

Avaliação da Atividade Antimutagênica do Látex da *Synadenium umbellatum* pelo Teste de AMES

Bruno Franco Fernandes Barbosa¹, Lee Chen Chen²
Instituto de Ciências Biológicas, UFG, 74001-970, Brasil
brunofrancof@gmail.com; chenleego@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: *Synadenium umbellatum*, látex, antimutagenicidade

1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, o conhecimento das propriedades medicinais das plantas se desenvolveu a partir de observações do homem no comportamento instintivo dos animais em restaurar suas feridas ou aliviar suas enfermidades (ALONSO, 1998). O conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais contribuiu significativamente para a divulgação das ações terapêuticas destas (MACIEL et al., 2002). Entretanto, poucas plantas foram avaliadas cientificamente quanto às suas atividades biológicas, sobretudo a respeito da sua segurança e eficácia (WHO, 1999). Segundo ALONSO (1998), das 274 mil espécies botânicas conhecidas no mundo, somente 1% tem sido estudado.

A composição química de muitas espécies vegetais não é conhecida. Vários compostos já isolados de muitas espécies ainda não foram estudados quanto as suas atividades biológicas. (DI STASI, 1996 apud FERREIRA, 1999). Alguns desses compostos já foram identificados como mutagênicos e carcinogênicos, a exemplo de alguns flavonóides, hidrazinas, alcalóides e quinonas (PEREIRA, 1992). Por outro lado, as plantas podem conter substâncias antimutagênicos, como os beta-carotenos (vitamina A) e o ácido ascórbico (BOREK, 1996). Além disso, estas possuem uma longa história de uso no tratamento de câncer. Muitos compostos obtidos a partir delas podem agir como protetores à carcinogênese humana, inibindo os estágios de iniciação, promoção ou progressão tumoral (EDENHARDER et al., 1993).

¹ Orientando

² Orientadora, docente do Instituto de Ciências Biológicas

A detecção da potencialidade antigenotóxica de compostos químicos pode ser avaliada em diferentes sistemas biológicos, os mesmos empregados para a identificação de agente genotóxicos e mutagênicos. Estes testes podem ser realizados tanto em procariotos como eucariotos, podendo ser de longa ou curta duração. Dentre os “testes rápidos” ou de curta duração, podemos destacar os ensaios em eritrócitos de medula óssea de roedores, o teste de mutagenicidade em linhagens de *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) e o teste de indução do profago λ em cepas de *Escherichia coli* (induteste SOS).

A avaliação da atividade antimutagênica de substâncias pode ser realizada através do teste de Ames. Este teste fundamenta-se na avaliação do número de mutantes revertentes da cepa *Salmonella typhimurium* que, após tratamento com agentes indutores, podem vir a sofrer reversão para a prototrofia à histidina. Devido à composição do meio, só haverá formação de colônias prototróficas para a histidina, provenientes de mutações espontâneas, ou pela reversão induzida por agentes indutores. O co-tratamento com agentes antimutagênicos poderá atenuar o aparecimento de lesões no DNA, ou seja, haverá diminuição na formação de colônias revertentes. Desta forma, os agentes antimutagênicos podem atuar como agentes desmutagênicos, isto é, agindo diretamente sobre os compostos que induzem mutações no DNA, inativando-os química ou enzimaticamente, inibindo a ativação metabólica de pró-mutagênicos ou seqüestrando moléculas reativas (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

O Brasil possui uma das mais ricas floras do mundo com mais de 56.000 espécies vegetais (excluindo fungos) – aproximadamente 19% da flora mundial (GIULIETTI *et al.*, 2005). O cerrado, segundo maior bioma brasileiro, também apresenta grande diversidade biológica (FERREIRA, 1999). Segundo RATTER e colaboradores (1997), o cerrado abrange dois milhões de km² representando 23 % da área do Brasil, onde estima-se que existam 160.000 espécies de plantas, fungos e animais. Espera-se, portanto, que a diversidade de espécies que compõem este bioma tenha forte influência na medicina popular. Dentre as plantas de uso popular que compõe esta vegetação encontra-se a *Synadenium umbellatum*.

A *S. umbellatum* é popularmente designada como cola-nota ou cancerola. Segundo ORTENCIO (1997), esta planta é indicada para o tratamento de câncer, doença de Chagas, cólica de menstruação, diabetes, dores no corpo, gripe, hemorragias internas, impingem, impotência sexual, lepra, obesidade, tumores e úlcera nervosa. É uma espécie vegetal pertencente à ordem Geraniales e à família Euphorbiaceae. Esta família está distribuída em todo o mundo, principalmente, em regiões tropicais. O látex de algumas espécies desta família pode ser incolor ou leitoso com grãos de amido (JOLY, 1977). Já se têm estudos com outras espécies do gênero quanto à atividade antiinflamatória (JÄGER *et al.*, 1996; ROGERIO *et al.*,

2007). Existem, para outros gêneros das Euforbiáceas, relatos da atividade antitumoral (KUPCHAN *et al.*, 1976; SCHRODER *et al.*, 1980; HUBERT ; DE-THÉ, 1982; ABO *et al.*, 1988). Estudos recentes utilizando folhas e o látex de *S. umbellatum* identificaram mutagenicidade, citotoxicidade, atividade antitumoral, anti-angiogênica e angiogênica (VALADARES *et al.*, 2007; NOGUEIRA *et al.*, 2008; MELO-REIS, 2010).

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimutagênica do látex da *Synadenium umbellatum* pelo teste de Ames.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais utilizados para o teste de Ames

3.1.1 Látex extraído do tronco da *S. umbellatum*

Foi utilizado para os experimentos o látex de *S. umbellatum* coletado em região Central de Goiânia, Goiás. A exsicata foi depositada no herbário da UFG sob o nº 40.006/UFG.

3.1.2 Cepas bacterianas

Foram utilizadas cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium* TA-97a e TA 100.

3.1.3 Meios de cultura e soluções

Foram utilizados: Top-ágar; Solução de cloreto de sódio a 0,5%; Solução de histidina / biotina (0,5 mM); Caldo Nutriente e Meio Mínimo Glicosado (MMG) contendo solução VB 50X (sulfato de magnésio heptahidratado, ácido cítrico monohidratado, fosfato de potássio dibásico, fosfato de sódio e amônio) e solução de dextrose (40%).

A preparação do top-ágar consistiu na adição da solução de cloreto de sódio a 0,5 % e solução de histidina / biotina (0,5 mM) ao ágar estéril na concentração de 0,6%. O Meio Mínimo Glicosado (MMG) foi preparado da seguinte maneira: a um litro de ágar

estéril na concentração de 1,5 % foi adicionado 50 mL da solução de glicose a 40 % e 20 mL da solução VB 50X . Essa mistura foi homogeneizada e distribuída em placas. Estas foram deixadas em repouso por 12 horas em estufa a 37°C para posterior utilização.

3.2 Procedimento experimental

O procedimento experimental resume-se da seguinte maneira: as linhagens TA-97a ou TA-100 foram inoculadas no Caldo Nutriente estéril e mantidas a 37°C sob agitação por 12 horas. Em seguida, as culturas “pernoite” (0,1mL) de cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium* TA-97a e TA-100 , em fase estacionária de crescimento, foram incubadas em diferentes concentrações de látex de *S. umbellatum* concomitantes ao controle positivo específico para cada cepa, em tubos em triplicata com agitação e aeração constantes. Após o período de incubação, foram adicionados 2 mL de ágar glicosado liquefeito (top-Ágar), à temperatura de 45°C, contendo a solução de histidina / biotina a 0,5 mM. A mistura foi vertida em placas, em triplicata, contendo MMG sólido (meio mínimo glicosado), as quais foram incubadas a 37°C durante 48 horas.

Posteriormente, foi contado o número de colônias revertentes prototróficas para a histidina. Os controles positivos e negativos foram incluídos nos experimentos e, conforme recomendam Maron e Ames (1983):

No controle negativo, utilizou-se água destilada. Nos controles positivos, os reagentes foram específicos para cada cepa: 4-nitroquinolina (4NQO) – para a cepa TA-97a (0,5 µg) e Azida sódica – para a cepa TA-100 (1,5 µg).

3.3 Análise dos resultados

Após a contagem do número de revertentes, os resultados obtidos foram avaliados pelo teste *t* de Student e comparados em relação aos respectivos controles positivos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Admite-se como resultado antimutagênico, quando o número de colônias revertentes nas placas testes for estatisticamente inferior ao número de colônias revertentes prototróficos à histidina do controle positivo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos da avaliação da atividade antimutagênica do látex da *Synadenium umbellatum* para as linhagens de *S. typhimurium* testadas estão mostradas nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Valores obtidos da média aritmética de três experimentos realizados para as linhagens TA-100. Média aritmética (\bar{x}) do número de colônias revertentes prototróficas para a histidina e desvio padrão (S).

Doses de <i>S. umbellatum</i> (μg)	TA-100 $\bar{x} \pm S$
Controle Positivo (4NQO)	2032 \pm 83♥
50	1831 \pm 318♥
100	2001 \pm 319♥
200	2327 \pm 288■
500	2556 \pm 159▼
Controle Negativo (H₂O)	201 \pm 68*

Número de células revertentes prototróficas – Símbolos diferentes na mesma coluna indicam que existe diferença significativa entre números de revertentes prototróficos e o controle positivo ($p < 0,05$). Símbolos iguais na mesma coluna mostram que não existe diferença significativa entre o número de revertentes e o controle positivo ($p > 0,05$).

Tabela 2. Valores obtidos da média aritmética de três experimentos realizados para as linhagens TA-97a. Média aritmética (\bar{x}) do número de colônias revertentes prototróficas para a histidina e desvio padrão (S).

Doses de <i>S. umbellatum</i> (µg)	TA-97a $\bar{x} \pm S$
Controle Positivo (4NQO)	582±30 ■
50	693± 71 ■
100	1039± 150 ♣
200	1271±57 ●
500	1825 ±73 ♥
Controle Negativo (H₂O)	166± 50*

Número de células revertentes prototróficas – Símbolos diferentes na mesma coluna indicam que existe diferença significativa entre números de revertentes prototróficos e o controle positivo ($p < 0,05$). Símbolos iguais na mesma coluna mostram que não existe diferença significativa entre o número de revertentes e o controle positivo ($p > 0,05$).

Há diversas linhagens de *Salmonella typhimurium*, modificadas geneticamente utilizadas para se detectar um tipo predominante de mutação, dentre elas podemos citar a TA-100 e TA-97a. A linhagem TA-97a permitem avaliar a mutagênese por deslocamento do quadro de leitura do DNA apresentando mutação no gene *hisD6610* e alvo para mutação os resíduos GC. A mutação *hisG46* presente na linhagem TA100 ocorre no gene que codifica a primeira enzima do processo de biossíntese da histidina, através da substituição do códon selvagem GGG (CCC) – prolina – por GAG (CTC) – leucina. Assim, essa cepa detecta mutações capazes de causar substituição dos pares de bases nitrogenadas, principalmente do par G-C (MARON; AMES 1983).

Dessa forma, avaliamos através das linhagens TA-100 e TA-97a a capacidade do látex de *Synadenium umbellatum* em diminuir os danos causados por agentes indutores capazes de provocar mutações de ponto por substituição de bases ou do tipo “frameshift” (deslocamento no quadro de leitura) no genoma da *S. Typhimurium*.

Os resultados obtidos indicam que todas as doses do látex da *Synadenium umbellatum* não apresentaram atividade antimutagênica para as cepas TA-97a e TA-100. Na linhagem TA-97a, o número de revertentes prototróficos de todas as doses tratadas foram significativamente superiores ($p < 0,05$) em relação aos revertentes induzidos do controle positivo, exceto na dose de 50 μg onde não foi constatada diferença significativa em relação ao controle positivo ($p > 0,05$).

A linhagem TA-100 tratada com as doses de 50 μg e 100 μg do látex de *S. umbellatum* não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao número de revertentes induzidos do controle positivo. Porém, nas doses mais elevadas (200 μg e 500 μg) foi verificada diferença significativa de revertentes em relação ao controle positivo ($p < 0,05$).

Dessa maneira, pode-se sugerir que o látex de *Synadenium umbellatum*, em doses mais elevadas, atua sinergicamente com agentes indutores de lesões no DNA (azida sódica ou 4-nitroquinolina). De acordo com resultados obtidos anteriormente, o látex de *S. umbellatum* pode causar mutações do tipo “frameshift” (alterações no quadro de leitura do DNA) e, também, mutações capazes de causar substituição dos pares de bases nitrogenadas (BARBOSA; CHEN- CHEN; 2010). Estes resultados obtidos estão em concordância com a atividade mutagênica do extrato etanólico das folhas de *S. umbellatum* sobre as células da medula óssea de camundongos, descrita na literatura (VALADARES, 2007).

5. CONCLUSÃO

O látex de *Synadenium umbellatum* não apresentou atividade antimutagênica e foi constatada uma ação sinérgica com agentes indutores de lesões no DNA (azida sódica ou 4-nitroquinolina).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABO, K.A. Screening extracts of *Euphorbia garuana* N.E.Br. for *in vitro* cytotoxicity. **Afr. J. Med. Med. Sci.**,Nigeria, v. 17, p. 227-230, 1988.

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina:** bases clinicas y farmacológicas, p.17-55. Buenos Aires: ISIS Ediciones, 1998.1039 p.

ANTUNES, L. M. G. ; M. C. P. ARAUJO. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Revista Nutricional**, Ribeirão Preto, v. 13, n.2, p. 81-88, 2000.

BARBOSA, B.F.F.; CHEN-CHEN, L. Avaliação da atividade mutagênica do látex de *Synadenium umbellatum* pelo teste de Ames. In: VII Congresso de Pesquisa, Ensino, Ensino e Extensão, 2010. Goiânia. **Anais do VII Congresso de Pesquisa, Ensino, Ensino e Extensão, Conpeex** : Goiânia, 2010.

BOREK, C. The role of nutritional factors in cellular protection against DNA damage, altered gene expression and malignant transformation. Em: **Mechanisms of DNA Damage and Repair**. Ed. by Michael G. Simic, Lawrence Grossman and Artu C. Upton. Sacis life Science. Vol. 38, pp. 557-562. Plenum Press. New York and London. 1996.

EDENHARDER, R.; VON PETERSDOFF, I.; RAUSCHER, V. Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. **Mutation Research**, v.287, n.2, p.261-274. 1993.

FERREIRA, H.D. O uso popular de plantas medicinais e o seu aproveitamento no campo científico. In: WORKSHOP PLANTAS MEDICINAIS DO CERRADO, 1999, Mineiros. **Plantas medicinais do cerrado: Perspectivas comunitárias para a saúde, o meio ambiente e o desenvolvimento sustentável**. Mineiros: Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior, 1999, p. 250.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; DE QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L., BERG, C.V.M. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, Feira de Santana, v. 01, n. 01, p. 52, 2005.

HUBERT, A.; DE-THÉ, G. Dietary behavior, way of life and nasopharyngeal cancer. **Bull. Cancer**, Paris, v. 5, p. 476-482, 1982.

JÄGER, A.K.; HUTCHINGS, A.; VAN STADEN, J. Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors. **J. Ethnopharmacol.**, Scottsville ,v. 52, p. 95-100, 1996.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 4. ed. Sao Paulo: Nacional, 1977. 87 p.

KUPCHAN, S.M.; UCHIDA, I.; BRANFMAN, A.R.; DAILEY, R.G.; FEI, B.Y. Antileukemic principles isolated from euphorbiaceae plants. **Science**, v.191, p. 571-572, 1976.

MACIEL, M.A.M; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 25, p. 429-438, 2002.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, California, v. 113, p. 173-215, 1983.

MELO-REIS, PR.; ANDRADE, LS.; SILVA, CB.; ARAÚJO, LMM.; PEREIRA, MS.; MRUE, F.; CHEN-CHEN, L. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 1, v. 70, 2010.

NOGUEIRA, I.A.L.; LEÃO, A.B.B.; VIEIRA, M.S.; BENFICA, P.L.; DA CUNHA, L.C.; VALADARES, M.C. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. **J. Ethnopharmacol.**, Goiânia, v. 120, n. 3, p. 474-478, 2008.

ORTENCIO, W.B. **Medicina popular do Centro-Oeste**. 2 ed. Brasília: Theasurus, 1997.

PEREIRA, C. A. Em: **Plantas Tóxicas e Intoxicações na Veterinária**. Ed. UFG-GO. 1992.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, Planaltina, v. 80, p. 223-230, 1997.

ROGERIO, A.P. ; CARDOSO, C. R. ; FONTANARI, C. ; SOUZA, M. A. ; AFONSO-CARDOSO, S. R. ; SILVA, E. V. ; KOYAMA, N. S. ; BASEI, F. L. ; SOARES, E. G. ; CALIXTO, J. B. ; STOWELL, S. R. ; DIAS-BARUFFI, M. ; FACCIOLI, L.H. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology**, Ribeirão Preto, n. 8, v. 17, p. 795-804, 2007.

SCHRODER, G.; ROHMER, M.; BECKT, J.P.; ANTON, R. 7-oxo-, 7 α -hydroxy and 7 β -hydroxysterols from *Euphorbia fischeriana*. **Phytochemistry**, Strasbourg, v. 19, p. 2213-2245, 1980.

VALADARES, M.C.; DE CASTRO, N.C.; DA CUNHA, L.C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 631-638, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Monographs on selected medicinal plants**: 1999. Geneva, v. 01. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/1999/9241545178.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2010.