminas

Após 30 horas após dos referidos tratamentos, foi coletado aproximadamente 5µL de sangue por punção da veia caudal para realização do esfregaço da lâmina. Os esfregaços foram preparados adicionando-se uma gota da suspensão na lâmina (previamente marcada com o código do animal) e com o auxílio de outra lâmina inclinada num ângulo de 45°, de acordo com a metodologia utilizada por Ribeiro et al (2003). Para cada animal foram preparadas duas lâminas e posteriormente codificadas para análise em teste cego. Após 24 horas, essas lâminas foram fixadas no álcool metílico por 10 minutos e secas a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram coradas com Giemsa diluído em solução tampão fosfato com PH 6,8, na proporção de 1:10, durante 15 minutos e posteriormente lavadas com água destilada para retirar o excesso de corante. As lâminas prontas e secas ficaram armazenadas na geladeira até o instante da análise citológica. De acordo com Ribeiro et al (2003), a coloração serve para diferenciar eritrócito policromático (PCE) de eritrócito normocromático (NCE). Eritrócitos policromáticos (PCE) ou jovens se coram de azul claro e eritrócitos normocromáticos se coram de vermelho-telha.

2.5 Análises Citológicas

As análises citológicas foram realizadas por meio de microscopia óptica com aumento de precisão 1000x. Foi feita a análise de 2000 eritrócitos policromáticos (PCE) por animal, ocorrendo assim a verificação da frequência de células micronucleadas nos diferentes tratamentos realizados. Como a frequência de células micronucleadas entre os normocromáticos (NCEs) não aumenta da mesma forma que nos PCEs, tendo este comportamento não se faz necessário analisar NCEs micronucleados (RIBEIRO et al, 2003).

2.6 Análise estatística

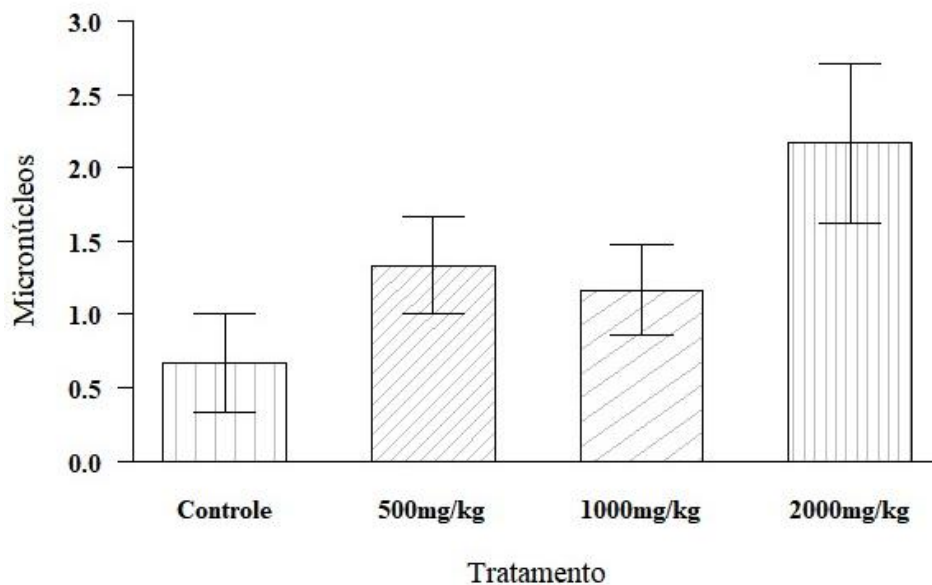
Para a análise estatística dos resultados foi empregado o teste-*t* de Student, com $p < 0,05$ (5%) para as diferenças estatísticas significativas, com o auxílio do software R (R Core Team, 2018) para avaliar o potencial mutagênico foi realizada uma comparação entre a média de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) de cada grupo de tratamento via extrato, com a média do controle negativo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação Mutagênica

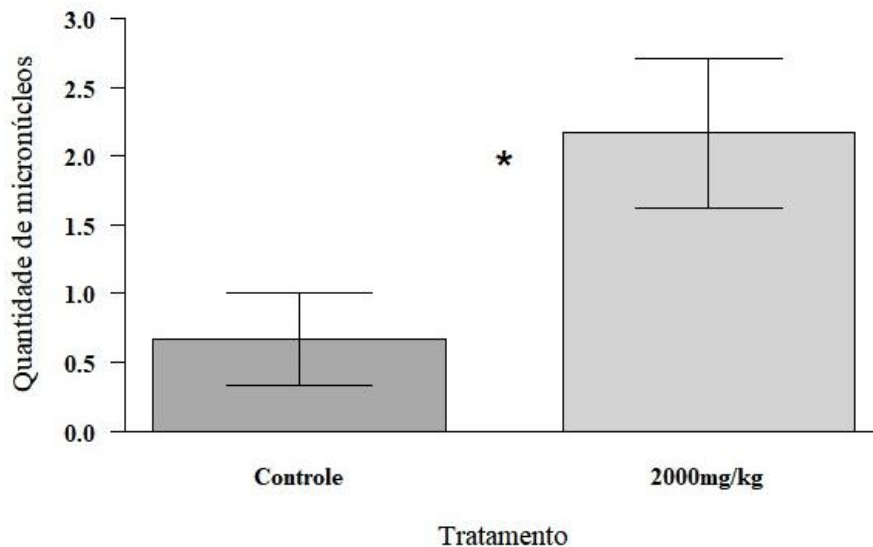
Ao se analisar o potencial mutagênico do extrato etanólico bruto de *Hymenaea courbaril* não induziu danos cromossômicos que indicasse uma ação mutagênica significativa nos eritrócitos policromáticos nas doses de 500mg/kg/p.c e 1000mg/kg/p.c. testadas quando comparadas ao grupo de camundongos do controle negativo (figura 1). Por outro lado, na dosagem de 2000mg/kg/p.c apresentou significância (figura 2) no valor obtido ($t=-2,35$; $gl=8,3$; $p=0,04$). Ao analisar o efeito entre os sexos, verificou-se que não houve diferença significativa na quantidade de micronúcleos.

Figura 1 – Número de micronúcleos encontrados em células submetidas ao tratamento com 500mg, 1000mg e 2000mg/kg comparados ao controle negativo.



Fonte: Autoria própria

Figura 2 – Número de micronúcleos encontrados em células submetidas ao tratamento com 2000mg/kg comparados ao controle negativo.



Fonte: Autoria própria

Na natureza existe uma ampla distribuição de flavonoides, que são pigmentos vegetais e sua presença pode ter relação com funções de defesa e atração de polinizadores. São atribuídas funções diversas aos flavonoides nas plantas e sua importância está relacionada com agentes de defesa contra insetos e microrganismos fitopatogênicos, como vírus, bactérias e fungos, tendo atuação como defensores naturais das plantas na forma de resposta química à invasão de patógenos (SILVA, 2014).

Foram realizados estudos com o ritidoma da espécie *Hymenaea Courbaril* e os resultados obtidos demonstraram a presença de diterpenos, também apresentou atividade relaxante sobre o musculo-liso traqueal de ratos pré-contraídos com K⁺ (potássio). No estudo foi relatado que a presença dos flavonóides astibilina e o ácido oleanólico isolados do súber do jatobá demonstraram propriedades miorelaxante, antioxidante e antiinflamatória (BEZERRA, 2013).

Valentim (2006) relatou em seu trabalho a existência de oligossacarídeos e polissacarídeos na espécie *Hymenaea courbaril*. Foram realizados isolados de oligossacarídeos das sementes e polissacarídeos das folhas. Além disso, também foram isolados diterpenos do tipo halimadieno das folhas, galhos e do tronco de *Hymenaea Courbaril*, onde apresentou atividade citotóxica em células tumorais humanas de ovário.

Um estudo realizado identificou os constituintes químicos presentes no óleo essencial extraído da resina do jatobá e avaliou a atividade antimicrobiana, frente às bactérias;

Salmonella thiphimurium; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus -haemolyticus*, pelo método de difusão de disco em agar. Também foi avaliado o efeito da toxicidade frente às larvas de *Artemia salina*, empregando-se diferentes concentrações (1000; 500; 250; 100; 50; 25; 10; 5; 2,5 e 1 mg/mL) em triplicata (MEYER et al., 1982).

Verma et al. (2013) demonstrou em estudos realizados que concentrações elevadas de flavonóides causaram alterações morfológicas em membranas dos hepatócitos de camundongos, onde promoveu necrose celular e causou a morte do animal. Também foi observado que altas doses destes compostos polifenólicos causaram atividade mutagênica as células de medula óssea de ratos Wistar, em função dos radicais epóxidos formados durante a sua biotransformação no trato gastrointestinal destes animais (PORTO et al. 2013).

Scalbert (1991) relatou que embora esteja bem conhecido o potencial antinutricional dos taninos, algumas plantas e animais usam estratégias para reduzir a adstringência causada por estes compostos. Em frutos, observou o autor, a redução da adstringência não parece ser devido à diminuição das quantidades de taninos e sim pela produção de moléculas com afinidade por estes. Alguns animais, como ratos, que possuem uma dieta rica em taninos conseguem induzir uma liberação maior de proteínas salivares para, assim, se protegerem contra o efeito da adstringência.

Estudos realizados com o intuito de avaliar o potencial mutagênico *in vivo* e *in vitro* de compostos obtidos de extratos metanólicos de plantas do Cerrado, obtiveram resultados onde mostraram que os extratos de *A. gradulosa*, *A. triplinervia*, *Q. multiflora*, e *S. pseudoquina* apresentou potencial mutagênico, devido a presença de grande quantidade de flavonoides e taninos (SANTOS, 2006). *Hymenaea Courbaril* em sua composição apresentam flavonoides, taninos e diterpenos, no entanto, possivelmente a interação entre os flavonoides e taninos juntamente com os diterpenos possa ter inibido um possível potencial mutagênico do extrato nas dosagens de 500mg e 1000mg, tendo apresentado o potencial mutagênico apenas na dosagem de 2000mg/kg.

4 CONCLUSÃO

O uso de plantas medicinais embora apresente um grande potencial terapêutico, há diversos fatores podem causar influência na ação dos princípios ativos presentes nos vegetais e contribuir para o risco da saúde humana. Diante disso, o presente trabalho está buscando

contribuir ao estudo dessa espécie vegetal, almejando comprovar sua atividade mutagênica para garantia da sua eficácia e segurança. Esse estudo resultou em uma significativa colaboração para o desenvolvimento de novas pesquisas as quais buscam também novas perspectivas para obtenção de novas estratégias. Acredita-se que teste possa constituir um biomarcador de baixo custo, na análise do impacto de agentes genotóxicos e também no acompanhamento da remissão de alterações malignas. Além disso, podem ser realizados novos testes a fim de aumentar informações a cerca do vegetal, como também gerar novos resultados para que possam ser comparados.

EVALUATION OF THE MUTAGENIC POTENTIAL OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF *Hymenaea courbaril* L. SHEET THROUGH THE MICRONUCLEUS TEST IN PERIPHERAL BLOOD OF MICE

Thaís Araújo do Nascimento¹

ABSTRACT

Hymenaea Courbaril L. (Jatobá), belonging to the Fabaceae family (Leguminosae) is a plant with wide geographical distribution, widely used as a therapeutic source for various diseases with vermifuge, antimicrobial and antioxidant effect. Based on the belief that natural products do not cause adverse effects. This study was carried out to evaluate the possible mutagenic potential of jatobá ethanolic extract at doses of 500mg 1000mg and 2000mg / kg p.c. by micronucleus testing in peripheral blood of mice. The animals were divided into five groups, each group consisting of three males and three females receiving the respective dosages of treatment applied via gavage. A positive control group was established in which animals were treated with cyclophosphamide (50mg / kg p.c.) via intraperitoneal and a negative control group treated with gavage distilled water. After 30 hours of treatment, blood was collected for smear and slide preparation, stained with Giemsa and analyzed by light microscopy. Significant differences were observed only for the 2000mg / kg dosage when compared to the negative control, presenting mutagenic potential. However, at dosages of 500mg / kg and 1000mg / kg was not significant. Therefore, the ethanolic extract of Jatobá presented mutagenic potential only at a dosage of 2000mg / kg.

Key words - Jatobá; Mutagenicity; vegetal extract.

REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, R. J.; et al. **IPCS, guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans.** Mutation Research, v. 463, p. 111-172, 2000.
- ALEXANDRE, R. F.; et al. **Fitoterapia Baseada em Evidências. Parte 1. Medicamentos Fitoterápicos Elaborados com Ginkgo, Hipérico, Kava e Valeriana.** Acta Farmacêutica Bonaerense, v.24, n.2, p. 300-309, 2005.
- ALMEIDA, N; XAVIER, J. **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.
- BEZERRA, G. P. **Estudo farmacológico bioguiado pela atividade miorrelaxante do extrato etanólico das cascas do caule de *Hymenaea courbaril* L. (Jatobá).** 2013. 219p. Dissertação. (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Mestrado). Universidade Federal do Ceará, UFC, 2013.
- BONASSI, S.; et al. **Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project.** Mutation Research, v. 543, p. 155-166, 2003.
- CARVALHO FILHO, J. L. S.; et al. **Produção de mudas de Jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes ambientes, recipientes e composição de substratos.** Cerne, v.9, p. 109-118, 2003.
- COSTA, W. S., et al. **Jatobá - *Hymenaea courbaril* L.: Ecologia, Manejo, Silvicultura e Tecnologia de Espécies Nativas da Mata Atlântica,** 18p, 2011.
- FENECH, M. **The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method.** Mutation Research, v. 392, p. 11-18, 1997.
- FENECH, M. **The Human Micronucleus Project – International collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans.** Mutation Research. Amsterdam, v.428,n.1-2, p.271-83, 1999.
- FERNANDES, T.T. et al. **Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*.** Revista de Patologia Tropical, v.34, n.2, p.113-122, 2005.
- FERREIRA, C. A. C.; SAMPAIO, P. de T. B. **Jatobá *Hymenaea courbaril*.** In: CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. de T. B.; CLEMENT, C. R. Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização. Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico. Manaus, Amazonas. 409p, 1999.

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

FRESCURA, V. D. S. **Avaliação do potencial antiproliferativo, genotóxico e antimutagênico das espécies *Psychotria brachypoda* (Mull. Arg.) Britton e *Psychotria birotula* Smith & Downs (Rubiaceae)**. 74f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) Universidade Federal Santa Maria. Santa Maria, RS.2012.

GORCHOV, D. L.; et al. **Dispersal of seeds of *Hymenaea courbaril* (Fabaceae) in a logged rain forest in the Peruvian Amazonian**. Acta Amazônica, v.34, p. 251-259, 2004.

GONÇALVES, A. L. et al. **Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas**. Arquivos do Instituto Biológico. v.72, n.3, p.353-358, 2005.

GRIFFITHS, A. **Introdução à Genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2009.

HOLLANDA, N. **The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps**. Mutat. Res., Amsterdam, v.659, n.1-2, p.93-108, 2008.

LÚCIO NETO, M. P. **Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil) – imidazolidina-2,4-diona em células eucarióticas**. UFPI, Teresina, 2011.

LEITE, J.P.V. **Desenvolvimento da Fitoterapia**, In: Leite, J.P.V. Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, p.4-18, 328p, 2009.

MARINHO, M. G. V.; et al. **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de caatinga no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 13, n. 2, p. 170-182, 2010.

MEYER, B. N.; et al. **Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents**. Journal of Medical Plant Research, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

PORTO, L.C.; et al. **Evaluation of acute and subacute toxicity and mutagenic activity of the aqueous extract of pecan shells *Carya illinoensis* (Wangenh.)**. Food and Chemical Toxicology, v. 59, 2013.

PRISTA, L. N. et al. **Técnica farmacêutica e farmácia galénica**. 3ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 1990.

RAMIREZ, A.; SALDANHA, P.H. **Micronucleus Investigation of Alcoholic Patients with Oral Carcinomas**. Genetics and Molecular Research, Ribeirão Preto, v. 1, no. 3, p. 246-260, 2002.

R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

RIBEIRO, L. R.; et al. **Mutagênese Ambiental**. Editora Ulbra. Canoas: 1ª edição, 2003.

RIEGER, R.M.A.; GREEN, M. M. **A Glossary of Genetics and Cytogene-Glossary of Genetics and Cytogenetics**. London: Allen and Unwin, p. 507, 1968.

SANTOS, F. V. **Avaliação da mutagenicidade *in vivo* e *in vitro* de compostos obtidos de plantas nativas do cerrado**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências farmacêuticas, Araraquara, 2006.

SCALBERT, A.; **Phytochemistry**, v. 30, p.3875. 1991.

SCHMID, W. **The micronucleus test**. Mutation Research. v.31 p. 9-15, 1975.

SHANLEY, P.; et al. Bacuri (*Platonia insignis* Mart.). In: SHANLEY, P.; SERRA, M.; MEDINA, G. (Ed.). **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. 2 ed. Bogor: CIFOR, p.55-64, 2010.

SILVA, C. M. A. **Metabólitos secundários de plantas do semi-árido de Pernambuco – uma inovação no controle de fitopatógenos**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2014.

STURBELLE, R. T.; et al. **Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da Aloe vera em teste de Allium cepa e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados**. Revista Brasileira Farmacognisia, v.20, n.3, 409-415, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E. S. **Informações Tóxicas de Alguns Fitoterápicos Utilizados no Brasil**. Revista brasileira de Ciências Farmacêuticas V.42, n.2, 2006.

VALENTIM, A. P. T. **Atividade antimicrobiana, estudo fitoquímico e identificação de constituintes apolares do alburno de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex. Hayne (jatobá)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2006.

VANDERKERKEN, K. et al. **The mouse boné marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens**. Mutagenesis, v. 4, n. 1, p.6-11, 1989.

VERAS, V.S. et al. **Produção de biomassa e estrutura do pasto de capimandropogon em sistema silvipastoril e monocultura**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.61, n.1, p.200-207. 2010.

VERMA M.; et al. **Pharmacological evaluation of hyperin for antihyperglycemic activity and effect on lipid profile in diabetic rats**. Indian Journal of Experimental Biology v. 51, n. 1, p.65-72. 2013.