

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA DE EXTRATOS ETANÓLICOS E DOS ÁCIDOS ARJUNÓLICO E BETULÍNICO ISOLADOS DE *Combretum laxum*

Marcos Rogério da Silva¹, Zaira da Rosa Guterres²

¹Estudante do Curso de Ciências Biológicas da UEMS, Unidade Universitária de Mundo Novo; Email: v4ccine@msn.com

²Professora do Curso de Ciências Biológicas da UEMS, Unidade Universitária de Mundo Novo; Email: zairaguterres@yahoo.com.br

Genética/Mutagenese

Resumo

Várias espécies de plantas da família Combretaceae possuem diversas classes de metabólitos secundários os quais têm apresentado importantes atividades biológicas inclusive contra o câncer. Em estudo fitoquímico realizado com *Combretum laxum* foram obtidos extratos etanólicos (EE) de galhos (EEG) e raízes (EER), além de diversos metabólitos secundários, entre eles os triterpenos: ácido arjunólico (ARJ) e ácido betulínico (ABT). Em face das atividades descritas para biomoléculas presentes em Combretaceae, o presente trabalho avaliou o efeito genotóxico e/ou antígeno-tóxico dos EEG, EER, do ARJ e ABT isolados de *C. laxum*, em células de asas de *Drosophila melanogaster* por meio do ensaio SMART. Para tanto, foram realizados dois cruzamentos: [1] Cruzamento padrão - ST (fêmeas + *flr*³/TM3, *Bd*^s cruzadas com machos *mwh/mwh*); [2] Cruzamento de alta bioativação metabólica - HB (fêmeas ORR; + *flr*³/TM3, *Bd*^s cruzadas com machos *mwh/mwh*). Larvas de 3^o estágio de ambos os cruzamentos foram tratadas cronicamente por 48 horas com três concentrações de EEG e EER - (1,25; 2,5 e 5,0) mg/mL⁻¹. Somente o cruzamento HB foi utilizado nos tratamentos com ARJ e ABT - nas concentrações de (0,5; 1,0; 2,0) mg/mL⁻¹. Para avaliações de genotoxicidade as frequências de manchas mutantes observadas foram estatisticamente comparadas ao controle negativo (água Mili-Q; 1% de Tween-80 e 3% de etanol). Como os resultados indicaram que nenhum dos tratamentos foi genotóxicos, os EE, o ARJ e o ABT foram associados ao Cloridrato de Doxorubicina - 0,125 mg/mL⁻¹ (DXR) e, apresentaram atividade antígeno-tóxica quando comparados ao controle positivo (DXR).

Palavras-Chave: Triterpenos, SMART, *Drosophila*.

Introdução

Os diversos metabólitos secundários isolados de plantas do gênero *Combretum*, apresentaram atividades biológicas significativas, destacando-se inibidora de HIV-1, anti-câncer, entre outras (FULDA et al, 1997; BESSONG et al., 2005). Entretanto, Elgorashi e colaboradores (2003) avaliaram o potencial genotóxico de 51 plantas utilizadas pela medicina popular africana e demonstraram que algumas plantas do gênero *Combretum* apresentaram atividade citotóxica e mutagênica.

Considerando que os metabólitos secundários obtidos de plantas são ferramentas valiosas para a compreensão da biossíntese e desenvolvimento de novos fármacos e, em face das atividades descritas para plantas do gênero *Combretum*, este trabalho justifica-se pela ausência de testes de genotoxicidade ou antigenotoxicidade de extratos etanólicos e triterpenos isolados de *C. laxum*.

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade genotóxica e/ou antigenotóxica dos extratos etanólicos e dos triterpenóides (ácidos arjunólico e betulínico) isolados de galhos e raízes de *C. laxum*.

Materiais e Métodos

O Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática – SMART (do inglês: *Somatic Mutation And Recombination Test*) – foi realizado por meio de cruzamentos experimentais entre linhagens de *Drosophila melanogaster* portando os marcadores: *mwh* – *multiple wing hairs*, *flr³* – *flare*, e *Bd^s* – *beaded serrated*. Com estas linhagens foram realizados dois cruzamentos: [1] cruzamento padrão (ST – *standard cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens “*flr³*” (GRAF et al., 1984); [2] cruzamento de alta bioativação (HB – *high bioactivation cross*, ORR – *Oregon R*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens “ORR; *flr³*” (GRAF; VAN SCHAİK, 1992). Ovos dos dois cruzamentos foram coletados por 8 h em frasco contendo base de ágar-ágar coberta com uma camada de fermento biológico suplementado com açúcar. Larvas de terceiro estágio de desenvolvimento 72 ± 4 h foram lavadas com água corrente e transferidas para frascos de vidros contendo 1,5 g de meio de cultura alternativo, feito com flocos de batata industrializada. Para a detecção da atividade genotóxica, as larvas de ambos os cruzamento (ST e HB) foram tratados cronicamente por um período de 48 h com três concentrações de extratos etanólicos de raízes (EER) e de galhos (EEG) – (1,25; 2,5 e 5,0) mg/mL⁻¹). Somente o cruzamento HB foi utilizado para os tratamentos com os ácidos arjunólico e betulínico nas concentrações de (0,5; 1,0 e 2,0) mg/mL⁻¹. O Cloridrato de Doxorrubicina na concentração de 0,125 mg/mL⁻¹ (DXR) foi

utilizado como controle positivo (CP), e como controle negativo (CN) utilizou-se água Milli-Q, 1% de *Tween-80* e 3% de etanol. Para avaliação da atividade antigenotóxica, os compostos supracitados, em suas respectivas concentrações, foram associados ao DXR na mesma concentração do CP. Adultos emergentes portadores dos dois tipos de genótipos: *mwh + / + flr³* ou *mwh + / + TM3, Bd^s*, foram coletados e fixados em etanol 70%. A montagem das lâminas permanentes fez-se com auxílio de lupa e pinças, as asas foram fixadas por meio de solução de Faure, entre a lâmina e a lamínula. Posteriormente, foram analisadas sob microscópio óptico, quando encontradas, as manchas eram registradas quanto tamanho e tipo para os diagnósticos estatísticos.

Para a avaliação da atividade genotóxica as frequências de manchas mutantes observadas nos tratamentos foram estatisticamente comparadas ao CN de acordo com Frei e Würigler (1988). Para a avaliação de antigenotoxicidade os extratos e os triterpenóides foram associados ao DXR, na mesma concentração do CP, com o qual posteriormente as frequências de manchas foram comparadas de acordo com Kastenbaum e Bowman (1970). Com base nas frequências de manchas corrigidas pelo CN, as porcentagens de inibições induzidas pelos tratamentos associados ao DXR foram calculadas como proposto por Abraham (1994), usando a fórmula:

$$\left(\frac{\text{DXR sozinho} - (\text{Tratamento associado ao DXR})}{\text{DXR sozinho}} \right) \times 100.$$

Resultados e Discussão

Os extratos etanólicos (EE) obtidos de plantas, geralmente são constituídos por diversas classes de metabólitos secundários (flavonóides, taninos, bibenzilas, estilbenos e fenantrenos). A grande maioria quando avaliados por meio de SMART, não apresentam atividade genotóxica (GUTERRES, 2008). Ficou evidente que, nas concentrações utilizadas, os EER e EEG não são genotóxicos, uma vez que as frequências de manchas mutantes observadas nos grupos tratados, não diferem significativamente do controle negativo. Este resultado pode ser atribuído aos metabólitos secundários encontrados nos referidos extratos, tendo em vista que o ARJ e ABT não são genotóxicos. O presente trabalho corrobora com o trabalho de Villaseñor e colaboradores (2004), tendo em vista que os triterpenóides avaliados não apresentaram atividade genotóxica. Uma vez comprovado a ausência de efeitos genotóxicos dos EER, EEG, ARJ e ABT, obtidos de *C. laxum*, os mesmos foram testados em associação com DXR, para avaliação de antigenotoxicidade.

Nos gráficos 1 e 2 observa-se que os resultados obtidos indicam maior inibição da genotoxicidade do DXR com o aumento na concentração dos EER, EEG, ARJ e ABT.

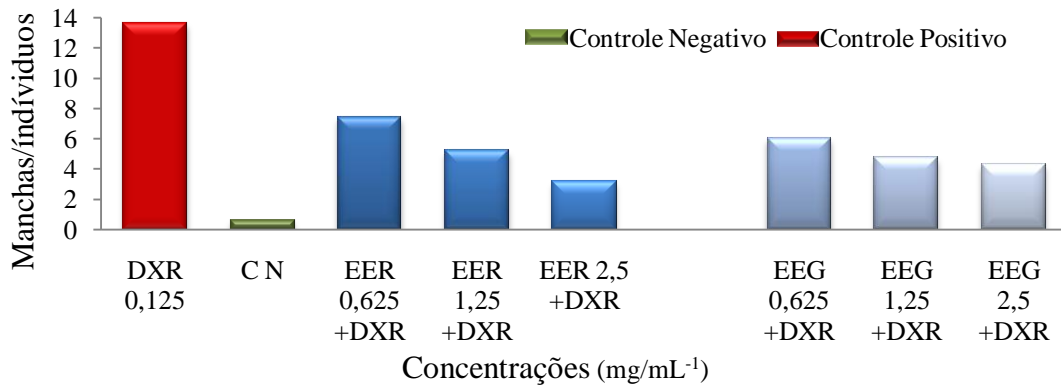


Gráfico 1: Antigenotoxicidade - Frequências de Manchas por indivíduo (HB) - obtidas com extratos etanólicos de raízes (EER) e galhos (EEG) extraídos de *C. laxum*.

Os resultados para EER, nas concentrações de (0,625 e 2,5) mg/mL⁻¹, mostraram, respectivamente, uma redução de 48 % a 80 % da genotoxicidade induzida pela DXR, enquanto os indivíduos tratados com EEG apresentaram inibição de 58 % a 72 %.

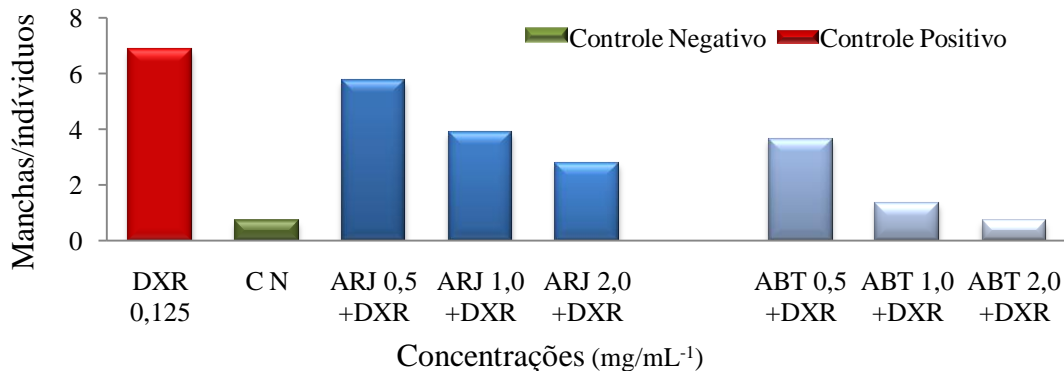


Gráfico 2: Antigenotoxicidade - Frequências de Manchas por indivíduo (HB) - obtidas com ácido arjunólico (ARJ) e betulínicos (ABT) extraídos de *C. laxum*.

Quando comparado ao controle positivo, o ARJ apresentou uma inibição de 17,8 % a 65%, enquanto que o ABT reduziu todos os tipos de manchas e a frequência de inibição variou de 52 % a 89 %, respectivamente nas concentrações de (0,5 e 1,0) mg/mL⁻¹. A concentração de 2,0 mg/mL⁻¹ apresentou uma redução total dos efeitos genotóxicos ocasionados pela DXR.

Os resultados obtidos evidenciam relação positiva entre o aumento da concentração e a atividade antigenotóxica dos EER e EEG, e que podem ser atribuídos aos metabólitos secundários encontrados nos referidos extratos, sendo o ácido betulínico mais eficiente que o arjunólico.

Agradecimentos

À divisão de pesquisa, Fundect e Ederson Bisoli (UFMS).

Referências

Abraham S. K. 1994. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. **Mutagenesis**, v. 9, p. 383-386.

Bessong, P.O., Obi, C. L., Andreola, M. L., Rojas, L. B., Pouysegue, L., Igumbor, E., Meyer, M., Quideau, S., Litvak, S. 2005. Evaluation of selected South African medicinal plants for inhibitory properties against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 83-91.

Elgorashi, E. E., Taylor, J. L. S., Maes, A., Taden, J., Kimpe, N., Verschaeve, L. 2003. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 195-207.

Frei, H., Würigler, F. E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203, 4 ed., p. 297-308.

Fulda, S., Friesen, C., Los, M., Scaffidi, C., Mier, W., Benedict, M., Nuñez, G., Krammer, P. H., Peter, M. E., Debatin, K. M. 1997. Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. **Cancer Research**, v. 57, p. 4956-4964.

Graf, U., Van Schaik, N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *D. melanogaster*. **Mutation Research**, v. 271, p. 59-67.

Graf, U., Würigler, F. E., Kats, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., Kale, P. G. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, 2 ed., p. 153-188.

Guterres, Z. R. 2008. **Investigação das atividades mutagênica, antimutagênica e antioxidantes de extratos etanólicos de *Aiouea trinervis*, *Nectandra cissiflora*, *Ocotea minarum* (Lauraceae) e dos alcalóides triptofol, ocoteína e dicentrina**. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal de Uberlândia – MG.

Kastenbaum, M. A., Bowman, K. O. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. **Mutation Research**, v. 9, p. 527-549.

Villaseñor, I. M., Canlas, A. P., Faustino, K. M., Plana, G. K. 2004. Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl.) Masam leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 53-56.