

NATHALIA NOVAK ZOBIOLE

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS, ANTIMUTAGÊNICOS E
IMUNOMODULATÓRIO *IN VIVO* DA FRAÇÃO HIDROMETANÓLICA DE
ANNONA NUTANS E EXTRATO METANÓLICO DE *BYRSONIMA*
VERBASCIFOLIA

CAMPO GRANDE-MS

2015

NATHALIA NOVAK ZOBIOLE

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS, ANTIMUTAGÊNICOS E
IMUNOMODULATÓRIO *IN VIVO* DA FRAÇÃO HIDROMETANÓLICA DE
ANNONA NUTANS E EXTRATO METANÓLICO DE *BYRSONIMA*
VERBASCIFOLIA

.

Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, na área de Saúde e Tecnologia na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Orientador: Dr. João Máximo de Siqueira

Coorientador: Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

CAMPO GRANDE-MS

2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

NATHALIA NOVAK ZOBIOLE

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS, ANTIMUTAGÊNICOS E
IMUNOMODULATÓRIO *IN VIVO* DA FRAÇÃO HIDROMETANÓLICA DE
ANNONA NUTANS E EXTRATO METANÓLICO DE *BYRSONIMA*
VERBASCIFOLIA

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-
Oeste da Universidade Federal de
Mato Grosso do Sul – UFMS para a
obtenção do título de Doutor.

Resultado _____
Campo Grande (MS), 18 de Junho de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Maximo de Siqueira
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Angela Maria Zanon
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos.
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Aline Ferreira dos Santos
Instituição: Unigran

Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!

Veronica Shoffstall

Aos meus pais José Domingues
e Diloê Irene Zobiole
que sempre estiveram ao meu lado
e por continuarem a me ajudar e apoiar
a correr atrás dos meus sonhos.

Aos meus avós Terezinha, in memoriam,
E Angelo Zobiole

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Mato Grosso do sul, por ter-me possibilitado desenvolver este trabalho.

Ao Prof. Dr. João Máximo de Siqueira pela orientação, dedicação, ensinamentos, estímulo, apoio, paciência e ainda por não me deixar desistir.

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo pelas contribuições da parte fitoquímica de *Byrsonima verbasifolia*.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste pelos valiosos ensinamentos.

Aos animais que deram a vida, sem direito de escolha.

Às “meninas do lab”, Mayra, Stephanie, Sara, Pam e Bia pelo auxílio nos experimentos, paciência, apoio, compreensão, ajuda em todos os momentos.

A amiga Cíntia Alves de Souza Pereira e sua família, um agradecimento mais que especial, por continuar sendo um dos melhores acontecimentos desses anos, pelas alegrias, conversas, festas, conselhos e por me ajudar em todos os momentos, tanto nos profissionais quanto nos pessoais, sempre com bom humor e paciência.

As amigas Jan e Re que sempre se preocuparam comigo, me ajudaram a vencer os momentos mais difíceis e ainda mesmo não sendo da área a escrever os textos.

A Marjo pela paciência e compreensão nos momentos de loucura.

A Jaque (minha mãe em Campo Grande), João e Dudu que me ajudaram muito a concluir essa etapa.

Ao Alisson que me ajudou a compreender os resultados de fitoquímica.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

ANHMF – fração hidrometanólica das folhas de *Annona nutans*

BHT – 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol

CF - ciclofosfamida

DMSO - dimetil sulfóxido

EHMB – extrato bruto das folhas de *Annona nutans*

EX - extrato

FAcOEt – fração acetato de etila das folhas de *Annona nutans*

FCHCl₃ – fração clorofórmica das folhas de *Annona nutans*

FHEX - fração hexânica das folhas de *Annona nutans*

MN - micronúcleos

SF - solução fisiológica

RESUMO

O uso de plantas medicinais na prevenção e tratamento de doenças é empregado desde os primórdios da civilização em diversas culturas. Atualmente essas plantas destacam como sendo uma promissora fonte de agentes anticancerígenos, com seus extratos sendo utilizados na quimioprevenção. Diante desta perspectiva, o presente trabalho avaliou a atividade mutagênica, antimutagênica e imunomodulatória *in vivo* da fração hidrometanólica das folhas *Annona nutans* e do extrato metanólico de *Byrsonima verbascifolia*. Para tanto, foram realizados ensaios do micronúcleo em sangue periférico, fagocitose esplênica e contagem diferencial de células do sangue. Para a fração e o extrato foram utilizados machos Swiss adultos (n=10/grupo), divididos nos seguintes grupos: controle negativo, controle positivo, extrato, pré-tratamento dose única, pré-tratamento doses múltiplas, tratamento simultâneo, pós-tratamento, tratamento contínuo. A coleta de sangue para os ensaios do micronúcleo e contagem diferencial de células sanguíneas foi realizada por punção da veia caudal em 24 (T1), 48 (T2) e 72 horas (T3) após o tratamento com ciclofosfamida ou veículo. Após a coleta os animais foram submetidos à eutanásia para coleta do baço destinado à fagocitose esplênica. Os resultados do ensaio do micronúcleo mostraram que a fração e o extrato apresentaram atividade antimutagênica: *Annona nutans*, nos grupos de pré-tratamento com dose única pré-tratamento com doses múltiplas e doses contínuas, houve reduções de danos de 91,44%, 41,18% e 91,44% , respectivamente, em T1 e 83,58%, 79,48% e 83,58% repectivamente em T2; e para *Byrsonina verbascifolia*, nos grupos de pré-tratamento com dose única, pré-tratamento em doses múltiplas observaram reduções de danos 63% e 48%, respectivamente, em T1 e 92%, 95% , respectivamente, em T2. Em relação ao ensaio de fagocitose esplênica, observou-se que a fração e o extrato, isoladamente e/ou associado à ciclofosfamida, aumentaram a atividade fagocítica, exceto no pós-tratamento e simultâneo somente para o extrato. Quanto aos valores referentes à contagem diferencial de células sanguíneas, estes se mostraram dentro dos padrões de referência/normalidade. Assim, sugere-se que a fração e o extrato possuem atividade antimutagênica, agindo

possivelmente e preferencialmente por desmutagênese, sendo que os micronúcleos são retirados da corrente sanguínea por um aumento da atividade fagocitária, caracterizando assim a imunomodulação. Dessa forma, esses resultados sugerem que a fração e o extrato testados possuem atividade quimioprotetora.

Palavras –chaves: *Byrsonima verbascifolia*, *Annona nutans*, antimutagênico

Abstract

The use of medicinal plants in the prevention and treatment of diseases is being used since the dawn of civilization among different cultures. Currently, these plants stood out for being a promising source of anticancer agents, with their extracts being used in chemoprevention. Given this perspective, this study evaluated the mutagenic, antimutagenic and immunomodulatory in vivo hydromethanol fraction of the leaves from the *Annona nutans* and methanol extract of *Byrsonima verbascifolia*. Therefore, micronucleus assays were performed on peripheral blood, spleen phagocytosis and differential counting of blood cells. For the fraction and the extract males Swiss adults were used (n = 10 / group), divided into the following groups: negative control, positive control, extract, single dose pretreatment, multiple doses pretreatment, simultaneous treatment, post-treatment and continued treatment. Blood collection for micronucleus tests, and blood cell differential counting was performed by puncture of the tail vein 24 (T1), 48 (T2) and 72 hours (T3) after treatment with cyclophosphamide or vehicle. After collecting the animals were sacrificed to collect the spleen for the splenic phagocytosis. The results of the micronucleus test showed that the fraction and extract antimutagenic activity: *Annona nutans* the percentages of damage reduction in groups pre-treated with a single dose pretreatment, multiple doses and continuous doses were 91.44%, 41,18% and 91.44%, respectively, T1 and 83.58%, 79.48% and 83.58% at T2 charge respectively; and *Byrsonina verbascifolia*, in groups pre-treated with a single dose pretreatment of multiple doses observed reductions damage 63% and 48% respectively in T1 and 92%, 95%, respectively, T2. Regarding the spleen phagocytosis assay, it was observed that fraction and extract, separately and/or in combination with cyclophosphamide increased the phagocytic activity except in the post-treatment and for extract simultaneous. The white cells differential blood count were within the reference/normal range. Thus, it is suggested that the fraction and extract have antimutagenic activity, possibly by acting and preferably desmutagenese, with micronuclei are removed from the bloodstream by an increase in phagocytic activity, thus demonstrating immunomodulation. Thus, these results suggest that the fraction and extract tested have chemoprotective activity.

Keywords: *Byrsonima verbascifolia*, *Annona nutans*, antimutagenic.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	vix
1. Introdução	12
1.1 Família Annonaceae	16
1.1.1 <i>Annona nutans</i>	17
1.2 Família Malpighiaceae Juss	18
1.2.1 <i>Byrsonima verbascifolia</i>	20
1.3 Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade	23
1.4 Ensaios Biológicos	23
1.4.1 Teste do micronúcleo em sangue periférico	23
1.4.2 Contagem diferencial de sangue periférico	24
1.4.3 Ensaio de Fagocitose Esplênica	25
1.5 Referências	27
2. Objetivos	41
2.1 Objetivo Geral	41
2.2 Objetivos específicos	41
3. Manuscrito	43
3. 1 Manuscrito 1	43
3. 2 Manuscrito 2	77
4. Discussão	103
4.1 Referência	109
5. Anexos	115

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com o objetivo de promover a saúde acompanha a história da civilização desde os primórdios, sendo o resultado do acúmulo de conhecimentos empíricos ao longo do tempo (SIMÕES et al., 1998; VICKERS et al., 2001).

O emprego de plantas medicinais alcançou cifras econômicas significativas, e seu uso na medicina popular já é reconhecida. Apesar dessa ampla utilização, ainda existem poucos estudos que contemplem seus componentes químicos e atividades biológicas, ou que garantam sua eficácia, qualidade e segurança (CARVALHO et al., 2014; CALIXTO, 2000; WIESNER, 2014).

A importância das plantas medicinais consiste não só na pesquisa farmacológica como também no desenvolvimento tecnológico de novas drogas, pois podem ser utilizadas como extratos padronizados ou seus constituintes podem ser utilizados diretamente como agentes terapêuticos, como matéria-prima para síntese de drogas ou ainda como modelos para compostos farmacologicamente ativos (protótipos) (VIEIRA; OHAYON, 2006; PANDEY; BARVE, 2011).

Partindo do princípio de que muitos extratos e substâncias biologicamente ativos têm sido utilizados como agentes terapêuticos, é de interesse da comunidade acadêmica determinar quais os riscos em potencial à saúde humana que estes apresentam. Assim, a avaliação do potencial mutagênico é de significativa importância para confirmar o uso seguro de plantas medicinais. Por outro lado, a ingestão destas plantas pode eliminar ou inverter os processos relacionados à mutagenicidade (FONSECA; PEREIRA, 2004; URH; FERGUSON, 2003), justificando assim pesquisas sobre antimutagenicidade.

Atualmente, uma vasta quantidade de fármacos é extraída de fontes naturais e o Brasil enquadra-se como promissor em substâncias bioativas por possuir 19% da diversidade biológica terrestre (GIULIETTI et al., 2005). Estima-se que 75% dos fármacos usados no tratamento de doenças infecciosas e 60%

para os de câncer são derivados de fontes naturais (NEWMAN et al., 2003). Verifica-se ainda a pesquisa na busca de novos fármacos a partir de fontes naturais em diversos países do planeta (WINSLOW; KROLL, 1998; VICKERS; ZOLLMAN, 1999).

Apesar de o Cerrado ser rico em espécies usadas na medicina popular, existe um reduzido número de estudos relacionados à identificação da espécie vegetal, obtenção de extratos, avaliações biológicas, farmacológicas e toxicológica que forneçam subsídios para o uso seguro dessas espécies vegetal, principalmente quando se compara a diversidade existente (GUARIM NETO; MORAIS, 2003; PEREIRA et al., 2012).

Em relação à flora medicinal no Mato Grosso do Sul, a situação é ainda mais crítica: a produção acadêmica está restrita a apenas alguns trabalhos (PEREIRA et al., 2009), o que aumenta a relevância de novos estudos abordando essa linha de pesquisa, uma vez que este Estado possui diferentes biomas brasileiros.

Estudos fitoquímicos e farmacológicos sobre as espécies das famílias Annonaceae e Malpighiaceae têm se intensificado nos últimos anos devido a sua grande variedade química e sendo potencialmente ativa (GONZALEZ-ESQUINCA et al., 2014; ALALI et al., 1999; GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011). Contudo, apesar desse interesse acadêmico ter incentivado o aumento significativo de artigos científicos sobre estas famílias, pesquisas envolvendo o potencial de mutagenicidade e/ou antimutagenicidade de *Annona nutans* (Annonaceae) e *Byrsonina verbascifolia* (Malpighiaceae) ainda são escassos.

Os estudos realizados com extratos de *Annona nutans* e *Byrsonina verbascifolia* com fêmeas prenhas demonstrou que os mesmos não causam mutagenicidade (GONÇALVES et al., 2013a; GONÇALVES et al., 2013b). Ainda segundo Mendanha et al. (2010), experimentos realizados com extrato de *Byrsonina verbascifolia* mostraram que este é antimutagênico em teste com *Drosophila melanogaster*.

Tendo em vista o uso dessas plantas na medicina popular, o risco da utilização dos extratos sem uma investigação detalhada e o valioso papel de substâncias quimiopreventivas, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos mutagênicos, antimutagênicos e imunomodulatórios *in vivo* dos extratos de

Annona nutans e *Byrsonima verbascifolia* através do teste do micronúcleo, ensaio de fagocitose esplênica e contagem diferencial de células sanguíneas.

Esta tese é constituída por quatro capítulos. No Capítulo 1, é realizada a revisão de literatura que fornece o embasamento para a continuidade da pesquisa. Os artigos produzidos por meio desse trabalho podem ser encontrados no Capítulo 2. Por fim, no Capítulo 3 é realizada a discussão dos trabalhos.

CAPÍTULO 1

1.1– A família Annonaceae

De acordo com Colom et al. (2007) a família Annonaceae possui 130 gêneros e 2300 espécies, sendo estas distribuídas na América, África, Oceania e Ásia. No Brasil são encontrados 33 gêneros e aproximadamente 250 espécies e no cerrado 45 espécies nativas (LORENZI; MATTOS, 2002; RINALDI, 2007). Dentre os gêneros, a *Annona* possui reconhecida importância econômica, pelo fato de seus frutos e seus derivados serem comercializados, e ainda seu uso na medicina popular (EGYDIO, 2009; ALMEIDA et al., 2014).

Quimicamente esta família é uma das menos estudadas, entretanto devido à diversidade estrutural dos produtos naturais e sua ampla atividade biológica, como efeito citotóxico e antitumoral, estudos fitoquímicos e farmacológicos tem-se intensificado (McLAUGHIN, 2008; GONZALEZ-ESQUINCA et al., 2014; BIBA et al., 2014).

Pesquisas tem mostrado que na família Annonaceae existe uma diversidade química considerável, em toda a planta (folhas, frutos, casca do caule), além de se encontrar em diferentes regiões (SIEBRA, 2007), dentre eles substâncias aromáticas, carboidratos (LEBOEUF et al., 1982), compostos fenólicos (ALMEIDA et al., 2014), taninos, flavonoides, terpenos (DA SILVA et al., 2010), antocianidina (MPIANA et al., 2012), óleos essenciais (COSTA et al., 2012), esteroides (FORMAGIO et al., 2010), alcaloides, acetogeninas, diterpenos (CHEN et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2002, MCLAUGHLIN, 2008) entre outros.

Vários destes constituintes já foram descritos como ativos, alguns exemplos serão apresentados a seguir: Diterpenoides isolados de *Annona glabra* mostraram efeitos anticancer e citotóxico (ZHANG et al., 2004). Estudos realizados com *Annona squamosa* mostraram atividade antigenotóxica (SURESH et al., 2008), antioxidante (JAGTAP; BAPAT, 2012), antitumoral (PARDHASARADHI et al., 2004), citotóxica (PARDHASARADHI et al., 2005), e para *Annona reticulata* efeito anticarcinogênico (SURESH et al., 2011).

Estudos demonstram que extratos de *Annona cherimola* possuem atividade antioxidante. Óleos essenciais extraídos da planta mostraram atividade antimicrobica (RÍOS et al., 2003). Dentre essa diversificação química, uma classe se destaca, por apresentar atividade citotóxica bastante

acentuada, mas ainda não pôde ser utilizada clinicamente “as acetogeninas de anonáceas”, assim reconhecidas no meio científico. Essas substâncias continuam sendo objeto de estudo devido a sua atividade citotóxica sobre células tumorais em baixas concentrações. Algumas acetogeninas chegam a ser 300 vezes mais ativas que o taxol *in vivo* em leucemia L-1210 implantada em camundongos (MCLAUGHLIN, 2008).

Como mencionado anteriormente, existem poucos estudos relacionados à mutagenicidade e antimutagenicidade desta família.

Segundo Dragano et al. (2010), estudos realizados com *Annona crassiflora*, não demonstraram efeitos mutagênicos nem antimutagênico no teste do micronúcleo em células de medula óssea. Entretanto, Vilar et al. (2008) demonstraram atividade antimutagênica e citotóxica no mesmo teste. Em outro estudo com a ingestão do fruto demonstrou-se que o mesmo não protegeu contra a carcinogênese induzida por DMH e ainda não apresentou efeitos mutagênicos ou carcinogênicos (VENÂNCIO et al., 2013). No estudo com extrato etanólico desta espécie não houve genotoxicidade nem mutagenicidade em testes de SOS-induteste e teste de Ames (VILAR et al., 2011).

1.1.1 *Annona nutans*

A *Annona nutans* (figura 1), pertencente à família Annonaceae, é conhecida popularmente por marolo, uma espécie nativa do cerrado, encontrada em habitats terrenos arenosos localizados à margem dos rios, distribuindo pelo Brasil, Bolívia, Argentina e Paraguai. Apresenta-se em forma de arbusto e pode medir até 1 metro, com crescimento lento, possui folhas alternadas e pecioladas, limbo de forma elíptica, flores solitárias e terminais e fruto ovoide comestível (HERBARIO NACIONAL DE BOLIVIA, 2013; DURIGAN et al., 2004; ROSSATTO et al., 2008; SILVA et al., 2015).

Foram isolados das cascas da raiz acetogeninas denominadas de cohibinas C e D (GLEYE et al., 2000); e na fração clorofórmica de folhas dessa espécie, derivados policetídeos, que podem estar relacionado a atividade fitotóxica desta fração (SILVA et al., 2015). Gonçalves et al., (2013a)

demonstrou que o fração hidrometanólico não possui ação mutagênica, teratogênica nem imunomodulatória em camungondos prenhes.

Apesar de a família Annonaceae ter algumas espécies bastante estudadas, em relação à *Annona nutans* ainda há poucos estudos.



Figura 1: *Annona nutans*

Fonte: Paulo Robson de Souza/UFMS

1.2 Família Malpighiaceae (Juss)

Esta família é representada por 75 gêneros e aproximadamente 1.300 espécies, com distribuição subtropical e tropical. No Brasil, existem 38 gêneros com quase 300 espécies. Esta família pode ser reconhecida por possuir nectários extraflorais que se localizam aos pares nas bases das sépalas na maioria das espécies (SOUZA; LORENZI, 2008), também possui importância econômica, sendo utilizada na medicina, como produtos alimentícios, ornamentais, madeireiros entre outros (RIBEIRO et al., 1999).

As espécies dessa família possuem uma variabilidade com relação ao hábito (lianas, subarbustos, arbustos e raramente árvores) e habitat (LOMBELLO; FORNI-MATINS, 2003).

Na medicina tradicional, espécies dessa família têm sido utilizadas para o tratamento de doenças gastroduodenais, incluindo úlceras gástricas (BONACORSI et al., 2012).

A família possui espécies que apresentam diferentes substâncias biologicamente ativas, sendo isolados do gênero *Byrsonima* flavonoides e taninos (PEREIRA et al., 2015). Entretanto, os triterpenos são classe de substâncias naturais que ocorrem com mais frequência (GOTTLIEB et al., 1975).



Figura 2: *Byrsonima* ssp.

Fonte: Paulo Robson de Souza/UFMS

O gênero *Byrsonima* diferencia-se por possuir espécies de hábito arbóreo e arbustivo (LORENZI, 2002). Este gênero é o maior da família Malpighiaceae, com espécies de grande importância ornamental, medicinal e produtoras de frutos comestíveis (RIBEIRO et al., 1999; JUDD et al., 2002).

Experimentos fitoquímicos com o extrato metanólico das folhas de *B. crassa* demonstraram a presença de catequinas e glicosídeos flavonóidicos (SANNOMIYA et al., 2004 e 2005).

Várias pesquisas atribuem às folhas e ao caule de *B. crassa* ações diurética, antiemética, tratamento de úlceras e diarreias (SILVA et al., 2001), assim como ação tripanossomicida (BERGER et al., 1998) e antiulcerogênico, que pode estar relacionada com a presença de catequinas e flavonóides (SANNOMIYA et al., 2004).

Alguns estudos têm demonstrado que espécies dos gêneros *Banisteriopsis* podem ser fontes de fármacos contra o Mal de Parkinson (SCHWARZ et al., 2003), enquanto que a espécie do *Tetrapteryx acutifolia*

possui atividade abortiva em bovinos e a *Byrsonima crassifolia*, atividade antimicrobiana (SANNOMIYA et al., 2005; CALDAS et al., 2011).

1.2.1 *Byrsonima verbascifolia*

Esta planta, conhecida como murici, douradinha-falsa, orelha-de-burro e orelha-de-veado (LORENZI, 2002), é predominantemente encontrada no Cerrado Brasileiro, distribuída no Distrito Federal, estados do Amazonas, Alagoas, Goiás, Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Pará, São Paulo, Paraná e Tocantins (BATISTA et al., 2005).



Figura 3: *Byrsonima verbascifolia*

Fonte: LORENZI, 2002

A *Byrsonima verbascifolia*, é um arbusto que pode chegar até 5 metros de altura. Possui tronco tortuoso de 15-25 cm de diâmetro, revestido por uma casca áspera e grossa, com frutos indeiscentes drupáceos e arredondados (ANDERSON, 1981).

Esta espécie possui frutos comestíveis, utilizados de diversas formas (sorvetes, doces, licor entre outros) (ALMEIDA, 1998). A planta é utilizada popularmente no tratamento de diversas doenças, porém possui interesse na indústria por suas propriedades adstringentes e também na construção civil (LORENZI; MATOS, 2002).

A infusão de folhas de *B. verbascifolia* é utilizada no tratamento de doenças intestinais e diarreia, além de proteção da mucosa intestinal. As raízes são recomendadas para o tratamento de enfermidades crônicas como a doença de Chagas e ainda em infecções do trato genital feminino (PANIZZA, 1998).

Segundo Almeida et al. (1998), a casca tem efeitos antipiréticos, adstringente e laxante, enquanto que seu fruto pode ser usado no tratamento de bronquite e tosse.

Análises fitoquímicas demonstram que esta espécie possui uma variedade de compostos químicos tais como: triterpenoides (ALMEIDA et al., 1998), ésteres aromáticos, taninos, flavonóides, triterpenos, amentoflavona e naftoquinonas (SANNOMIYA et al., 2004).

Estudos tem demonstrado que *B. verbascifolia* possui atividade antiviral contra rotavírus (CECÍLIO et al., 2012) e herpes (LOPEZ et al., 2001), antioxidação (MORAIS et al., 2013), antifúngica (NARUZAWA; PAPA, 2011) e antimutagênica em testes com *Drosophila melanogaster* (MENDANHA et al., 2010). Gonçalves et al. (2013b) demonstrou que o extrato hidroetanólico não possui ação mutagênica, teratogênica e imunomodulatória em camundongos prenhes.

1.3. Avaliação da mutagenecidade e antimutagenicidade

É cada vez mais comum o uso de plantas medicinais no tratamento das enfermidades com a promessa de não provocarem nenhum mal por ser de fontes naturais, entretanto para muitas plantas medicinais ainda não há estudos que comprovem tais propriedades farmacológicas e/ou seus possíveis danos a saúde (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Vários compostos que fazem parte da composição química das plantas, podem ser mutagênicos e até carcinogênicos, principalmente quando ingeridos de maneira indiscriminada (PERON et al., 2008). Por este motivo, é de interesse fazer a avaliação do potencial mutagênico de um extrato. O termo mutagênico refere-se as substâncias químicas ou físicas que são capazes de induzir alterações no material genético (SŁOCZYŃSK et al., 2014).

De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde, o câncer é uma das principais causas de morte no mundo (WHO, 2015). Essa enfermidade pode ser considerada uma doença genética causada pela aquisição sequencial de mutações em genes relacionados com a proliferação e a morte celular (BEHLING et al., 2004). Dessa maneira, a inibição das mutações seria uma forma eficiente de prevenção.

A prevenção das mutações pode ocorrer tanto de maneira a evitar a exposição aos agentes mutagênicos ou ainda favorecendo os mecanismos de defesa do organismo. Os compostos que tem a capacidade de reduzir as frequências de mutações são denominados de agentes antimutagênicos (DE FLORA, 1998; SŁOCZYŃSK et al., 2014).

Os mecanismos de ação dos agentes antimutagênicos podem ser classificados em desmutagênese e bioantimutagênese. Na desmutagênese, os agentes protetores são capazes de inativar agentes mutagênicos antes que eles atinjam o DNA. Na bioantimutagênese, os antimutagênicos suprimem o processo de mutação após o DNA sofrer dano, modulando o reparo e a replicação do DNA (BHATTACHARYA, 2011).

O potencial antimutagênico das substâncias pode ser avaliado em diversos sistemas biológicos, sendo estes os mesmos empregados para o estudo e a identificação dos agentes mutagênicos. Para a avaliação de mutagenicidade e/ou antimutagenicidade são utilizados tanto testes *in vivo* quanto nos testes *in vitro* (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

Os testes *in vitro* são de grande valor para estes estudos, devido ao seu curto período de tempo, pequena quantidade dos compostos e sua maior reprodutibilidade. Entretanto algumas ações farmacológicas exigem ensaios *in vivo*, pois permitem analisar fatores que influenciam a ação do princípio ativo (MALINI et al., 2010).

Independente do sistema-teste utilizado, o tratamento com agentes mutagênicos ou antimutagênicos poderá ocorrer simultaneamente ou em momentos diferentes, como o pré ou pós-tratamento. Os agentes antimutagênicos quando usados no pré-tratamento ou tratamento simultâneo indicam ações desmutagênicas, o pós-tratamento sugere mecanismo de bioantimutagênico e o tratamento contínuo está relacionado as ações

desmutagênicas e bioantimutagênicas (ANTUNES; ARAÚJO, 2000; SILVA et al., 2005).

1.4. Ensaio Biológicos

1.4.1 Teste do micronúcleo em sangue periférico

O estudo dos danos causados ao DNA produzidos tanto por substâncias de origem sintética como as de origem natural é uma área da toxicologia genética de grande importância, pois mutações ocorridas nos cromossomos são eventos fundamentais no processo de mutagênese e carcinogênese (FENECH, 2005; MACIEL et al., 2002).

O teste do micronúcleo foi inicialmente proposto por Heddle (1973) e Schmid (1975), sendo utilizado para a detecção de agentes clastogênicos, que induzem quebras de cromossomos e aneugênicos, que induzem segregação cromossômica anormal ou aneuploidia.

Os micronúcleos (MN) são corpos pequenos constituídos de DNA localizados no citoplasma e se originam a partir de fragmentos cromossômicos acêntricos, produzidos por quebras cromossômicas ou ainda de cromossomos inteiros, que durante o processo de migração para os polos da célula (anáfase da mitose ou meiose na divisão celular) sofreram retardo quando comparados aos demais (FAGUNDES et al., 2005). O índice de micronúcleos em células de roedores tem se tornado um dos parâmetros citogenéticos para quantificar a exposição a agentes físicos ou químicos (TUCKER; PRESTON 1996; HAYASHI et al., 1990).

A avaliação da frequência de micronúcleos *in vivo* é aceita internacionalmente, e é considerado o principal teste de genotoxicidade, sendo recomendada pelos órgãos reguladores como parte da avaliação do potencial mutagênico de substâncias químicas, patologias, alterações ambientais, dentre outras condições (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

É considerado um ensaio tecnicamente simples, rápido, sensível, confiável, e de baixo custo (RABELLO-GAY, 1991; CARVALHO et al., 2002). Segundo Heddle et al. (1973), esse teste possui vantagens como o fácil reconhecimento dos micronúcleos, tempo de coleta menos crítico, pois os

micronúcleos formados na divisão celular permanecem na circulação pelo menos por um ciclo celular, além da frequência espontânea ser baixa.

O ensaio foi desenvolvido primeiramente em células de medula óssea de camundongo (SCHMID, 1975), posteriormente utilizado em ratos, peixes e plantas. Segundo Mavournin et al. (1990), o período mínimo para o aparecimento de MN é de 6 h, incluindo ainda o atraso que pode ocorrer durante a divisão celular. Cerca de 12-24 h depois do tratamento com o agente mutagênico, os eritrócitos localizados na medula óssea são os descendentes das células que sofreram a exposição antes do ciclo celular (HAYASHI et al., 2000).

Diversos estudos toxigenéticos baseiam-se na avaliação de danos cromossômicos em células de medula de ratos e camundongos, contudo Hayashi et al. (1990), descreveram o ensaio do micronúcleo em sangue periférico utilizando como corante o Laranja de Acridina, que intercala-se com moléculas de DNA e quando exposto a radiação ultravioleta emite uma fluorescência com a cor amarela. Entretanto quando o corante se liga ao RNA, sem a capacidade de se intercalar, a fluorescência se torna vermelha.

Essas características possibilitam a identificação dos eritrócitos jovens, ricos em RNA em nível citoplasmático (reticulócitos), que estão corados de vermelho devido ao ácido nucleico. Como os micronúcleos são constituídos de DNA coram-se de amarelo e podem ser localizados nas bordas ou no meio das regiões coradas em vermelho (HAYASHI et al., 1990).

Estudos mostram que tanto o pico de micronúcleos em sangue periférico como os encontrados na medula óssea são similares, diminuindo ainda assim a quantidade de animais sacrificados, uma vez que as coletas nos diferentes tempos podem ser realizadas no mesmo animal (HAYASHI et al., 2000).

1.4.2 Contagem diferencial de células do sangue

A hematopoiese é caracterizada por eventos de diferenciação celular que terminam com a produção das linhagens celulares sanguíneas. Ela pode ser dividida em: linfopoiese, que é responsável pela formação das células NK, linfócitos B e linfócitos T; e a mielopoiese, onde ocorre a diferenciação e

desenvolvimento de eritrócitos e leucócitos, que incluem neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos (HEYWORTH et al., 1988).

Os leucócitos possuem importante papel na defesa do organismo, sendo que cada tipo possui funções específicas. Os neutrófilos, no sangue periférico, são os mais abundantes, tendo importante papel nas fases precoces das reações inflamatórias, participando ainda da fagocitose e da morte de microrganismos. Os monócitos realizam a fagocitose e ainda originam os macrófagos. Os eosinófilos são células importantes no combate a infecções, tendo ação antiparasitária e ainda está presente em reações alérgicas. Os basófilos podem ser recrutados para sítios inflamatórios e podem contribuir para as reações de hipersensibilidade imediata (CRUVINEL et al., 2010).

Os linfócitos possuem diversas funções no organismo e são divididos em: linfócitos B, responsáveis pela imunidade humoral, sendo responsáveis pela produção e liberação de anticorpos que tem a capacidade de neutralizar ou mesmo destruir antígenos; linfócitos T, que são responsáveis pela imunidade celular, destruindo células infectadas e organismos estranhos (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010) e células *Natural killer* (NK), que destroem células infectadas por vírus e tumores (DINES et al., 2004).

A contagem diferencial de células do sangue é uma ferramenta importante para a avaliação do sistema imunológico, uma vez que permite analisar sinais, sintomas e até mesmo condições associadas a infecções, processos inflamatórios, alterações na medula e distúrbios imunes (GEORGE-GAY; PARKER, 2003). No estudo, este método foi realizado com o corante Giemsa, e a associação dos dados de fagocitose esplênica, podem fornecer um prognóstico de processos relativos à imunomodulação.

1.4.3 Ensaio de Fagocitose Esplênica

O baço é um dos maiores órgãos linfoides, com consistência mole, de forma alongada, muito vascularizado e cor vermelho-purpura constituído por uma cápsula fibroelástica, de onde saem trabéculas que servem para conduzir nervos e vasos, um estroma constituído por uma rede de fibras reticulares e que dão sustentação a polpa branca e a polpa vermelha. A polpa branca é circundada pela polpa vermelha, sendo o compartimento ativo do baço, onde

são encontradas as células B e T. É constituída por um conjunto de nódulos linfáticos formando um centro germinativo e várias células linfóides que estão distribuídas ao longo das arteríolas esplênicas. Já a polpa vermelha representa a maior parte do baço, é formada por uma rede interconectada de sinusoides esplênicos, separados pelos cordões de Billroth e revestidos por células endoteliais alongadas afastadas por fendas estreitas. Os cordões esplênicos são sustentados pelo estroma formado por fibras e células reticulares, onde se encontram células sanguíneas, plasmócitos e macrófagos. Ainda no baço encontra-se a zona marginal situada na periferia da zona branca e possui artérias marginais (KIERSZENBAUM, 2012).

O baço possui uma grande quantidade de células fagocitárias, agindo assim como um filtro através da remoção de hemácias defeituosas ou senescentes da circulação, na defesa do organismo contra microrganismos existentes na circulação sanguínea, sendo importante na resposta imunitária antifúngica e antibacteriana (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Diante das funções do baço admite-se que ele é um importante órgão envolvido nos processos de imunomodulação. Para a caracterização dos efeitos imunomodulatórios dos compostos testados foi utilizado a técnica de fagocitose esplênica (HAYASHI et al., 1990).

1.5 REFERÊNCIAS

- Alali, F. Q., Liu, X., McLaughlin, J. L. (1999) Annonaceous acetogenins: recent progress. *Journal of Natural Products*, **62**, 504-540.
- Almeida, J. R. G. S., Araújo, C. S., Pessoa, C., Costa, M. P., Pacheco, A. G. M. (2014) Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, **36**, 258-264.
- Almeida, S. P. (1998) Cerrado: Espécies Vegetais Úteis. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, Ministério da Agricultura e do Abastecimento*. 1st edn. EMBRAPA-CPAC, Planaltina.
- Anderson, W. R. (1981) Malpighiaceae. Botany of the Guiana Highland - Part XI.: *Memoirs of the New York Botanical Garden*, **32**, 21-305.
- Antunes, L. M. G. e Araujo, M. C. P. (2000) Mutagenicity and antimutagenicity of the main food colorings. *Revista de Nutrição*, **13**, 81-88.
- Batista, J. A., Pacheco, J. F. M., and Santos, L. M. (2005) Biologia reprodutiva de três espécies de *Byrsonima* Rich. ex Kunth (Malpighiaceae) em um cerrado sensu stricto no campus da Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Goiás, Brasil. *Revista de Biologia Neotropical*, **2**, 109-122.
- Behling, E. B., Sendão, M. C., Francescato, H. D. C., Antunes, L. M. G., Bianchi, M. L. P. (2004) Flavonoide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, **15**, 285-292.
- Berger, I., Barrientos, A. C., Cáceres, A., Hernandez, M., Rastrelli, L., Passareiter, C. M., Kubelka, W. (1998) Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections: II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*,

62, 107-115.

Bhattacharya, S. (2011) Natural Antimutagens: A Review. *Research Journal of Medicinal Plant*, **5**, 116-126.

Biba, V. S., Amily, A., Sangetha, S., Remani, P. (2014) Anticancer, antioxidant and antimicrobial activity of annonaceae Family. *World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, **3**, 1595-1604.

Bonacorsi, C., Raddi, M. S., Fonseca, L. M., Sannomiya, M., Vilegas, W. (2012) Effect of *Byrsonima crassa* and Phenolic Constituents on *Helicobacter pylori*-Induced Neutrophils Oxidative Burst. *International Journal of Molecular Sciences*, **13**, 133-141.

Caldas, S. A., Peixoto, T. C., Nogueira, V. A., França, T. N., Tokarnia, C. H., Peixoto, P. V. (2011) Aborto em bovinos devido à intoxicação por *Tetrapteryx acutifolia* (Malpighiaceae). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **31**, 737-746.

Calixto, J. B. (2000) Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **33**, 179-189.

Carvalho, A. C., Ramalho, L. S., Marques, R. O., Perfeito, J. P. S. (2014) Regulation of herbal medicines in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, **158**, 503-506.

Carvalho, M. B., Ramirez, A., Gattás, G. J. F., Guedes, A. L., Amar, A., Rapoport, A., Neto, J., Curioni, O. A. (2002) Correlação entre a evolução clínica e a 57 frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. *Revista da Associação Médica Brasileira*, **48**, 317-322.

Cecílio, A. B., Faria, D. B., Oliveira, P. C., Calda, S., Oliveira, D. A., Sobral, M. E. G., Duarte, M. G. R., Moreira, C. P. S., Silva, C. G., Almeida, V. L. (2012)

Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *Journal of Ethnopharmacology*, **141**, 975-981.

Chen, C. H., Hsieh, T., Liu, T., Chen, C., Hsieh, P., Chen, C. (2004) Annoglabayin, a novel dimeric kaurane diterpenoid, and apoptosis in Hep G2 cells of annomontacin from the fruits of *Annona glabra*. *Journal of Natural Products*, **67**, 1942-1946.

Colom, O. A., Popich, S., Bardon, A. (2007) Bioactive constituents from *Rollinia*. *Natural Product Research*, **21**, 254-259.

Costa, E. V., Dutra, L. M., Nogueira, P. C., Moraes, V. R., Salvador, M. J., Ribeiro, L. H., Gadelha, F. R. (2012) Essential oil from the leaves of *Annona vepretorum*: chemical composition and bioactivity. *Natural Product Communications*, **7**, 265-266.

Cruvinel, W. D., Júnior, D. M., Araújo, J. A. P., Catelan, T. T. T., Souza, A. W. S., Silva, N. P., Andrade, L. E. C. (2010) Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, **50**, 434-461.

Silva, A. F., Oliveira, R. J., Matuo, R., Ribeiro, L. R., Mantovani, M. S. (2005) Effects of agaricus blazei on clastogenicity induced by ultraviolet radiation in culture of CHO-K1 cells. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, **26**, 131-140.

Da Silva, N. L. A., Miranda, F. A. A., Conceição, G. M. (2010) Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. *Scientia Plena*, **6**, 1-16.

De Flora, S. (1998) Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, **18**, 151-158.

Dines, I., Rumjanek, V. M., Persechini, P. M. (2004) What is going on with natural killer cells in HIV infection? *International Archives of Allergy and Immunology*, **133**, 330-339.

Dragano, N. R., Venancio, V. P., Paula, F. B. A., Lucia, F. D., Fonseca, M. J. O., Azevedo, L. (2010) Influence of Marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress in vivo. *Plant Foods for Human Nutrition*, **65**, 319-325.

Durigan, G., Siqueira, M. F., Franco, G. Contieri, W. A. (2004) Flora arbustiva-arbórea do médio Paranapanema: base para a restauração dos ecossistemas naturais. Disponível em: <http://iflorestal.sp.gov.br/files/2004/01/IF-C13.pdf>. Acessado em 29/05/2015.

Egydio, A. P. M. Análises das variações fitoquímicas, estrutura genética e importância econômica de *annona crassiflora*. Tese (doutorado). Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica, pp. 68, São Paulo: 2009.

Fagundes, F. A., Oliveira, L. B., Cunha, L. C., Valadares, M. C. (2005) *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos. *Revista Eletrônica de Farmácia*, **2**, 24-29.

Fenech, M. (2005) In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods in Molecular Medicine*, **111**, 3-32.

Fonseca, C. A e Pereira, D. G. (2004) Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. *Infarma*, **16**, 51-54.

Formagio, A. S. N., Masetto, T. E., Baldivia, D. S., Vieria, M. C., Zárate, N. A. H., Pereira, Z. V. (2010) Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. *Brazilian Journal of Biosciences*, **8**, 349-354.

George-Gay, B. e Parker, K. (2003) Understanding the complete blood count with differential. *Journal of PeriAnesthesia Nursing*, **18**, 96-117.

Giulietti, A. M., Harley R. M., Queiroz, L. P., Wanderley, M. G. L., Berg, C. V. D. (2005) Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Megadiversidade*, **1**, 52-61.

Gleye, C., Raynaud, S., Fourneau, C., Laurens, A., Laprévote, O., Serani, L., Fournet, A., Hocquemiller, R. (2000) Cohibins C and D, two important metabolites in the biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and *Annona nutans*. *Journal of Natural Products*, **63**, 1192-1196.

Gonçalves, C. A., Silva, N. L., Mauro, M. O., David, N., Cunha-Laura, A. L. , Auharek, S. A., Monreal, A. C., Vieira, M. C., Silva, D. B., Santos, F. J., Siqueira, J. M., Oliveira, R. J. (2013b) Evaluation of mutagenic, teratogenic, and immunomodulatory effects of *Annona nutans* hydromethanolic fraction on pregnant mice. *Genetics and Molecular Research*, **13**, 4392-4405.

Gonçalves, C. A., Siqueira, J. M., Carollo, C. A., Mauro, M. de O., de Davi N., Cunha-Laura, A. L., Monreal, A. C., Castro, A. H., Fernandes, L., Chagas, R. R., Auharek, S. A., Oliveira, R. J. (2013a) Gestational exposure to *Byrsonima verbascifolia*: teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **150**, 843-850.

González-Esquinca, A. R., De-La-Cruz-Chacón, I., Castro-Moreno, M., Orozco-Castillo, J. A., Riley- Saldaña, C. A. (2014). Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. *Revista Brasileira de Fruticultura*, **36**, 01-16.

Gottlieb, O. R., Mendes, H. P., Magalhães, M. T. (1975) Triterpenoids from *Byrsonima verbascifolia*. *Phytochemistry*, **14**, 1456.

Guarim Neto, G. e Morais, R. G. D. (2003) Recursos medicinais de espécies do

Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Botanica Brasilica*, **17**, 561-584.

Guilhon-Simplicio, F. e Pereira, M. D. M. (2011) Chemical and pharmacological aspects of *Byrsonima* (Malpighiaceae). *Química Nova*, **34**, 1032-1041.

Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G., Adler, I. D., Blakey, D. H., Dertinger, S. D., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., Sutou, S. (2000) In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **35**, 234-352.

Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*, **245**, 245-249.

Heddle, J. A. (1973) A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research*, **18**, 187-192.

Herbario Nacional de Bolivia - Instituto de Ecología. *Universidad Mayor de San Andrés* (2013). Bolivia. 90p.

Heyworth, C. M., Ponting, I.L., Dexter, T.M. (1988) The response of haemopoietic cells to growth factors: developmental implications of synergistic interactions. *Journal of Cell Science*, **91**, 239-247.

Jagtap, B. e Bapat, V. A. (2012) Antioxidant activities of various solvent extracts of custard apple (*Annona squamosa* L.) fruit pulp. *Nutrafoods*, **11**, 137-144.

Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellog, E. A., Stevens P. F., Donoghue, M. J. (2002) *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates.

Junqueira, L. C. e Carneiro, J. (2013) Sistema imunitário. In: Junqueira, L. C. e Carneiro, J. (Eds.), *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanbara Koogan, pp. 276-280.

Kierszenbaum, A. L. (2012) *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia* / Abraham L. Kierszenbaum ; [tradução Claudia Coana ... et al]. - Rio de Janeiro: Elsevier, pp. 328-329.

Krishna, G. e Hayashi, M. (2000) In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*, **455**, 155-166.

Leboeuf, M., Cave, A., Bhaumik, P. K., Mukherjee, B., Mukherjee, R. (1982) The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, **21**, 2783-2813.

Lombello, R. A. e Forni-Martins, E. R. (2003) Malpighiaceae: correlations between habit, fruit type and basic chromosome number. *Acta Botanica Brasilica*, **17**, 171-178.

Lopez, A., Hudson, J. B., Towers, G. H. (2001) Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **77**, 189-196.

Lorenzi, H. (2002) *Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. 2ª. ed. Nova Odessa, Plantarum.

Lorenzi, H., Matos, F. de A. (2002) Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora.

Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga Jr, V. F., Grynberg, N. F., Echevarria, A. (2002) Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, **25**, 429-438.

Malini, M., Marin-Morales, M. A., Mantovani, M. S., Jamal, C. M., Nati, N., Passos, T. S., Matsumoto, S. T. (2010) Determination of the antimutagenicity of

an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. *Genetics and Molecular Biology*, **33**, 176-181.

Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F., Heddle, J. A. (1990) The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, **239**, 29-80.

McLaughlin, J. L. (2008) Paw paw and cancer: annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. *Journal of Natural Products*, **71**, 1311-1321.

Mendanha, D. M., Ferreira, H. D., Felício, L. P., Silva, E. M, Pereira, D. G., Nunes, W. B., Carvalho, S. (2010) Modulatory effect of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Biology*, **9**, 69-77.

Mesquita Junior, D. E. A. (2010) Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Revista Brasileira de Reumatologia*, **50**, 552-580.

Morais, M. L. E. A. (2013) Determination of antioxidant potential *in vitro* of brazilian Cerrado fruits: *Revista Brasileira de Fruticultura*, **35**, 355-360.

Mpiana, P. T., Dianzenza, E. N., Ngbolua, K. N., Tshibangu, D. S. T., Mbala, B. M., Mhigo, S. O., Atibu, E. K., Kakule, M. K., Bokota, M. T. (2012) Antisickling properties, thermal and photochemical degradations of anthocyanin extracts from *Annona senegalensis* (Annonaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **6**, 2241-2251.

Naruzawa, E. S., Papa, M. F. S. (2011) Antifungal activity of extracts from Brazilian Cerrado plants on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Corynespora cassiicola*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, **13**, 408-412.

Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M. (2003) Natural product as source

of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, **66**, 1022-1037.

Oliveira, B. H., Sant'Ana, A. E., Bastos, D. Z. (2002) Determination of the diterpenoid, kaurenoic acid, in *Annona glabra* by HPLC. *Phytochemical Analysis*, **13**, 368-371.

Pandey, N. e Barve, D. (2011) Phytochemical and Pharmacological Review on *Annona squamosa* Linn. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, **2**, 1404-1412.

Panizza, S. (1998) Plantas que Curam (Cheiro de Mato). São Paulo, IBRASA.

Pardhasaradhi, B. V., Reddy, M., Ali, A. M., Kumari, A. L., Khar, A. (2005) Differential cytotoxic effects of *Annona squamosa* seed extracts on human tumour cell lines: role of reactive oxygen species and glutathione. *Journal of Biosciences*, **30**, 237-244.

Pardhasaradhi, B. V., Reddy, M., Ali, A. M., Kumari, A.L., Khar A. (2004) Antitumour activity of *Annona squamosa* seed extracts is through the generation of free radicals and induction of apoptosis. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, **41**, 167-172.

Pereira, V. V., Borel, C. R., Silva, R. R. (2015) Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of *Byrsonima* species. *Natural Product Research*, **13**, 1-5.

Pereira, Z. V., Fernandes, S. S. L., Sangalli, A., Mussury, R. M. (2012) Multiple uses of native species of the Cerrado biome of Assentamento Lagoa Grande, Dourados, Mato Grosso do Sul state. *Revista Brasileira de Agroecologia*, **7**, 126-136.

Pereira, Z. V., Mussury, R. M., Almeida, A. B., Sangalli, A. (2009) Medicinal plants used by Ponta Porã community, Mato Grosso do Sul State. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, **31**, 293-299.

Peron, A. P., Felipes, J., Mattge, G. I., Cantagalli, L. B., Mariucci, R. G., Vicentini, V. E. P. (2008) Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. *Revista Brasileira de Biociências*, **6**, 127-130.

Rabello-Gay, M. N. (1991) Teste do Micronúcleo em medula óssea. In: Rabello-Gay, M. N., Rodriguez, M. A. R., Monteleone-Neto, R. *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Métodos e critérios de avaliação*, Ribeirão Preto – SP. Sociedade Brasileira de Genética, p. 83-90.

Ribeiro, J. E. L., Hopkins, M. J. G., Vicentini, A., Sothers, C. A., Costa, M. A. S., Brito, J. M., Souza, M. A. D., Martins, L. H. P., Lohmann, L. G., Assuncao, P. A. C. L., Pereira, E. C., Silva, C. F. S., Mesquita, M. R., Procópio, L. C. (1999) Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA.

Rinaldi, M. V. N. (2007) Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica do alcaloides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart. Tese (doutorado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP.

Ríos, M. Y., Castrejón, F., Robledo, N., León, I., Rojas, G., Navarro, V. (2003) Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from *Annona cherimola* (Annonaceae). *Journal of the Mexican Chemical Society*, **47**, 139-142.

Rossatto, D. R., Toniato, M. T. Z., Durigan, G. (2008) Flora fanerogâmica não-arbórea do cerrado na Estação Ecológica de Assis, Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica*, **31**, 409-424.

Sannomiya, M., Fonseca, V. B., da Silva, M. A., Rocha, L. R., Dos Santos, L. C., Hiruma-Lima, C. A., Souza Brito, A. R., Vilegas, W. (2005) Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, **97**, 1-6.

Sannomiya, M., Rodrigues, C. M., Coelho, R. G., dos Santos, L. C., Hiruma-Lima, C. A., Souza Brito, A. R., Vilegas, W. (2004) Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). *Journal of Chromatography A*, **1035**, 47-51.

Schmid, W. (1975) The micronucleus test. *Mutation Research*, **31**, 9-15.

Schwarz, M. J., Houghton, P. J., Rose, S., Jenner, P., Lees, A. D. (2003) Activities of extract and constituents of *Banisteriopsis caapi* relevant to parkinsonism. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **75**, 627-633.

Siebra, C. A. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Annona glabra* Linn., ANNONACEAE. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Defesa: Curitiba, 2007.

Silva, N. L., Zobiole, N. N., Silva, D. B., Sartorid, A. L. B., Oliveira, R. J., Pinto, M. E. A., Santosa, F. J. L., Siqueira, J. M. (, 2015) Constituintes químicos e atividade fitotóxica das folhas de *Annona nutans*. *Química Nova*.

Silva, S. R., A. P. Silva, C. B. Munhoz, M. C. Silva Jr., M. B. Medeiros (Eds.), Guia de Plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros, WWF, Brasília, 2001.

Simões, C. M. O., Mentz, L. A., Schenkel, E. P., Irgang, B. E., Stehmann, J. R. (1998) Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. 5ª ed. Porto Alegre, Editora da Universidade/UFRGS.

Słoczyńska, K., Powroźnik B., Pękala, E., Waszkielewicz, A. M. (2014) Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *Journal of Applied Genetics*, **55**, 273-285.

Souza, V. C., Lorenzi, H. (2008) Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II:1-704. Instituto Plantarum, Nova Odessa.

Suresh, H. M., Shivakumar, B., Hemalatha, K., Heroor, S. S., Hugar, D. S., Rao, K. R. (2011) In vitro antiproliferative activity of *Annona reticulata* roots on human cancer cell lines. *Pharmacognosy Research*, **3**, 9-12.

Suresh, K., Manoharan, S., Blessy, D. (2008) Protective role of *Annona squamosa* linn bark extracts in DMBA induced genotoxicity. *Kathmandu University Medical Journal*, **6**, 364-369.

Tucker, J. D. e Preston, R. J. (1996) Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research*, **365**, 47-59.

Urh, Y., Ferguson, L. R. (2003) Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential - highlights of a symposium. *Mutation Research*, **523-4**, 1-8.

Veiga Junior, V. F., Pinto, A. C., Maciel, M. A. M. (2005) Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, **28**, 519-528.

Venâncio, V. P., Ferreira, E. B., Brigagão, M. R. P. L., Paula, F. B. A., Barbisan, L. F., Azevedo, L. (2013). *Annona crassiflora* Mart. fruit pulp effects on biochemical parameters and rat colon carcinogenesis. *Ciência e Agrotecnologia*, **37**, 343-349.

Vickers, A. Zollaman, C., Lee, R. (2001) Herbal medicine. *The Western Journal of Medicine*, **175**, 125-128.

Vickers, A., Zollman, C. (1999) ABC of complementary medicine: herbal medicine. *BMJ*, **319**, 1050-1053.

Vieira, V. M. M., Ohayon, P. (2006) Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D. *Revista Economia & Gestão da PUC Minas*. <Disponível em:<<http://periodicos.pucminas.br/index.php/economiaegestao/article/viewArticle/26>>. Acessado em 8/04/2015.

Vilar, J. B., Ferreira, F. L., Ferri, P. H., Guillo, L. A., Chen Chen, L. (2008) Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. *Brazilian Journal of Biology*, **68**, 141-147.

Vilar, J. B., Ferri, P. H., Chen-Chen, L. (2011) Genotoxicity investigation of araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test. *Brazilian Journal of Biology*, **71**, 197-202.

Wiesner, J. (2014) Challenges of safety evaluation. *Journal Ethnopharmacology*, **158**, 467-470.

Winslow, L. C., Kroll, D. J. (1998) Herbs as medicines. *Archives of Internal Medicine*, **158**, 2192-2199.

World Health Organization (WHO). Cancer. Disponível em:<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 25/mar/2015).

Zhang, Y. H., Peng, H. Y., Xia, G. H., Wang, M. Y., Han, Y. (2004) Anticancer effect of two diterpenoid compounds isolated from *Annona glabra* Linn. *Acta Pharmacologica Sinica*, **25**, 937-942.

CAPÍTULO 2

2. Objetivos

2. 1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos mutagênicos, antimutagênicos e imunomodulatório dos da fração hidrometanólica de *Annona nutans* e do extrato metanólico de *Byrsonima verbascifolia* *in vivo*.

2. 2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos mutagênicos, antimutagênicos e imunomodulatório da fração hidrometanólica de *Annona nutans* e do extrato metanólico de *Byrsonima verbascifolia* por meio do ensaio do micronúcleo, ensaio de fagocitose esplênica, contagem diferencial de células sanguíneas e elucidar os possíveis modos de ação antimutagênica.

CAPÍTULO 3

3. Manuscrito

3.1 Manuscrito 1

Mutagenicidade e imunomodulação avaliações após a ingestão da fração enriquecida de flavonóides e outros compostos fenólicos a partir das folhas da *Annona nutans* sobre a toxicidade induzida pela ciclofosfamida.

Nathalia Novak Zobiole¹, Nathalia Lucca Silva², Rodrigo Juliano Oliveira¹, Andréa Luiza Cunha Laura³, Silvia Cordeiro das Neves³, Flávio Jose dos Santos¹, Ângela Sartori³, Denise Brentan da Silva⁴, Fábio Vieira dos Santos², João Máximo de Siqueira^{2*}.

¹ Faculdade de Medicina - FAMED, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

² Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Universidade Federal de São João Del-Rei – UFSJ, Divinópolis, MG, Brasil.

³ Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

⁴ Departamento de Farmácia, CCBS.

Resumo

A utilização de plantas com finalidade medicinais, para prevenção, tratamento e cura de doenças, é uma das formas mais antigas de prática medicinal. Atualmente, os produtos naturais tem ganhado atenção especial na indústria farmacêutica uma vez que podem ser fonte de novos agentes anticancerígenos. Resultados promissores tem sido observado com o uso de substâncias extraídas de plantas medicinais na quimioprevenção. Diante desta perspectiva o presente trabalho avaliou a atividade mutagênica, antimutagênica e imunomodulatória da fração hidrometanólico de *Annona nutans in vivo*. Para tanto foram realizados os ensaios do micronúcleo em sangue periférico, fagocitose esplênica, contagem diferencial de células do sangue e para avaliação antioxidante atividade inibidora do radical livre DPPH. Utilizou-se 80 camundongos machos Swiss adultos (n=10/grupo), divididos nos seguintes grupos: controle negativo, controle positivo, fração, pré-tratamento dose única, pré-tratamento doses múltipla, tratamento simultâneo, pós-tratamento e tratamento contínuo. A coleta de sangue para os ensaios do micronúcleo e

contagem diferencial de células sanguíneas foi realizada por punção da veia caudal em 24 (T1), 48 (T2) e 72 horas (T3) após o tratamento com ciclofosfamida ou veículo. Após a coleta os animais foram submetidos à eutanásia para coleta do baço destinado à fagocitose esplênica. Os resultados do ensaio do micronúcleo mostraram que a fração apresenta atividade antimutagênica nos grupos pré-tratamento dose única, pré-tratamento doses múltiplas e contínuo, com redução de danos de 91,44%, 41,18% e 91,44% em T1 e 83,58%, 79,48% e 83,58% em T2. Em relação ao ensaio de fagocitose esplênica, pode-se observar que a fração, isoladamente e/ou associada à ciclofosfamida, aumenta a atividade fagocítica, exceto no pós-tratamento. Os valores da contagem diferencial de células sanguíneas mostraram-se dentro dos padrões de referência/normalidade. Para a avaliação da efeito antioxidante, a atividade diminuiu na seguinte ordem: FAcOEt > EHMB > BHT > ANHMF > FCHCl3 > FHEX. Assim, sugere-se que a fração possui atividade antioxidante, antimutagênica, agindo possivelmente e preferencialmente por desmutagênese, sendo que os micronúcleos são retirados de corrente sanguínea por um aumento da atividade fagocítica, caracterizando assim a imunomodulação, indicando que o composto possui atividade quimioprotetora.

1. Introdução

Dentre os 27 gêneros da família Annonaceae, a *Annona* é considerada uma das mais importantes. Este gênero é representado, até agora, por 120 espécies, sendo que 110 espécies são nativas das regiões tropicais das Américas e poucas espécies são nativas da África tropical. Várias espécies de *Annona* produzem frutos comestíveis. No Brasil, elas são conhecidas como "pinha", "fruta-do-conde" ou "araticum", podendo ser encontradas em mercados popular, feiras livres. Além disso, este gênero faz parte da medicina popular de muitos países tropicais ou subtropicais. Em particular, *Annona muricata* (graviola), *Annona squamosa* (pinha) e *Annona reticulata* são frequentemente descritos. As folhas destas espécies, por exemplo, são usadas como chá com efeito sedativo, digestivo, afrodisíaco ou purgativo, (CAPARROS-LEFEBVRE; STEELE, 2005), e o uso de sementes de *A. squamosa* foi relacionado com o tratamento de câncer na medicina popular do sul da China (CHEN et al., 2012).

Por longos anos, o interesse por espécies de *Annona*, incluindo outro gênero de anonáceas, ocorreu devido a presença de acetogeninas. Esta classe

de compostos é encontrado nas folhas, os frutos, as raízes, cascas, caules e sementes dessas plantas (CAPARROS-LEFEBVRE; STEELE, 2005).

A acetogenina faz parte de um grande grupo de produtos naturais, e são considerados como compostos exclusivos de espécies de Annonaceae (BERMEJO et al., 2005). Esta classe de constituintes é reconhecida como citotóxica, além disso, também foi descrito com atividade inseticida (MCLAUGHLIN et al., 2008; BERMEJO et al., 2005). O extrato de sementes de *Annona squamosa* contendo acetogeninas foi padronizado e foi sugerido ser um possível candidato para uma nova droga anticancerígena. As acetogeninas das anonáceas também mostraram atividade antioxidante sobre modelo químico do radical DPPH (SANTOS LIMA et al., 2010) entre outros efeitos biológicos descritos (GUPTA-ELERA et al., 2011; CHANG et al., 1998; CHEN et al., 1999). Por outro lado, uma síndrome de parkinsonismo atípico que afetou a população do Caribe foi fortemente associada ao consumo de frutas ou chá de espécies Annonaceae. Tem sido sugerido que as acetogeninas e alcalóides de derivados quinolínicos estão diretamente relacionados com a etiologia, uma vez que estes mostraram que os compostos *in vitro* podem provocar degeneração neurológica (CAPARROS-LEFEBVRE; STEELE, 2005; CHAMPY et al., 2004).

Por outro lado, outros extratos obtidos de espécies da Família Annonaceae desprovidos de acetogeninas (PADMAJA et al., 1995), bem como a grande variedade de constituintes presentes nesta família apresentaram outras atividades de interesse, tais como antimicrobianos, antiprotozoários, antinociceptiva, anti-inflamatório, citotóxica (MATOS et al., 2006), e incluindo a atividade antioxidante.

Annona nutans (ou *Annona spinescens* var. *nutans*) é uma espécie do cerrado e caatinga brasileira. Anteriormente, seu nome popular na língua guarani era *Araticû -Mi* e *Araticû – Ñu*, mas atualmente ela possui o mesmo nome popular que outras espécies deste gênero. Pode ser encontrada nos estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais do Brasil (PIO CORREA, 1926). As contribuições sobre a constituição química de *A. nutans* são escassas, apenas dois artigos descrevem o isolamento de acetogeninas a partir da casca da raiz de uma amostra coletada no Paraguai (GLEYE et al., 2000). *A. nutans* (syn. *A. spinencis* var. *nutans*). Essa espécie não deve ser

confundida com *A. spinescens* que possui na literatura um número maior de estudos fitoquímicos, biológicos e farmacológicos.

Assim, o presente artigo descreve o efeito quimiopreventivo da fração enriquecida de flavonóides e outros compostos fenólicos obtidos a partir das folhas da *Annona nutans* sobre a toxicidade induzida pela ciclofosfamida. O perfil químico por HPLC da fração hidrometanólico avaliada neste trabalho foi obtido a partir da partição do extrato metanólico das folhas.

2. Material e métodos

2.1. Agentes químicos

Todos os solventes utilizados no estudo foram de pureza analítica ou grau cromatográfico: Dimetilsulfóxido (DMSO), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT), bem como os seguintes compostos padrões rotina, ácido clorogênico (4), 3-O- β -D-galactopiranosil-quercetina (6), 3-O- β -glicopiranosil-quercetina (7) foram adquiridos do laboratório Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA. Ciclofosfamida (Fosfaseron®), metanol, acetato de etila (Vetec-Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, Brazil). 3-O- β -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-galactopiranosil quercetina (5) e 3-O- β -D-galactopiranosil-isoramnetina (8) foram obtidos por processamento de acordo com o trabalho fitoquímico previamente descrito por Silva et al. (2015).

2.2. Material vegetal, extração e isolamento de flavonoides de folhas de *A. nutans*.

As folhas de *Annona nutans* foram coletadas em Abril 2011 em Porto Murtinho/MS, Brasil e identificado pelo Dr. Renato de Mello Silva, de uma espécime de *Annona nutans*, localizado na fazenda Retiro Conceição, na região de Porto Murtinho – Mato Grosso do Sul. Uma exsicata depositada no herbário CG/MS (UFMS), Campo Grande – MS, sob o nº 27648.

A fração hidrometanólica foi obtida por sucessivas partições do extrato hidrometanólico como descrito a seguir: extrato hidrometanólico bruto (EHMB) (metanol:água 9:1) foi submetido a partição por gradiente de solvente, produzindo as frações hexânica (FHex), clorofórmico (FCHCl₃), acetato de etila

(FACOEt), e hidrometanólica (ANHMF). Além disso, o isolamento e identificação de três flavonóides, como descrito anteriormente (SILVA et al., 2015).

2.3 Perfil cromatográfico por HPLC da fração hidrometanólica (ANHMF).

A análise cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo líquido marca Shimadzu composto por um sistema binário de LC20AD, módulo de comunicação SPD- M20-A, volume de injeção de 20 µL SIL-20A e detector espectrofotométrico com arranjo de diodos SPD-M20A, ajustado para a faixa de 210-600 nm.

A separação foi realizada com uma coluna Shim-Pack UP-ODS C18 (4.6 mm, i.d. 250 mm, 5 µm) e foi equipada com uma pré-coluna Security Guard com as mesmas especificações. Os cromatogramas foram monitorados com software do Lab Solution em 254 e 355 nm. A ANHMF foi eluída em uma mistura de H₂O–MeCN uma taxa de fluxo de 0.8 ml min⁻¹. A separação por cromatografia em coluna de gel de sílica (230-400 mesh, 60 Å) (*Mecherey-Nagel*) com hexano/acetato de etila/metanol como gradiente de eluição. TLC foi analisado em placas de gel de sílica *Mecherey-Nagel* (0.25 mm), reveladas com o reagente Natural Product/solução de propilenoglicol.

A absorbância foi analisada em Espectrofotômetro UV-visível marca The Genesius 10S Thermo SCIENTIFIC e espectrofotômetro XS2/US BioTek Power Wave, USA. O perfil cromatográfico da ANHMF foi determinado por HPLC usando como fase móvel a água (A) e acetronitrila (B) (0.01 min 15% B; 60 min 32% B; 64 min 15% B). Todos os padrões e demais compostos isolados citados acima, foram co-injetados com a fração hidrometanólica, a fim de confirmar a sua presença.

2.4. Atividade inibidora do radical livre DPPH

A metodologia utilizada para a determinação da atividade antioxidante em frações obtidas de folhas de *A. nutans* foi o de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, DPPH segundo Brand-Williams et al. (1995); Burda; Oleszek (2001) com modificações. Uma solução de DPPH (0,002% p/v), foi

preparada em metanol 80%. 75 mL das amostras (EHMB, FHex, FCHCl₃, FAcOEt, ANHMF) e do padrão foram adicionados a cada um dos poços da microplaca de 96 poços, contendo 150 µL da solução de DPPH. As amostras e o padrão foram preparados em triplicata para cada uma das cinco concentrações utilizadas (1, 10, 100, 250 e 500 mg/mL). A placa foi incubada em uma sala escura com temperatura ambiente controlado por 30 min. Após esse tempo, a absorbância foi mensurada para cada amostra a 517 nm. O percentual da captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, DPPH do extrato bruto e das frações foi calculada pela seguinte fórmula: $(Ac - Aa)/Ac \times 100$, onde Ac é a absorbância do controle, que não foi incubada com o extrato ou as frações e Aa corresponde a absorbância das amostras incubadas com as diferentes concentrações. Valores de IC₅₀ expressam a concentração de amostra necessária para capturar 50% do radical livre (DPPH).

2.5 Animais e Delineamento Experimental

Foram utilizados 80 camundongos da variedade Swiss (*Mus musculus*), machos e em idade reprodutiva provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CCBS/UFMS) subdivididos em 8 grupos experimentais (n = 10 animais). O experimento foi conduzido no biotério do Laboratório de Bioensaios do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde e as análises foram realizadas no Laboratório BioCapri do mesmo centro. Os animais foram mantidos em caixas de propileno recobertas por sepilho e alimentados com ração comercial (Nuvital®) e água filtrada *ad libitum*. A temperatura e luminosidade foram controladas utilizando-se fotoperíodo de doze horas (12 horas de luminosidade: 12 horas de escuro), com temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade de $55\% \pm 10$ em estante ventilada (AESLO®, e520). O experimento foi conduzido segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2004), observando as diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais e com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS (Protocolo No. 311).

Como controle positivo, foi utilizado a Ciclofosfamida (Fosfaseron®), adquirida do Laboratório Ítaca (REG. M.S. No. 1.2603.0056.002-1; Batch 063020, Brasil), agente alquilante de ação indireta, para a indução de danos no

DNA. O agente indutor de danos foi preparado em solução fisiológica, pH 7,4, e administrado em concentração final de 75mg/Kg de peso corpóreo (p.c), por via intraperitoneal (i.p.).

A fração hidrometanólica de *Annona nutans* foi primeiramente diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente em solução fisiológica (concentração final: solução fisiológica a 1% de DMSO) e administrado em concentração final de 50mg/Kg de peso corpóreo (p.c), por intubação intragástrica (v.o.).

Os grupos experimentais estabelecidos foram: **Grupo Controle Negativo:** os animais receberam duas aplicações, uma de solução fisiológica (veículo da ciclofosfamida, i.p.) e outra de solução fisiológica a 1% de DMSO (veículo da fração, v.o.), ambas no volume de 0,1mL/10g p.c.

Grupo Controle Positivo - Ciclofosfamida: os animais receberam duas aplicações, uma de ciclofosfamida (75mg/Kg p.c., i.p.) e outra de solução fisiológica a 1% de DMSO (veículo da fração, v.o.) no volume de 0,1mL/10g p.c.

Grupo *Annona nutans* - Fração: os animais receberam duas aplicações, uma de solução fisiológica (veículo da ciclofosfamida, 0,1mL/10g p.c., i.p.) e outra da fração hidrometanólica de *Annona nutans* (50mg/Kg p.c., v.o.).

Grupo Pré-tratamento – Dose Única: os animais receberam duas aplicações, da fração hidrometanólica de *Annona nutans* (50mg/Kg p.c., v.o.), em dose única, e uma aplicação de ciclofosfamida de 24 horas após (75mg/Kg p.c., i.p.).

Grupo Pré-tratamento – Doses Múltiplas: os animais receberam durante 15 dias consecutivos aplicações da fração hidrometanólica de *Annona nutans* (50mg/Kg p.c., v.o.) e 24 horas após a última aplicação receberam uma aplicação de ciclofosfamida (75mg/Kg p.c., i.p.).

Grupo Tratamento Simultâneo: os animais receberam simultaneamente uma aplicação da fração hidrometanólica de *Annona nutans* (50mg/Kg p.c., v.o.) e uma aplicação de ciclofosfamida (75mg/Kg p.c., i.p.).

Grupo Pós-tratamento: os animais receberam uma aplicação de ciclofosfamida (75mg/Kg p.c., i.p.) e 24 horas após uma da fração hidrometanólica de *Annona nutans* (50mg/Kg p.c., v.o.).

Grupo Tratamento Contínuo: os animais receberam durante 15 dias consecutivos aplicações da fração hidrometanólica de *Annona nutans* (50mg/Kg p.c., v.o.), 24 horas após a última aplicação receberam uma aplicação de ciclofosfamida (75mg/Kg p.c., i.p.) simultaneamente a outra aplicação do extrato e 24 horas após essa aplicação simultânea uma nova administração da fração foi realizada.

Vinte e quatro, 48 e 72 horas após a aplicação da ciclofosfamida foram coletadas amostras de sangue periférico (cerca de 20µL) para a realização do ensaio do micronúcleo em sangue periférico e da contagem diferencial de células do sangue. Após 72 horas da aplicação da ciclofosfamida os animais foram submetidos à eutanásia para coleta de órgãos para o ensaio de fagocitose esplênica (baço).

2.6. Ensaio Biológicos

2.6.1. Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico

O teste do micronúcleo é de grande importância para identificação de agentes clastogênicos e aneugênicos. O método descrito por Hayashi et al. (1990) e modificado por Oliveira et al. (2009) foi empregado neste experimento. Previamente preparada, a lâmina foi coberta por uma camada contendo 20µL de Alaranjado de Acridina (1,0 mg/mL). Finalizado este processo, 20µL de sangue periférico foi depositado sobre a lâmina, sendo a mesma recoberta por uma lamínula. A lâmina permaneceu em freezer (-20° C) por um período mínimo de sete dias. A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência (Bioval®), no aumento de 40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. Foram analisadas 2.000 células/animal e a análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA/Tukey ($p < 0,05$).

2.6.2. Ensaio de Fagocitose Esplênica

O baço foi macerado em solução fisiológica para a obtenção de uma suspensão homogênea de células por sucessivas aspirações com pipeta de Pasteur. Cem microlitros da suspensão celular foram colocadas em uma lâmina previamente corada com Alaranjado de Acridina (1,0 mg/mL) e recoberta por uma lamínula. As lâminas foram estocadas em um freezer até o momento da análise. A análise foi feita em microscópio de fluorescência (Bioval®, Modelo L

2000A) em um aumento de 400 vezes com filtro de 420-490nm e filtro de barreira de 520nm. Foram analisadas 200 células por animal. A ausência ou presença de fagocitose foi baseada na descrição de Hayashi et al. (1990). A estatística foi realizada por meio do teste ANOVA/Tukey ($p < 0,05$).

2.6.3. Contagem diferencial de Células do Sangue

Vinte microlitros sangue periférico foram utilizados para fazer um esfregaço em lâmina. Essas foram secas ao ar livre e coradas com Giemsa (10%) por 10 minutos. A leitura das lâminas foi feita por microscopia de campo claro em aumento de 1.000 vezes. Foram analisadas um total de 100 células/animal e diferenciadas em linfócitos, neutrófilos, monócitos, eusínófilos e basófilos. A estatística foi realizada por meio do teste ANOVA/Tukey ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Perfil fitoquímicos da fração hidrometanólica

A figura 1 apresenta o perfil cromatográfico obtido por HPLC e sua análise corroborada por compostos isolados anteriores dessa espécie, além de compostos fenólicos comercialmente disponíveis. Simultaneamente, para os demais picos presentes no cromatograma, os seus espectros de UV, bem como os tempos de retenção foram comparados entre si, com os observados para os compostos padrões e isolados e com outros compostos fenólicos descritos na literatura (SAKAKIBARA et al., 2003; ANDERSEN; MARKHAM, 2006). Os compostos fenólicos da fração hidrometanólica de folhas de *A. nutans* foram caracterizados pela presença de quercetina, flavan-3-ol e alguns derivados de ácido cinâmico. Os derivados de quercetina foram isolados e identificados de acordo com os dados espectrais de RMN, e foram elucidados como derivados de glucosídeos (SILVA et al., 2015), enquanto que outros derivados fenólicos foram comparados ao tempo de retenção obtido por co-injeção no aparelho de HPLC e/ou a sua semelhança no perfil espectral UV entre os descritos na literatura (SAKAKIBARA et al., 2003). O total de

flavonóides presentes no ANHMF foi estabelecido anteriormente, ou seja, foi de 9,03 μg equivalentes de flavonóides em quercetina/mg de fração (GONCALVES et al., 2013b).

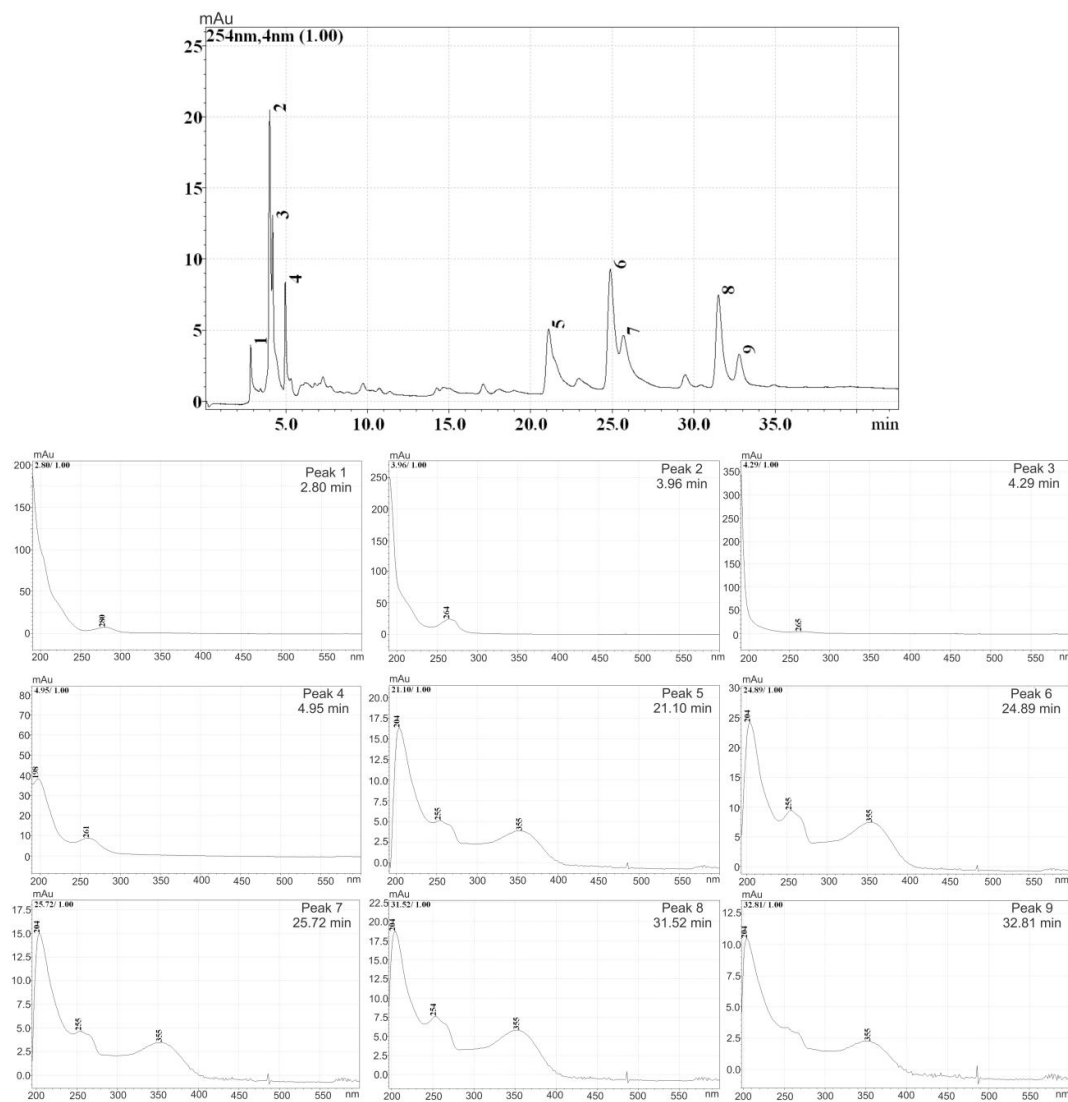


Figura 1: Perfis de cromatogramas de HPLC de ANHMF das folhas de *Annona nutans* registados a 254 nm e os espectros UV correspondente dos picos de UV no intervalo de 200-600 nm.

Tabela 1: Tempo de retenção (Rt) de compostos isolados e padrões disponíveis

Substância	Tempo de retenção (min)	Número do pico no ANHMF
Flavan-3-ol derivado	2.80 ^a	1
Flavan-3-ol derivado	3.96 ^a	2
Não identificado	4.29	3
Ácido clorogenico	4.94 ^b	4
3- <i>O</i> - β -apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-galactopyranosil-quercetina	21.10 ^c	5
3- <i>O</i> - β -galactopiranosil-quercetina	24.88 ^{b,c}	6
3- <i>O</i> - β -glucopiranosil-quercetina	25.69 ^{b,c}	7
3- <i>O</i> - β -galactopiranosil-isorhamnetina	31.52 ^c	8

Os picos 1 e 2 mostraram perfis espectrais que se assemelha aos derivados de catequina e epicatequina (a), respectivamente, tal como proposto no SAKAKIBARA et al. (2003). Os picos de 4-8 foram confirmados por ser co - injeção (b) comercialmente disponível, (c) compostos isolados (SILVA et al., 2015 2015), e o pico 3 não foi identificado.

3.2 Atividade inibidora do radical livre DPPH

A figura 2 mostra a atividade inibidora do radical livre DPPH do extrato e das frações de *A. nutans*. Foi considerado eficaz pela capacidade de inibição de radicais com valores de IC₅₀. Os dados mostram que, entre as amostras testadas, as frações que apresentam o efeito mais foram FAcOEt e EHMB com IC₅₀ de 2,01 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e 3,01 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, respectivamente, superior ao padrão BHT (3,77 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). A atividade diminuiu na seguinte ordem: FAcOEt > EHMB

> BHT > ANHMF > FCHCl₃ > FHEX . A alta atividade antioxidante observada pode ser atribuída à presença de flavonóides e outras substâncias fenólicas encontrados nessas frações (SILVA et al., 2015).

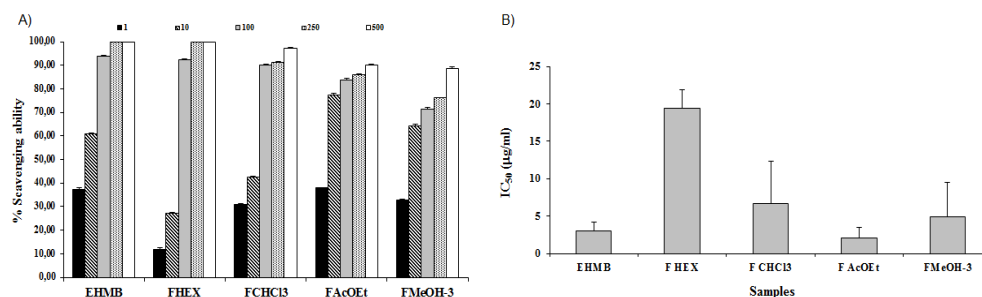


Figure 2: A) Atividade inibidora do radical livre DPPH do extrato hidrometanólico bruto (EHMB) e suas frações (FHEX, FCHCl₃, FAcOEt e ANHMF). B) O gráfico representa a concentração da dose que foi eficaz para inibição dos radicais em 50 % (IC₅₀) em µg/ml.

3.3. Estudos Biológicos

A Tabela 2 apresenta os valores médios dos pesos inicial e final dos animais dos diferentes grupos experimentais. A análise estatística indicou que não houve diferenças significativas para esses parâmetros. Os pesos relativos e absolutos do coração, bexiga, pulmão, fígado e rins são apresentados na tabela 3. Pode-se observar que não houve diferenças significativas nos pesos absolutos da bexiga, rim, fígado e pulmão. Com relação ao peso absoluto do coração, houve diferenças significativas entre o pré-tratamento com dose única e o pós-tratamento e o pré-tratamento com dose única e o contínuo, entretanto todos os grupos são iguais ao controle negativo. Quando comparado o peso relativo dos órgãos, apresentado na tabela 4, não houve diferenças significativas para o pulmão e os rins, entretanto para o coração, bexiga e fígado houve diferenças significativas entre o controle negativo e o grupo pré-tratamento dose única.

Em relação ao ensaio do micronúcleo a análise estatística indicou que o extrato hidrometanólico de *Annona nutans* não apresentou atividade mutagênica. Na avaliação de 24 horas a frequência média de micronúcleos foi de $4,50 \pm 1,35$ (Controle Negativo = $2,80 \pm 1,03$), e em 48 e 72 horas as

frequências foram de $2,90 \pm 1,45$ e $3,37 \pm 1,92$ (Controle Negativo: 48h – $5,90 \pm 2,02$; 72h – $3,20 \pm 1,48$), respectivamente (Tabela 5).

A avaliação da antimutagenicidade, em 24 horas, indicou atividade quimiopreventiva para os protocolos de pré-tratamento, em administração de dose única e doses múltiplas (15 dias de tratamento consecutivos) e tratamento contínuo e as porcentagens de redução de danos apresentadas foram da ordem de 91,44%, 41,18% e 91,44%, respectivamente. Esses dados demonstraram que não houve uma correlação direta entre o número de doses administradas e o aumento a atividade quimiopreventiva. Para os protocolos que não apresentaram efetividade significativa, as porcentagens de redução de danos foram da ordem de 15,72% e 12,03% para o tratamento simultâneo e o pós-tratamento, respectivamente (Tabela 5).

Na avaliação de 48 horas todos os tratamentos apresentaram atividade antimutagênica significativa e as porcentagens de redução de danos foram da ordem de 83,58%, 79,48%, 52,98%, 52,35% e 83,58% para os protocolos de pré-tratamento em dose única, pré-tratamento em doses múltiplas, tratamento simultâneo, pós-tratamento e tratamento contínuo (Tabela 5).

Na avaliação de 72 horas não houve indicação de atividade quimiopreventiva. Nesse mesmo período verificou-se que a atividade mutagênica da ciclofosfamida não foi significativa (Controle Negativo = $3,20 \pm 1,48$; Controle Positivo = $4,56 \pm 1,67$) (Tabela 5).

A análise da fagocitose esplênica indicou que a ciclofosfamida, o extrato etanólico de *A. nutans* e todos os protocolos de associação, exceto o pós-tratamento, induziram aumento estatisticamente significativo da fagocitose esplênica. Os dados demonstraram que não houve uma correlação direta entre o número de doses administradas e o aumento a atividade esplênica assim como foi indicado para a atividade quimiopreventiva (Tabela 6).

Na Tabela 7 estão apresentados os valores médios $\pm$ desvio padrão da contagem diferencial de células do sangue. A análise estatística permite inferir que para a o período de 24 e 72 horas os parâmetros de linfócitos e neutrófilos apresentam diferenças significativas entre os grupos experimentais e o mesmo ocorre para a avaliação de 48 horas para linfócitos. No entanto, apesar das diferenças apontadas pela análise estatística todos os parâmetros encontram-se dentro dos valores de referência.

4. Discussão

A carcinogênese é definida como mutações genéticas que podem ser herdadas ou adquiridas pela ação de agentes químicos, radioativos, ambientais e outros (COTRAN et al., 2000), e é dividida em 3 etapas: iniciação, momento de exposição ao agente carcinogênico com consequente mutação; promoção, multiplicação das células com mutação e progressão, fase em que as células crescem descontroladamente (NERURKAR et al., 2010; LIOTTA; KOHN, 2001).

Ensaio pré-clínicos e clínicos permitiram um conhecimento maior sobre os processos relacionados à carcinogênese e demonstraram que além da terapia anti-câncer as prevenções ao câncer também são importantes para o seu controle, dentre elas a quimioprevenção (GESCHER; STEWARD, 2005).

A quimioprevenção pode interferir em todas as fases do processo de carcinogênese através da proteção de células normais frente a um carcinógeno ou ainda pela eliminação das células pré-malignas (MAITI et al., 2009). Ela é definida como um tratamento que utiliza agentes sintéticos, biológicos ou naturais para reverter, suprimir ou impedir a carcinogênese (STEWARD; BROWN, 2013). Diante disso, o estudo das plantas medicinais utilizados na medicina popular é de extrema importância, como fonte de drogas com potencial quimioterapêutico (ELGORASHI et al., 2003; ARORA et al., 2005; VARANDA, 2006).

Estudos fitoquímicos e farmacológicos sobre as espécies da família Annonaceae tem se intensificado nos últimos anos devido os seus compostos possuírem uma grande variedade de efeitos biológicos (GONZALEZ-ESQUINCA et al., 2014; ALALI et al., 1999). Vários compostos foram identificados tais como: acetogeninas, alcalóide, esteróides, terpenos, saponinas, fenóis, triterpenoides, taninos flavonóides e óleos (PINTO et al., 2005; INOUE, 2010; GLEYE, 2000; LEBOEUF, 1982; VARADHARAJAN et al., 2012), com atividades citotóxica (MORITA, 2000), anti-tumoral (BARRACHINA et al., 2007), antihepatóxica (PADMA et al., 1999), antiparasitária (AJAIYEOBA et al., 2006), pesticida, antimicrobial (KOTKAR et al., 2002), anti-inflamatória (FOONG; HAMID, 2012), antielmintica (ALAWA et al., 2003).

Os flavonoides e outras substâncias fenólicas têm uma estrutura que favorece o seqüestro do radical DPPH, e esta atividade depende da sua estrutura química. De acordo com Barreiros et al. (2006), quanto maior for o número de hidroxilas, a maior será sua atividade como agente doador de eletrons e H•.

A estabilidade do radical livre flavanoide formado depende da habilidade do flavonóide em deslocalizar o elétron desemparelhado. A presença de hidroxilas em orto é o principal fator que ajuda na referida deslocalização. Os outros fatores são a presença de insaturação no anel C e hidroxila em C-4' em B conjugada com a carbonila; ângulo do anel B do flavonóide e do radical formado em relação ao restante da estrutura, este ângulo é regulado pela presença ou ausência de hidroxila em C-3; presença de duas insaturações em C; conjugação da carbonila em C-4 com hidroxila em C-5 e, presença de hidroxila em C-7. A doação de H• ocorre principalmente nas posições 7-OH > 4'-OH > 5-OH, seguindo a sequência de constantes de dissociação. A doação do radical H para o radical livre ocorre principalmente na posição C-4 e C-7 (BARREIROS *et al.*, 2006). Isto justifica a IC₅₀ = 4,89 µg L⁻¹ para ANHMF, IC₅₀ = 3,01 µg.L⁻¹ para EHMB e IC₅₀ = 2,1 µg.L⁻¹ para FAcOEt inferior ao BHT (16,36 µg.L⁻¹) (Figura 1), porque estas frações tem flavonóide com tri-hidroxila C - 4 ' , C - 5 e C - 7 , e as hidroxilas em orto no anel B .

Estudos realizados com a *Annona nutans* ainda são escassos, entretanto trabalhos anteriores referentes a outras espécies de *Annona*, indicam atividade pesticidas e antitumoral (SANTOS PIMENTA et al., 2003) algumas substâncias já foram identificadas as acetogeninas (GLEYE et al., 2000), com atividades citotóxicas, pesticidas, antitumoral, antiparasitária (ALALI et al., 1999; WAECHTER et al., 1998), alcalóides (SANTOS PIMENTA et al., 2003), com efeitos citóxicos e antiparasitário (LIMA, 2012), quercetina, com atividades antidiabéticos, antioxidante (PANDA; KAR, 2007; LAGE et al., 2014), e ácido cinâmico com efeito antitumoral (LIU et al., 1995) na família Annonaceae.

Tendo em vista as diversas atividades biológicas dos compostos desta planta, o presente estudo avaliou atividade (anti)mutagênica e imunomodulatória do extrato hidrometanólico da *Annona nutans* por meio do

teste do micronúcleo, da contagens diferenciais de células no sangue periférico e da atividade fagocitária esplênica.

De acordo com os resultados encontrados, a administração do extrato de *A. nutans* não apresentou atividade mutagênica. Esse estudo corroborou com os estudos realizados em espécies do mesmo gênero (VILAR et al., 2008; THAKKAR et al., 2010; VILAR et al., 2011; GARCIA; NEPOMUCENO, 2011).

Para elucidar os possíveis mecanismos de ação dos produtos naturais em antimutagênese diferentes protocolos de tratamento podem ser utilizados (MAURO et al., 2014). Portanto, neste estudo, camungondos machos tratados com extrato de *Annona nutans* e ciclofosfamida, pré-tratamento ou tratamento simultâneo indicam ações desmutagênicas, o pós-tratamento sugere mecanismo de bioantimutagênico e o tratamento contínuo está relacionado as ações desmutagênicas e bioantimutagênico (ANTUNES; ARAÚJO, 2000; SILVA et al., 2005).

O grupo pré-tratamento nos protocolos dose única e doses múltiplas e o contínuo, em 24 horas, mostraram uma percentagem de redução de danos de 91,44%, 41,18% e 91,44%, demonstrando que o extrato atua de forma quimiopreventiva. Os grupos simultâneos e pós-tratamento apresentaram uma baixa taxa na redução de danos. Estes dados sugerem que o extrato possui ação tanto bioantimutagênico como desmutagênico. Sendo que a atividade desmutagênica foi mais eficaz tal como sugerido pela redução de danos nos protocolos do grupo pré-tratamento e contínuo no ensaio do micronúcleo.

De acordo com Thakkar et al. (2010), o extrato da folha de *Annona squamosa*, em 24 horas, mostrou que no grupo pré-tratamento houve uma redução significativa na frequência de aberrações estruturais cromossômicas induzidas por ciclofosfamida em células de medula óssea, mostrando assim seu efeito desmutagênico. Ainda, segundo Dragano et al. (2010) a polpa do fruto *Annona crassiflora* potencializou a ação da ciclofosfamida (CP) e não apresentou efeitos mutagênicos e antimutagênicos.

Um dos métodos mais adequados contra o desenvolvimento da carcinogênese seria a prevenção. Um crescente número de pesquisas sugere muitos tipos de cânceres poderiam ser prevenidos (WEINSTEIN, 1991). Nos últimos anos, a investigação sobre o papel de plantas medicinais, planta inteira

ou com compostos isolados, na quimioprevenção da carcinogênese vem aumentando e apresenta resultados promissores (SERPELONI et al., 2008).

Recentemente, os compostos polifenóis têm recebido uma atenção especial devido aos benefícios para a saúde, incluindo as propriedades anticâncer, apresentando-se como um agente quimiopreventivo. Estudos mostram que esse processo pode estar relacionado com a interrupção ou reversão do processo da carcinogênese ou ainda pela regulação dos mecanismos de defesa celular e morte celular (RAMOS, 2008; KHAN et al., 2007; BRUNTON et al., 2012)

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários encontrados nos vegetais, geralmente derivados de reações de defesa contra agressões do ambiente. Essa classe de compostos possui grande diversidade entre elas os flavonoides, que são amplamente distribuídos nos vegetais e apresenta atividade antioxidante e anticarcinogênica, por inativação do desenvolvimento da carcinogênese, proteção de danos oxidativos ao DNA, modulação do sistema imune entre outros (SILVA et al., 2010, BRAVO, 1998).

Quando foram relacionados os dados do teste do micronúcleo com os resultados da fagocitose esplênica, pode-se notar que a taxa de fagocitose se encontrou significativamente maior que no controle, exceto para o pós-tratamento. Esse fato sugere que a administração do extrato proporciona um aumento da atividade fagocítica o que indica imunomodulação, características essas que permitem inferir a atividade quimioprotetora para o composto.

Esses dados corroboram com os achados na contagem de células diferenciais, onde não houve alteração no número de monócitos circulantes, sugerindo que os monócitos poderiam já ter migrado para o baço, explicando assim o aumento da atividade fagocítica. Os macrófagos são fagócitos que tem por função remover parasitas, bactérias e corpos estranhos, sendo que essa capacidade é mais eficiente e rápida que outras células do sistema imune (HASCHEK et al., 2013). Sendo assim, presume-se que a redução da frequência de micronúcleos em reticulócitos do sangue periférico pode estar relacionada com a melhoria da atividade fagocítica das células do baço (ALVES DE LIMA, 2006). Sabe-se que o baço é o maior órgão linfóide do corpo humano, contendo mais de 95% da quantidade total de macrófagos do sistema mononuclear fagocitário.

Existem poucos dados relacionados à atividade imunomodulatória dos extratos de *Annona* sp. Segundo Siebra et al. (2009), os extratos de *A. glabra* inibem a migração natural de granulócitos, dose – dependente, sugerindo ação antiinflamatório, entretanto não foi observado relação a imunomodulação.

As plantas são importantes fontes de substâncias químicas com ação na modulação do sistema imune (BASSO et al., 2005). Atividades imunossupressora, imunoestimuladora ou imunorregulatória vem sendo investigadas utilizando-se grande número de plantas e seus constituintes (PATWARDHAN; MANISH, 2005). Várias plantas de uso medicinal tem mostrado efeitos anti-infecciosos, anti-cancerígenas e anti-inflamatórios, entre outros, modulando as respostas imunes, sendo estes denominados de imunomoduladores (BIN-HAFEEZ et al., 2003).

Esses agentes imunomoduladores podem estimular macrófagos, aumentar a proliferação de linfócitos T, promover a formação de anticorpos, ativar o sistema complemento e modular a secreção de citocinas (BIELLA, 2007). Uma variedade de substâncias, como polissacarídeos, lectinas, óleos, saponinas, flavonoides, polifenóis oriundas de plantas são capazes de estimular o sistema imune apresentando tal atividade (NUNES-PINHEIRO et al., 2003).

A quercetina 3-O-glicolisada, flavonoide encontrado no extrato de *Annona nutans*, possui várias atividades biológicas conhecidas como anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, imunomodulatória, o qual pode interferir na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), desgranulação e apoptose (BEHLING et al., 2004).

De acordo com os resultados apresentados a fração hidrometalóica de *A. nutans* possui um efeito imunomodulatório por melhorar a atividade fagocítica do baço e atua tanto por desmutagênese como por biomutagênese, com um melhor desempenho por desmutagênese.

5. Referências

Ajaiyeoba, E., Falade, M., Ogbale, O., Okpako, L., Akinboye, D. (2006) *In vivo* antimalarial and cytotoxic properties of *Annona senegalensis* extract. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, **3**, 137-141.

Alali, F. Q., Xiao-Xi, L. McLaughlin, J. L. (1999) Annonaceous acetogenins: recent progress. *Journal Natural Products*, **62**, 504-540.

Alawa, C. B., Adamu, A. M., Gefu, J. O., Ajanusi, O. J., Abdu, P. A., Chiezey, N. P., Alawa, J. N., Bowman, D. D. (2003) In vitro screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. *Veterinary Parasitology*, **113**, 73-81.

Alves de Lima, P. L., 2006. *Lentiluns edodes* (Berk.) Singer: Mecanismo de modulação da mutagênese química *in vivo* e alterações de efeito durante a estocagem. 46p. Tese -Doutorado em Patologia. Faculdade de Medicina-UNESP- Botucatu- São Paulo- Brasil.

Andersen, Ø. M. E., Markham, K. R. (2006) Preface. In: *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. (eds: Andersen, Ø.M. and Markham, K.R.). Boca Raton, Florida, USA, CRC Press, Taylor & Francis Group.

Antunes, L. M. G. e Araujo, M. C. P. (2000) Mutagenicity and antimutagenicity of the main food colorings, *Revista de Nutrição*, **13**, 81-88.

Arora, R., Gupta, D., Chawla, R., Sagar, R., Sharma, A., Kumar, R., Prasad, J., Singh, S., Samanta, N., Sharma, R. K. (2005) Radioprotection by plant products: present status and future prospects. *Phytotherapy Research*, **19**, 1-22.

Barrachina, I., Royo, I., Baldoni, H. A., Chahboune, N., Suvire, F., DePedro, N., Zafra-Polo, M. C., Bermejo, A., El Aouad, N., Cabedo, N., Saez, J., Tormo, J. R., Enriz, R. D., Cortes, D. (2007) New antitumoral acetogenin 'Guanacone type' derivatives: isolation and bioactivity. Molecular dynamics simulation of diacetyl-guanacone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15**, 4369-4381.

Barreiros, A. L. B. S., David, J. M. e David, J. P. (2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.

Química nova, **29**, 113-123.

Basso, L. A., da Silva, L. H., Fett-Neto, A. G., de Azevedo, W. F. Jr., Moreira Ide, S., Palma, M. S., Calixto, J. B., Astolfi Filho, S., dos Santos, R. R., Soares, M. B., Santos, D. S. (2005) The use of biodiversity as source of new chemical entities against denifed molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis and T-cell mediated diseases. A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**, 575-606.

Behling, E. B., Sendão, M. C., Francescato, H. D. C., Antunes, L. M. G., Bianchi, M. L. P. (2004) Flavonoide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, **15**, 285-292.

Bermejo, A., Figadére, B., Zafra-Polo, M., Barracinha, I., Estornell, E., Cortes, D. (2005) Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Natural Product Reports*, **22**, 269-303.

Biella, C. A. (2007) Avaliação da atividade imunomoduladora de *Alternanthera tenella* Colla e investigação de ações do extrato aquoso em modelo de artrite experimental. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências Aplicadas à Farmácia. Ribeirão Preto.

Bin-Hafeez, B., Haque, R., Parvez, S., Pandey, S., Sayeed, I., Raisuddin, S. (2003) Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract in mice. *International Immunopharmacology*, **3**, 257-265.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. e Berset C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxi dant activity. *Food Science and Technology*, **28**, 25-30.

Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, v. 31, 317-333.

Brunton, L. L., Chabner, B. A., Knollmann, B. C. 2012. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman - 12.ed. 2121p.

Burda, S. and Oleszek, W. (2001) Antioxidant and anti- radical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 2774-2779.

Caparros-Lefebvre, D. e Steele, J. (2005) Atypical parkinsonism on Guadeloupe, comparison with the parkinsonism-dementia complex of Guam, and environmental toxic hypotheses. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **19**, 407-413, 2005.

Champy, P., Höglinger, G. U., Féger, J., Gleye, C., Hocquemiller, R., Laurens, A., Guérineau, V., Laprévote, O., Medja, F., Lombès, A., Michel, P. P., Lannuzel, A., Hirsch, E. C., Ruberg, M. (2004) Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Journal of Neurochemistry*, **88**, 63-69.

Chang, F. R., Chen, J., Chiu, H., Wu, M., Wu, Y. (1998) Acetogenins from seeds of *Annona reticulata*. *Phytochemistry*, **47**, 1057-1061.

Chen, C., Chang, F., Chiu, H., Wu, M., Wu, Y. (1999) Aromin-A, an Annonaceous acetogenin from *Annona cherimola*. *Phytochemistry*, **51**, 429-433.

Chen, Y., Xu, S. S., Chen, J. W., Wang, Y., Xu, H. Q., Fan, N. B., Li, X. (2012) Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seeds extract containing annonaceous acetogenin compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, **142**, 462-466.

Cotran, R. S., Kumar, V., Robbins, S. L. (2000) Patologia estrutural e funcional. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Silva, A. F., Oliveira, R. J., Matuo, R., Ribeiro, L. R. (2005) Mantovani, M. S. Effects of agaricus blazei on clastogenicity induced by ultraviolet radiation in

culture of CHO-K1 cells. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, **26**, 131-140.

Lima, J. P. S., Pinheiro, M. L. B., Santos, A. M. G., Pereira, J. L. S., Santos, D. M. F., Barison, A., Costa, E. V. (2012) Atividade Antileishmania e Citotóxica *In Vitro* de *Annona mucosa* (Annonaceae). *Revista Virtual de Química*, **4**, 692-702.

Dragano, N. R., de Venancio, V. P., Paula, F. B., Della Lucia, F., Fonseca, M. J., Azevedo, L. (2010) Influence of Marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress in vivo. *Plant Foods for Human Nutrition*, **65**, 319-325.

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

Foong, C. P. E. e Hamid, R. A. (2012) Evaluation of anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Annona muricata* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **22**, 1301-1307.

Garcia, T. A. e Nepomuceno, J. C. (2011) Atividade antigenotóxica da polpa da graviola (*Annona muricata*), avaliada por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster*. *Unipam*, **8**, 70-80.

Gescher, A. e Steward, W. P. (2005) Cancer chemoprevention--an update on a (still) novel and exciting field of oncology. *European Journal of Cancer*, **41**, 1831-1832.

Gleye, C., Raynaud, S., Fourneau, C., Laurens A., Laprévote, O., Serani, L., Fournet, A., Hocquemiller, R. (2000) Cohibins C and D, two important metabolites in the biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and *Annona nutans*. *Journal Natural Product*, **63**, 1192-1196.

Gonçalves, C. A., Silva, N. L., Mauro, M. O., David, N., Cunha-Laura, A. L. , Auharek, S. A., Monreal, A. C., Vieira, M. C., Silva, D. B., Santos, F. J., Siqueira, J. M., Oliveira, R. J. (2013b) Evaluation of mutagenic, teratogenic, and immunomodulatory effects of *Annona nutans* hydromethanolic fraction on pregnant mice. *Genetics and Molecular Research*, **13**, 4392-4405.

González-Esquinca, A. R., De-La-Cruz-Chacón, I., Castro-Moreno, M., Orozco-Castillo, J. A., Riley- Saldaña, C. A. (2014) Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. *Revista Brasileira de Fruticultura*, **36**, 01-16.

Gupta-Elera, G., Garrett, A. R., Martinez, A., Robison, R. A., O'Neill, K. (2011) The antioxidant properties of the cherimoya (*Annona cherimola*) fruit. *Food Resesearch International*, **44**, 2205-2209.

Haschek, W. M., Rousseaux, C. G., Wallig, M. A. (2013) New York, NY: Elsevier/Academic Press, 3rd ed.

Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*, **245**, 245-249.

Inoue, M. H., Santana, D. C., Vilhena, K. S. S., Souza Filho, A. P. S., Guilhon, G. M. S. P., Possamai, A. C. S., Silva, L. E., Dallacort, R. (2010) Allelophatic Potential of Substances Isolated from *Annona crassiflora* Seeds. *Planta Daninha*, **28**, 735-741.

Khan, N., Farrukh, A. e Hasan, M. (2007) Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth. *Carcinogenesis*, **28**, 233–239.

Kotkar, H. M., Mendki, P. S., Sadan, S. V., Jha, S. R., Upasani, S. M., Maheshwari, V. L. (2002) Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. *Pest Management Science*, **58**, 33-37.

Lage, G. A., Medeiros, F. da S., Furtado Wde, L., Takahashi, J. A., de Souza Filho, J. D., Pimenta, L. P. (2014) The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. *Natural Product Research* **28**, 808-811.

Leboeuf, M., Cavé, A., Bhaumik, P. K., Mukherjee, B., Mukherjee, R. (1982) The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, **21**, 2783-2813.

Liotta, L. A, Kohn, E. C. (2001) The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, **411**, 375-379.

Liu, L., Hudgins, W. R., Shack, S., Yin, M. Q., Samid, D. (1995) Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention. *International Journal of Cancer*, **62**, 345-350.

Maiti, A., Reddy, P. V., Sturdy, M., Marler, L., Pegan, S. D., Mesecar, A. D., Pezzuto, J. M., Cushman, M. (2009) Synthesis of casimiroin 70 and optimization of its quinone reductase 2 and aromatase inhibitory activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, **52**, 1873-1884.

Matos, M. F., Leite, L. I., Brustolim, D., de Siqueira, J. M., Carollo, C. A., Hellmann, A. R., Pereira, N. F., da Silva, D. B. (2006) Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriuscula*. *Fitoterapia*, **77**, 227-229.

Mauro, M. O., Pesarini, J. R., Marin-Morales, M. A., Monreal, M. T., Monreal, A. C., Mantovani, M. S., Oliveira, R. J. (2014) Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. *Genetics and Molecular Research*, **13**, 4808-4819.

Mclaughlin, J. L. (2008) Paw paw and cancer: annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. *Journal of Natural Products*, **71**, 1311-1321.

Morita, H., Sato, Y., Chan, K., Choo, C., Itokawa, H., Takeya, K., Kobayashi, J. (2000) Samoquasine A, a benzoquinazoline alkaloid from the seeds of *Annona squamosa*. *Journal of Natural Products*, **63**, 1707-1708.

Nerurkar, P., Ray, R. B. (2010) Bitter melon: antagonist to cancer. *Pharmaceutical Research*, **27**, 1049-1053.

Nunes-Pinheiro, D. C. S., Leite, A. K. R. M., Farias, V. M., Braga, L. T., Lopes, C. A. P. (2003) Immunomodulatory activity of the medicinal plants: perspectives for veterinary medicine. *Ciência Animal*, **13**, 23-32.

Oliveira, R. J. (2009) Os compostos 6-dimetilaminopurina e ciclohexamida são genotóxicos, mutagênicos, alteram o desempenho reprodutivo e a expressão dos genes TP53, CASP9 e CCNA em sistemas testes de mamíferos. Tese de Doutorado. Unesp, Rio Claro- SP.

Padma, P., Chansouria, J. P. N., Khosaa, R. L. (1999) Hepatoprotective activity of *Annona muricata* Linn. and *Polyalthia cerasoides* bedd. *Ancient Science of Life*, **19**, 7-10.

Padmaja, V., Thankamany, V., Hara, N., Fujimoto, Y., Hisham, A. (1995) Biological activities of *Annona glabra*. *Journal of Ethnopharmacology*, **48**, 21-24.

Panda, S. Kar, A. (2007) Antidiabetic and antioxidative effects of *Annona squamosa* leaves are possibly mediated through quercetin-3-O-glucoside. *Biofactors*, **31**, 201-210.

Patwardhan, B., Gautam, M. (2005) Botanical immunodrugs: scope and opportunities. *Drug Discovery Today*, **10**, 495-502.

Pinto, A. C. Q., Cordeiro, M. C. R., Andrade, S. R. M., Ferreira, F. R., Filgueiras, H. A. C., Alves, R. E., Kinpara, D. I. (2005) *Annona* species,

International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton, UK.

Pio Corrêa, M. (1926) Dicionário de plantas Úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.

Ramos, S. (2008) Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways, *Molecular Nutrition & Food Research*, **52**, 507 – 526.

Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., Kanazawa, K. (2003) Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 571-581.

Santos Lima, L. A. R., Pimenta, L. P. S., Boaventura, M. A. D. (2010) Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity, *Food Chemistry*, **122**, 1129–1138.

Santos Pimenta, L. P., Pinto, G. B., Takahashi, J. A., Silva, L. G., Boaventura, M. A. (2003) Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). *Phytomedicine*, **10**, 209-212.

Serpeloni, J. M., Vilegas, W., Varanda, E. A., Cólus, I. M. S. (2008) In vivo evaluation of anticlastogenicity of extracts from medicinal plants of Miconia genus using the micronucleus test. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, **29**, 47-56.

Siebra, C. A., Nardin, J. M., Florão, A., Rocha, F. H., Bastos, D. Z., Oliveira, B. H., Weffort-Santos, A. M. (2009). Potencial antiinflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **19**, 82-88.

Silva, M. L. C., Costa, R. S., Santana, A. S., Koblitz, M. G. B. (2010) Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. *Semina: Ciências Agrárias*, **31**, 669-682.

Silva, N. L., Zobiole, N. N., Silva, D. B., Sartori, A. L. B., Oliveira, R. J., Pinto, M. E. A., Santosa, F. J. L., Siqueira, J. M. (2015, 2015) Constituintes químicos e atividade fitotóxica das folhas de *Annona nutans*. *Química Nova*.

Steward, W. P., Brown, K. (2013) Cancer Chemoprevention: A Rapidly Evolving Field. *British Journal of Cancer*, **109**, 1-7.

Thakkar, T. H., Solanki H. K., Tripathi, P., P. N. J., Jani, G. K. (2010) Evaluation of antimutagenic potential of *Annona squamosa* leaf extract. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, **1**, 114-123.

Varadharajan, V., Janarthanan, U. K., Krishnamurthy, V. (2012) Physicochemical, phytochemical screening and profiling of secondary metabolites of *Annona squamosa* leaf extract. *World Journal of Pharmaceutical Research*, **1**, 1143-1164.

Varanda, E. A. (2006) Atividade mutagênica de plantas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **27**, 1-7.

Vilar, J. B., Ferreira, F. L., Ferri, P. H., Guillo, L. A., Chen Chen, L. (2008) Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. *Brazilian Journal of Biology*, **68**, 141-147.

Vilar, J. B., Ferri, P. H., Chen-Chen, L. (2011) Genotoxicity investigation of araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test. *Brazilian Journal of Biology*, **71**, 197-202.

Waechter, A., Yaluff, G., Inchausti, A., Arias, A. R., Hocquemiller, R., Cavé, A., Fournet, A. (1998) Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Acetogenins Isolated from *Annona glauca*. *Phytotherapy Research*, **12**, 541-544.

Weinstein, I. B. (1991) Cancer prevention: recent progress and future

opportunities. *Cancer Research*, **51**, 5080-5085.

.

Tabela 2 – Parâmetros relativos ao desenvolvimento ponderal dos camundongos tratados com *Annona nutans* e controles:

Grupos Experimentais	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle Negativo	42,68±5,04 ^a	42,83±4,97 ^a
Controle Positivo	40,21±2,51 ^a	39,81±2,24 ^a
Extrato hidrometânico	40,51±3,80 ^a	40,98±3,51 ^a
Pré-tratamento – Dose Única	39,71±2,08 ^a	40,22±3,59 ^a
Pré-tratamento – Doses Múltiplas	43,74±2,79 ^a	43,04±3,14 ^a
Tratamento Simultâneo	42,70±2,95 ^a	42,12±3,74 ^a
Pós-tratamento	39,55±4,98 ^a	39,06±4,80 ^a
Tratamento Contínuo	40,60±4,38 ^a	40,38±3,71 ^a

Legenda: Controle Negativo – Veículo *A. nutans* (solução DMSO 1%)+ Solução Fisiológica; Controle Positivo – Veículo *A. nutans* (solução DMSO 1%+ Solução Fisiológica) + Ciclofosfamida (75mg/kg p.c., i.p.). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05; ANOVA/Tukey).

Tabela 3- Parâmetros relativos ao peso total dos órgãos dos camundongos tratados com *Annona nutans* e controles:

Grupos Experimentais	Peso Total (g)				
	Coração	Bexiga	Rins	Fígado	Pulmão
Controle Negativo	0,20±0,04 ^{a,b,c}	0,03±0,01a	0,47±0,08 a	1,45±0,29 ^{a,b} ,	0,023±0,04
Controle Positivo	0,19±0,02 ^{a,b,c}	0,05±0,01 a	0,44±0,05 a	1,59±0,17 ^{a,b}	0,21±0,04
Extrato hidrometanólico	0,20±0,04 ^{a,b,c}	0,03±0,00 a	0,46±0,03 a	1,60±0,10 ^{a,b}	0,24±0,04
Pré-tratamento – Dose Única	0,23±0,02b,c	0,04±0,02 a	0,50±0,07 a	1,81±0,22b	0,28±0,08
Pré-tratamento – Doses Múltiplas	0,20±0,03c	0,03±0,01 a	0,49±0,05 a	1,81±0,22 ^{a,b}	0,22±0,04
Tratamento Simultâneo	0,19±0,03 ^{a,b}	0,03±0,01 a	0,42±0,04 a	1,54±0,21 a	0,22±0,03
Pós-tratamento	0,17±0,01 ^{a,b,c}	0,03±0,01 a	0,45±0,05 a	1,46±0,23 ^{a,b}	0,23±0,04
Tratamento Contínuo	0,18±0,01 ^{a,c}	0,03±0,00 a	0,45±0,03 a	1,38±0,27 ^{a,b}	0,24±0,02

Legenda: Controle Negativo – Veículo *A. nutans* (solução DMSO 1%)+ Solução Fisiológica; Controle Positivo – Veículo *A. nutans* (solução DMSO 1%+ Solução Fisiológica) + Ciclofosfamida (75mg/kg p.c., i.p.). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05; ANOVA/Tukey).

Tabela 4- Parâmetros relativos ao peso relativos dos órgãos dos camundongos tratados com *Annona nutans* e controles:

Grupos Experimentais	Peso Relativo (g)				
	Coração	Bexiga	Rins	Fígado	Pulmão
Controle Negativo	0,0046±0,0007 ^a	0,0007±0,0003 ^a	0,0111±0,0014 ^{a, b}	0,0336±0,0038 ^a	0,005±0,0009 ^a
Controle Positivo	0,0048±0,0005 ^{a, b, c}	0,0012±0,0003 ^b	0,0112±0,0014 ^{a, b}	0,0399±0,0032 ^b	0,0052±0,001 ^a
Extrato hidrometanólico	0,0049±0,0010 ^{b, c}	0,0009±0,0001 ^{a, b}	0,0113±0,0010 ^{a, b}	0,0394±0,0051 ^a	0,0059±0,0011 ^{a, b}
Pré-tratamento – Dose Única	0,0057±0,0006 ^c	0,0012±0,0006 ^b	0,0128±0,0027 ^b	0,0456±0,0054 ^b	0,0070±0,0020 ^b
Pré-tratamento – Doses Múltiplas	0,0046±0,0005 ^a	0,0009±0,0002 ^{a, b}	0,0114±0,0010 ^{a, b}	0,0320±0,0030 ^a	0,0052±0,0012 ^a
Tratamento Simultâneo	0,0045±0,0005 ^a	0,0009±0,0002 ^{a, b}	0,0100±0,0009 ^a	0,0366±0,0029 ^a	0,0054±0,0010 ^{a, b}
Pós-tratamento	0,0044±0,0005 ^a	0,0010±0,0002 ^{a, b}	0,0118±0,0018 ^{a, b}	0,0379±0,0075 ^{a, b}	0,0060±0,0013 ^{a, b}
Tratamento Contínuo	0,0045±0,0006 ^a	0,0008±0,0001 ^{a, b}	0,0112±0,0014 ^{a, b}	0,0345±0,0080 ^a	0,0061±0,0007 ^{a, b}

Legenda: Controle Negativo – Veículo *A. nutans* (solução DMSO 1%)+ Solução Fisiológica; Controle Positivo – Veículo *A. nutans* (solução DMSO 1%+ Solução Fisiológica) + Ciclofosfamida (75mg/kg p.c., i.p.). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05; ANOVA/Tukey).

Tabela 5 – Valores médios $\pm$ desvio padrão da média referentes ao ensaio de micronúcleo em sangue periférico de camundongos tratados com *Annona nutans* e controles:

Grupos Experimentais	Tempo de Coleta					
	24 horas		48 horas		72 horas	
	Média $\pm$ DP	%RD	Média $\pm$ DP	%RD	Média $\pm$ DP	%RD
Mutagenicidade						
Controle Negativo	2,80 $\pm$ 1,03 ^a	-	5,90 $\pm$ 2,02 ^a	-	3,20 $\pm$ 1,48 ^a	-
Controle Positivo	21,50 $\pm$ 2,99 ^c	-	32,70 $\pm$ 3,33 ^d	-	4,56 $\pm$ 1,67 ^{a,b}	-
Extrato hidrometânico	4,50 $\pm$ 1,35 ^a	-	2,90 $\pm$ 1,45 ^a	-	3,37 $\pm$ 1,92 ^{a,b}	-
Antimutagenicidade						
Pré-tratamento – Dose Única	4,40 $\pm$ 1,66 ^a	91,44	10,30 $\pm$ 2,21 ^{a,b}	83,58	3,40 $\pm$ 1,58 ^{a,b}	-
Pré-tratamento – Doses Múltiplas	13,80 $\pm$ 2,87 ^b	41,18	11,40 $\pm$ 2,76 ^b	79,48	3,33 $\pm$ 2,12 ^{a,b}	-
Tratamento Simultâneo	18,56 $\pm$ 2,19 ^c	15,72	18,50 $\pm$ 4,27 ^c	52,98	4,00 $\pm$ 2,45 ^{a,b}	-
Pós-tratamento	19,25 $\pm$ 1,83 ^c	12,03	18,67 $\pm$ 5,05 ^c	52,35	5,80 $\pm$ 1,48 ^b	-
Tratamento Contínuo	4,40 $\pm$ 1,65 ^a	91,44	10,30 $\pm$ 2,21 ^{a,b}	83,58	3,40 $\pm$ 1,58 ^{a,b}	-

Legenda: Controle Negativo – Veículo *A. nutans* (solução DMSO 1%)+ Solução Fisiológica; Controle Positivo – Veículo *A. nutans* (solução DMSO 1%+ Solução Fisiológica) + Ciclofosfamida (75mg/kg p.c., i.p.). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$; ANOVA/Tukey).

Tabela 6 – Número total de células analisadas, valores médios $\pm$ desvio padrão da média e porcentagem de células com e sem evidência de fagócitos esplênica em camundongos tratados com *Annona nutans* e controles:

Grupos Experimentais	Total de células sem evidência de fagocitose			
	Média $\pm$ DP	Porcentagem	Média $\pm$ DP	Porcentagem
		m		m
Controle Negativo	68,33 $\pm$ 16,10 ^a	34,16%	131,67 $\pm$ 16,10 ^a	65,84%
Controle Positivo	22,33 $\pm$ 3,42 ^{b,d}	11,16%	177,89 $\pm$ 3,65 ^{b,d}	88,83%
Extrato hidrometânico	26,10 $\pm$ 5,91 ^b	13,05%	173,90 $\pm$ 5,91 ^b	86,95%
Pré-tratamento – Dose Única	34,5 $\pm$ 6,77 ^b	17,25%	165,50 $\pm$ 6,77 ^b	82,75%
Pré-tratamento – Doses Múltiplas	34,9 $\pm$ 11,60 ^d	17,45%	165,10 $\pm$ 11,60 ^b	82,55%
Tratamento Simultâneo	49,8 $\pm$ 7,18 ^c	24,90%	150,20 $\pm$ 7,18 ^c	71,45%
Pós-tratamento	63,44 $\pm$ 13,60 ^a	28,72%	136,55 $\pm$ 13,60 ^{a,c}	61,45%
Tratamento Contínuo	17,90 $\pm$ 4,07 ^b	8,95%	182,10 $\pm$ 4,07 ^d	91,05%

Legenda: Controle Negativo – Veículo *A. nutans* (solução DMSO 1%)+ Solução Fisiológica; Controle Positivo – Veículo *A. nutans* (solução DMSO 1%+ Solução Fisiológica) + Ciclofosfamida (75mg/kg p.c., i.p.). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05; ANOVA/Tukey).

Tabela 7 – Valores Médios $\pm$ Desvio Padrão da contagem diferencial de células do sangue de camundongos tratados com *Annona nutans* e controles:

Parâmetros	Valores de Referência (%)	Grupos Experimentais							
		Controle Negativo	Controle Positivo	Extrato hidrometânico	Pré-tratamento		Tratamento Simultâneo	Pós-tratamento	Tratamento Contínuo
					Dose Única	Doses Múltiplas			
		24 horas							
Linfócito	55,0 - 95,0	66,10 ± 5,80a	67,90±8,2ª,b	66,90±8,12a	77,7 ± 55,1b	67,2 ± 5,88a	64,60 ± 3,72a	66,80 ± 1,99a	68,30 ± 12,21ª,b
Neutrófilo	10,0 - 40,0	37,00 ± 3,70a	31,9 ± 2,48ª,b	32,80 ± 2,55b	21,10 ± 5,34c	32,8± 8,1ª,b	34,70 ± 3,8ª,d	33,00 ± 2,00c	31,60 ± 12,29c
Monócito	0,1 - 3,5	0,10±0,31a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,60±0,96ª	0,20±0,42a	0,40±0,51a	0,20±0,42a	0,20±0,42a
Eosinófilo	0,0 - 0,4	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,30±0,48ª	0,22±0,44a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Basófilo	0,0 - 0,3	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,2±0,63ª	0,30±0,48ª	0,20±0,42a	0,20±0,42a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
		48 horas							
Linfócito	55,0 - 95,0	81,20 ± 5,41a	71,20± 8,70ª,b	68,20 ± 6,70a	70,90 ± 14,84ª,b	82,70 ± 5,40a	73,40 ± 5,40ª,b,c	67,10 ± 6,11b,c	64,60 ± 21,48b
Neutrófilo	10,0 - 40,0	24,60 ± 20,40a	28,10 ± 8,41ª	31,60 ± 6,88a	28,10 ± 9,19a	17,30 ± 5,39a	27,60 ± 5,58a	32,50 ± 6,19a	28,70 ± 15,27a
Monócito	0,1 - 3,5	0,10±0,31a	0,20±0,63ª	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,20±0,42a	0,30±0,48a
Eosinófilo	0,0 - 0,4	0,30±0,67a	0,20±0,42ª	0,00±0,00a	0,30±0,67a	0,20±0,42a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Basófilo	0,0 - 0,3	0,44±0,72a	0,10±0,31ª	0,00±0,00a	0,10±0,31a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,10±0,31a
		72 horas							
Linfócito	55,0 - 95,0	68,7 ± 3,89a	67,4 ± 6,17ª,b	59,5 ± 4,25ª,b	77,4 ± 6,31ª,b	66,2 ± 9,56a	68,7 ± 6,96ª,b,c	78,7 ± 3,56c,b	81,8 ± 3,42b
Neutrofilo	10,0 - 40,0	31,1 ± 3,63a	32,3 ± 5,67ª,b	40,1 ± 3,9b	22,4 ± 6,29c	33,5 ± 9,51ª,b	31 ± 6,6 a	21,1 ± 3,54c	18,1 ± 3,57c
Monócito	0,1 - 3,5	0,10±0,31a	0,30±0,67ª	0,40±0,51a	0,1±0,31a	0,2±0,42a	0,3±0,67a	0,2±0,42ª	0,1±0,31a
Eosinófilo	0,0 - 0,4	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Basófilo	0,0 - 0,3	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,10±0,31 a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a

Legenda: Controle Negativo – Veículo *A. nutans* (solução DMSO 1%)+ Solução Fisiológica; Controle Positivo – Veículo *A. nutans* (solução DMSO 1%+ Solução Fisiológica) + Ciclofosfamida (75mg/kg p.c., i.p.). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05; ANOVA/Tukey).

3.2 Manuscrito 2

Avaliação da atividade antimutagênica e imunomodulatória *in vivo* do extrato metanólico de *Byrsonima verbascifolia*

Nathalia Novak Zobiole¹, Rodrigo Juliano Oliveira^{1,2}, Nathalia Lucca Silva³,
Carlos Alexandre Carollo², João Máximo de Siqueira^{1,3}

¹Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina - FAMED, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de São João Del-Rei – UFSJ, Divinópolis, MG, Brasil.

Atualmente um grande número de substâncias que podem causar danos a saúde são despejadas no meio ambiente. Estas substâncias podem causar danos ao DNA e são conhecidas como mutagênicas. A avaliação mutagênica dos extratos é de grande importância, uma vez que eles podem ser fontes de novos fármacos. Diante desta perspectiva o presente trabalho avaliou a atividade mutagênica, antimutagênica e imunomodulatória do extrato metanólico de *Byrsonima verbascifolia in vivo*. Para tanto foram realizados os ensaios do micronúcleo em sangue periférico, fagocitose esplênica e contagem diferencial de células do sangue. Utilizou-se 80 camundongos machos Swiss adultos (n=10/grupo), divididos nos seguintes grupos: controle negativo, controle positivo, extrato, pré-tratamento dose única, pré-tratamento doses múltiplas, tratamento simultâneo, pós-tratamento e tratamento contínuo. A coleta de sangue para os ensaios do micronúcleo e contagem diferencial de células sanguíneas foram realizadas por punção da veia caudal em 24 (T1), 48 (T2) e 72 horas (T3) após o tratamento com ciclofosfamida ou veículo. Após a coleta os animais foram submetidos à eutanásia para coleta do baço destinado à fagocitose esplênica. Os resultados do ensaio do micronúcleo mostraram que o extrato apresentou atividade antimutagênica nos grupos pré-tratamento dose única, pré-tratamento doses múltiplas e simultâneo, com redução de danos de 63%, 48% e 47% em T1 e 92%, 95% e 56% em T2 e ainda para pós-tratamento 31% e contínuo 32%. Em relação ao ensaio de fagocitose esplênica, pode-se observar que o extrato, isoladamente e/ou associado à ciclofosfamida, aumenta a atividade fagocítica, exceto no pós-tratamento e

simultaneo. Quanto aos valores referentes à contagem diferencial de células sanguíneas mostraram-se dentro dos padrões de referência/normalidade, exceto para neutrófilos e linfócitos para o pré-tratamento dose única em todos os tempos. Assim, sugere-se que o extrato possui atividade antimutagênica, agindo possivelmente e preferencialmente por desmutagênese, sendo que os micronúcleos são retirados de corrente sanguínea por um aumento da atividade fagocítica, caracterizando assim a imunomodulação, esses resultados sugerem que o composto possui atividade quimioprotetora.

1. Introdução

Atualmente um grande número de compostos químicos e físicos que causam riscos para a saúde humana é descartados no meio ambiente. Estas substâncias podem provocar mutações que são eventos espontâneos, podem afetar processos vitais como a duplicação, a expressão gênica e ainda causar alterações cromossômicas, levando a processos cancerosos. Assim, por causarem dano no DNA, essas substâncias são conhecidas como mutagênicas e/ou genotóxicas (COSTA; MENK, 2000; OLIVEIRA et al., 2009).

A avaliação mutagênica de extratos é de grande importância, sendo estas fontes de diversos compostos (MENDANHA et al., 2010). Atualmente, existe um grande interesse das indústrias farmacêuticas na utilização da biodiversidade como fonte de novos fármacos (CALIXTO, 2001), pois sabe-se que as plantas podem conter inúmeros compostos biologicamente ativos com propriedades farmacológicas (VILAR et al., 2008), dentre elas taninos, que possuem atividade antimicrobiana (AKIYAMA et al., 2001), antiviral (ZHANG et al., 1995), anti-inflamatória e antioxidante (PARK et al., 2014) e antimutagênica (DAUER et al., 2003); os flavonoides, os quais possuem propriedades antioxidantes (SAEED et al., 2012) e triterpenóides, que exibem atividade antiinflamatória, antitumoral, antioxidante e citotóxica (DALLA VECHIA et al., 2009).

Nesse contexto, a *Byrsonima verbascifolia* (L.) Rich. ex A. L. (Juss), conhecida popularmente por murici, é uma espécie arbórea pertencente a família Malpighiaceae, encontrada predominantemente no Cerrado brasileiro (GUSMÃO et al., 2006; MENDANHA et al., 2010). Popularmente, a infusão das folhas de murici é utilizada no tratamento de diarreia, infecções intestinais e reconhecida como protetora da mucosa intestinal. Ainda é utilizada para tratamento da doença de Chagas, inflamações na cavidade oral e de garganta e contra infecções no trato genital feminino, em aplicações locais. A casca desta planta tem propriedades antipirética, laxante e adstringente (PANIZZA, 1998; MENDANHA et al., 2010).

Segundo a literatura, análises químicas mostraram que esta planta apresenta uma variedade de metabólitos secundários entre eles, triterpenóides, taninos, flavonóides, ésteres aromáticos e amentoflavona (ALMEIDA et al.,

1998; SANNOMIYA et al., 2004; MENDANHA et al., 2010). O extrato desta planta demonstrou ter atividade antiviral contra rotavírus (CECÍLIO et al., 2012), herpes (LOPEZ et al., 2001); atividade antifúngica (NARUZAWA; PAPA, 2011) e atividade ainda antigenotóxica (MENDANHA et al., 2010).

Diante dos compostos biologicamente ativos já encontrados, assim como o uso popular da planta, surge o interesse de se realizar novos estudos. Sendo assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antimutagênica e imunomodulatória *in vivo* do extrato metanólico de *Byrsonima verbascifolia*.

2. Material e Métodos

2.1. Agentes Químicos

Como controle positivo foi utilizado a Ciclofosfamida (Fosfaseron®), adquirida junto aos Laboratórios Itaca (REG. M.S. No. 1.2603.0056.002-1; Batch 063020, Brasil), agente alquilante de ação indireta, para a indução de danos no DNA. O agente indutor de danos foi preparado em solução fisiológica, pH 7,4, e administrado em concentração final de 75mg/Kg de peso corpóreo (p.c), por via intraperitoneal (i.p.).

O extrato metanólico de *Byrsonima verbascifolia* foi primeiramente diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente em solução fisiológica (concentração final: solução fisiológica a 1% de DMSO) e administrado em concentração final de 50mg/Kg de peso corpóreo (p.c), por intubação intragástrica (v.o.).

2.2. Coleta botânica, preparação dos Extratos

As folhas foram coletas em 26/03/2011 no município de Ijaci-MG e herborizadas. As exsiccatas foram identificadas pela Dra. Andréia Fonseca Silva, curadora do Herbário PAMG, pertencente à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em Belo Horizonte, MG. Após depósito no herbário, os fragmentos receberam o registro PAMG 56309. Aproximadamente 2,0 kg das folhas de *Byrsonima verbascifolia* foram coletadas, acondicionados em sacos plásticos e colocados em geladeira até o processamento. O material foi seco durante 24 horas em estufa a 40 °C. Após

a secagem, o material foi triturado em moinho de facas para obtenção do pó seco. O material vegetal foi extraído por percolação exaustiva com metanol durante cinco dias utilizando cerca de 290 g do pó seco. O percolado foi concentrado em evaporador rotatório a 50°C, sob pressão reduzida. O extrato foi mantido em dessecador, sob vácuo, para a eliminação total do metanol, obtendo-se o extrato metanólico na forma de pó (80,0 g).

2.3. Avaliação e caracterização dos metabólitos presentes no extrato metanólico das folhas de *Byrsonima verbascifolia* por CLAE-EM.

A identificação dos metabólitos detectados foi realizada com base em seus espectros ultra-violeta (UV), peso molecular exata e MSN padrão de fragmentação. Anotação de fórmula elementar foi baseada na comparação com diferentes bases de dados de metabólitos como o Dicionário de Produtos Naturais (<http://dnp.chemnetbase.com>), (<http://kanaya.naist.jp/KNAPsAcK>), SciFinder® (<https://scifinder.cas.org>), e em bases de dados internos de metabólito; identificações foram verificadas por co-injeção com padrões (se disponível) de compostos que foram previamente descritos para o gênero *Byrsonima*.

2.4. Animais e Delineamento Experimental

Foram utilizados 80 camundongos da variedade Swiss (*Mus musculus*), machos e em idade reprodutiva provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CCBS/UFMS) subdivididos em 8 grupos experimentais (n = 10 animais). O experimento foi conduzido no biotério do Laboratório de Bioensaios do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde e as análises foram realizadas no Laboratório BioCapri do mesmo centro. Os animais foram mantidos em caixas de propileno recobertas por sepilho e alimentados com ração comercial (Nuvital®) e água filtrada *ad libitum*. A temperatura e luminosidade foram controladas utilizando-se fotoperíodo de doze horas (12 horas de luminosidade: 12 horas de escuro), com temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade de $55\% \pm 10$ em estante ventilada (AESLO®). O experimento foi conduzido segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2004), observando

as diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais e com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS (Protocolo No. 311).

Os grupos experimentais estabelecidos foram: **Grupo Controle Negativo:** os animais receberam duas aplicações, uma de solução fisiológica (veículo da ciclofosfamida, i.p.) e outra de solução fisiológica a 1% de DMSO (veículo do extrato, v.o.), ambas no volume de 0,1mL/10g p.c..

Grupo Controle Positivo - Ciclofosfamida: os animais receberam duas aplicações, uma de ciclofosfamida (75mg/Kg p.c., i.p.) e outra de solução fisiológica a 1% de DMSO (veículo do extrato, v.o.) no volume de 0,1mL/10g p.c..

Grupo *Byrsonima verbascifolia*- Extrato: os animais receberam duas aplicações, uma de solução fisiológica (veículo da ciclofosfamida, 0,1mL/10g p.c., i.p.) e outra do extrato metanólico de *Byrsonima verbascifolia* (50mg/Kg p.c., v.o.).

Grupo Pré-tratamento – Dose Única: os animais receberam duas aplicações, uma do extrato metanólico de *Byrsonima verbascifolia* (50mg/Kg p.c., v.o.), em dose única, e 24 horas após uma aplicação de ciclofosfamida (75mg/Kg p.c., i.p.).

Grupo Pré-tratamento – Doses Múltiplas: os animais receberam durante 15 dias consecutivos aplicações do extrato metanólico de *Byrsonima verbascifolia* (50mg/Kg p.c., v.o.) e 24 horas após a última aplicação receberam uma aplicação de ciclofosfamida (75mg/Kg p.c., i.p.).

Grupo Tratamento Simultâneo: os animais receberam simultaneamente uma aplicação do extrato metanólico de *Byrsonima verbascifolia* (50mg/Kg p.c., v.o.) e uma aplicação de ciclofosfamida (75mg/Kg p.c., i.p.).

Grupo Pós-tratamento: os animais receberam uma aplicação de ciclofosfamida (75mg/Kg p.c., i.p.) e 24 horas após uma do extrato metanólico de *Byrsonima verbascifolia* (50mg/Kg p.c., v.o.).

Grupo Tratamento Contínuo: os animais receberam durante 15 dias consecutivos aplicações do extrato metanólico de *Byrsonima verbascifolia* (50mg/Kg p.c., v.o.), 24 horas após a última aplicação receberam uma aplicação de ciclofosfamida (75mg/Kg p.c., i.p.) simultaneamente a outra

aplicação do extrato e 24 horas após essa aplicação simultânea uma nova administração do extrato foi realizada.

Vinte e quatro, 48 e 72 horas após a aplicação da ciclofosfamida foram coletadas amostras de sangue periférico (cerca de 20µL/técnica) para a realização do ensaio do micronúcleo em sangue periférico e da contagem diferencial de células do sangue. Após 72 horas da aplicação da ciclofosfamida os animais foram submetidos à eutanásia para coleta de órgãos para o ensaio de fagocitose esplênica (baço).

2.5. Ensaio Biológicos

2.5.1. Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico

O teste do micronúcleo é de grande importância para identificação de agentes clastogênicos e aneugênicos. O método descrito por Hayashi *et al.* (1990) e modificado por Oliveira *et al.* (2009) foi empregado neste experimento.

Previamente preparada, a lâmina foi coberta por uma camada contendo 20µL de Alaranjado de Acridina (1,0 mg/mL). Finalizado este processo, 20µL de sangue periférico foi depositado sobre a lâmina, sendo a mesma recoberta por uma lamínula. A lâmina permaneceu em *freezer* (-20° C) por um período mínimo de sete dias. A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência (Bioval®), no aumento de 40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. Foram analisadas 2.000 células/animal e a análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA/Tukey ($p < 0,05$).

2.5.2. Ensaio de Fagocitose Esplênica

O baço foi macerado em solução fisiológica para a obtenção de uma suspensão homogênea de células por sucessivas aspirações com pipeta de *Pasteur*. Cem microlitros da suspensão celular foram colocadas em uma lâmina previamente corada com Alaranjado de Acridina (1,0 mg/mL) e recoberta por uma lamínula. As lâminas foram estocadas em um *freezer* até o momento da análise. A análise foi feita em microscópio de fluorescência (Bioval®, Modelo L 2000A) em um aumento de 400 vezes com filtro de 420-490nm e filtro de barreira de 520nm. Serão analisadas 200 células por animal. A ausência ou presença de fagocitose foi baseada na descrição de Hayashi *et al.* (1990). A estatística foi realizada por meio do teste ANOVA/Tukey ($p < 0,05$).

2.5.3. Contagem diferencial de Células do Sangue

Vinte microlitros sangue periférico foram utilizados para fazer um esfregaço em lâmina histológica. Essas foram secas ao ar livre e coradas com Giemsa (10%) por 10 minutos. A leitura das lâminas foi feita por microscopia de campo claro em aumento de 1.000 vezes. Foram analisadas um total de 100 células/animal e diferenciadas em linfócitos, neutrófilos, monócitos, eusínófilos e basófilos. A estatística foi realizada por meio do teste ANOVA/Tukey ($p < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Ensaios Fitoquímicos

A técnica CLAE-EM é uma ferramenta eficiente e de grande sensibilidade, permitindo interpretação sobre a composição química das substâncias presentes nos extratos de espécies vegetais (SAWAYA et al., 2004). A partir do cromatograma (figura abaixo), comparando com padrões (injetados nas mesmas condições) e banco de dados, os picos principais demonstraram a presença de ácidos fenólicos, proantocianidinas, flavonoides e terpenoides.

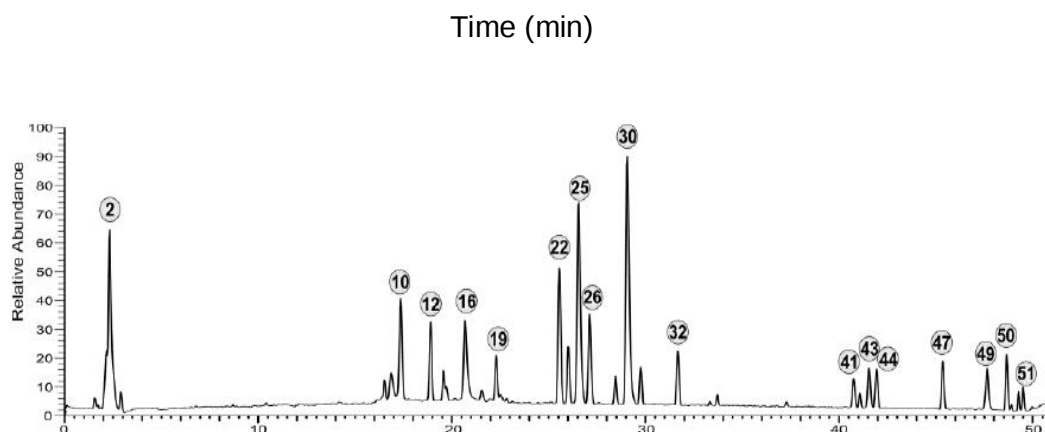


Figura 1: Cromatograma em CLAE-EM para o extrato metanólico das folhas de *Byrsonima verbascifolia*

Tabela 1 - Compostos determinados por tempo de retenção, íon molecular e EM/EM presentes no extrato metanólico das folhas de *Byrsonima verbascifolia*

Pico	Tempo retenção	Nome	Fórmula molecular	m/z [M-H] ⁻	m/z [M+H] ⁺	EM/EM (negativo)	EM/EM (positivo)
		Ácidos fenólicos					
2	2,3	Ácido quínico	C ₇ H ₁₂ O ₆	191	-	173; 127; 111; 93; 85	-
3	5,05	Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	169	-	125	-
		Proantocia- nidinas					
5;7; 10; 24	15,73; 16,75; 17,4; 26,5	Dímero proantocianidi -na	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577	579	559; 451; 425; 407; 289; EM ³ - 289; 425; 407	427; 409; 291; 247
6;8; 9;20	16,68; 16,9; 17,3; 22, 87	Trímero proantocianidi -na	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	865	867	739; 695; 577; 287	579; 577
14; 21	19,75; 23,46	Dímero proantocianidi -na-galato	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	729	731	577; 559; 455; 407; 287 EM ³ - 451; 425; 289	699; 579; 411

Flavonoides							
12	18,95	[epi]catequina	$C_{15}H_{14}O_6$	289	291	245; 231; 205; 179; 151	-
22; 23	25,57; 26,03	Querc.-3-O- rutinosideo	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609	611	301; 271 EM ³ - 255; 178; 151	465; 303 EM ³ - 447; 285; 257; 247; 229; 165
25; 26	26,56; 27,00	Querc.-3-O- galact./glicosi.	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463	465	301; EM ³ - 271; 255; 178; 151	303; EM ³ - 285; 257; 247; 229; 165
27; 28	27,61; 28,11	Querc.-O- hexose- galoil	$C_{28}H_{24}O_{16}$	615	617	301; EM ³ - 271; 255; 178; 151	-
29; 30; 31	28,48; 29,1; 29,8	Querc.-O- arabinosideo/ pentosideo	$C_{20}H_{18}O_{13}$	433	435	301; EM ³ - 271; 255; 178; 151	303
33	31,70	Querc.-O- galoil-O- pentosideo	$C_{27}H_{22}O_{15}$	585	587	301; EM ³ - 271; 255; 178; 151	-
51	49,49	Amentoflavo- na	$C_{30}H_{18}O_{10}$	537	539	443; 417; 399; 375	-
Terpenoides							
34- 40	33,74 - 39,71	Saponina desconhecida	$C_{37}H_{60}O_{13}$	711	-	665; 503; EM ³ - 453; 385; 353	-
42; 46;	41,07; 44,60;	Saponina desconhecida	$C_{36}H_{56}O_{12}$	679	-	633; 471	-

3.2. Estudos Biológicos

A Tabela 2 apresenta os valores médios dos pesos inicial e final dos animais dos diferentes grupos experimentais. A análise estatística indicou que houve diferenças significativas nos pesos iniciais dos animais para o pós-tratamento quando comparado ao controle negativo. Para os parâmetros dos pesos finais houve diferenças significativas para pré-tratamento em dose única,

tratamento simultâneo e tratamento contínuo. Para os parâmetros ganhos de peso, houve diferenças significativas para o tratamento simultâneo.

O ganho de peso, pesos relativos e absolutos do coração, bexiga, pulmão, fígado e rins são apresentados na tabela 3. Em relação ao peso dos órgãos houve diferenças significativas para os parâmetros do fígado e rins para todos os grupos e para o pós-tratamento houve diferenças significativas para o pulmão. Para os pesos absolutos, houve diferença significativa para o grupo pós-tratamento em relação ao coração.

Em relação ao ensaio do micronúcleo a análise estatística indicou que o extrato metanólico de *Byrsonima verbascifolia* não apresentou atividade mutagênica. Na avaliação de 24 horas a frequência média de micronúcleos foi de $7,2 \pm 3,00$ (Controle Negativo = $2,80 \pm 1,03$), e em 48 e 72 horas as frequências foram de $3,2 \pm 1,40$ e $2,90 \pm 1,37$ (Controle Negativo: 48h – $5,90 \pm 2,02$; 72h – $3,20 \pm 1,48$), respectivamente (Tabela 4).

A avaliação da antimutagenicidade, em 24 horas, indicou atividade quimiopreventiva para os protocolos de pré-tratamento, em administração de dose única e doses múltiplas (15 dias de tratamento consecutivos) e as porcentagens de redução de danos apresentadas foram da ordem de 63% e 48%. Esses dados demonstraram que não houve uma correlação direta entre o número de doses administradas e o aumento a atividade quimiopreventiva.

Na avaliação de 48 horas todos os tratamentos apresentaram atividade antimutagênica significativa e as porcentagens de redução de danos foram da ordem de 92%, 95%, 56%, 31% e 32% para os protocolos de pré-tratamento em dose única, pré-tratamento em doses múltiplas, tratamento simultâneo, pós-tratamento e tratamento contínuo (Tabela 4).

Na avaliação de 72 horas não houve indicação de atividade quimiopreventiva. Nesse mesmo período verificou-se que a atividade mutagênica da ciclofosfamida não foi significativa (Controle Negativo = $3,20 \pm 1,48$; Controle Positivo = $4,56 \pm 1,67$) (Tabela 4).

A análise da fagocitose esplênica indicou que a ciclofosfamida, o extrato metanólico de *B. verbascifolia*, pré-tratamento dose única e pré-tratamento doses múltiplas induziram aumento estatisticamente significativo da fagocitose esplênica. O incremento da fagocitose foi de 88,83%, 87%, 83,05% e 82,20% para os tratamentos com ciclofosfamida, extrato metanólico de *B. verbascifolia*,

pré-tratamento dose única e pré-tratamento doses múltiplas respectivamente. Esses dados demonstraram que não houve uma correlação direta entre o número de doses administradas e o aumento a atividade esplênica assim como foi indicado para a atividade quimiopreventiva (Tabela 5).

Na Tabela 6 estão apresentados os valores médios $\pm$ desvio padrão da contagem diferencial de células do sangue. Para o tempo de 24 h, houve diferenças significativas para linfócitos e neutrófilos quando comparado aos controles e basófilos no tratamento contínuo. No tempo de 48 h, em relação aos linfócitos e neutrófilos, houve diferenças significativas para os grupos pré – tratamento dose única e tratamento contínuo. Pode-se observar que no tempo de 72 h, houve diferenças significativas para os pré-tratamentos, simultâneo e pós-tratamento. No entanto, apesar das diferenças apontadas pela análise estatística todos os parâmetros encontram-se dentro dos valores de referência, exceto para neutrófilos em 24 horas e linfócitos e neutrófilos em 48 horas para o pré-tratamento em dose única.

4. Discussão

Atualmente, vem aumentando o número de investigações científicas a respeito dos efeitos biológicos das plantas medicinais, destacando o papel de quimioprevenção do câncer. Geralmente, estas possuem inúmeras classes de compostos químicos com propriedades antioxidantes, anticarcinogênicas, antimutagênicas e imunomodulatórias caracterizando o potencial farmacológico destas no tratamento de diversas doenças, tais como doenças neurodegenerativas, infecções e câncer (LOPES, 2004).

Estudos fitoquímicos realizados com extrato hexânico de *B. verbascifolia* mostram a presença de sitosterol, β -amirina, ácido 3-O-acetiloleanólico, friedelina, β -amirenona, 3-O-acetillupeol e glocidona (GOTTLIEB et al., 1975). Extratos hidrometanólico mostraram a presença de catequinas e quercetinas (GONÇALVES et al., 2013a). Estudos a respeito da atividade biológica dessa planta, mostra que a mesma possui atividade antiviral e antibacteriana (LOPEZ et al., 2001; CECÍLIO et al., 2012), antifúngica (NARUZAWA e PAPA, 2011), atividade antioxidante (MORAIS et al., 2013).

No presente trabalho, o estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas de *Byrsonima verbascifolia* utilizando CLAE-EM, permitiu a determinação do ácido gálico e ácido quínico, derivados proantocianidina, [epi]catequina, derivados quercetínicos mono e di-glicosilados e saponinas (Tabela 1), sendo estes semelhantes aos compostos já encontrados em outras espécies do gênero *Byrsonima*.

Estudos tem demonstrado que as catequinas possuem atividade quimioprotetora, atuando na conversão dos compostos gerados pelos radicais livres em compostos inativos, prevenindo enfermidades como perda de memória, câncer e doenças cardíaca e a quercetina induz a apoptose de células tumorais e pode ser considerado um agente preventivo (SCHMITZ et al., 2005; BEHLING et al., 2004).

Tendo em vista as diversas atividades biológicas dos compostos desta planta, o presente estudo avaliou atividade (anti)mutagênica e imunomodulatória do extrato metanólico *Byrsonina verbascifolia* por meio do teste do micronúcleo, da contagens diferenciais de células no sangue periférico e da atividade fagocitária esplênica.

De acordo com os resultados encontrados, a administração do extrato metanólico de *B. verbascifolia* não apresentou atividade mutagênica, corroborando com estudos realizados com extrato metanólico de *B. crassa* (CARDOSO et al., 2006), extrato etanólico e clorofórmico de *B. basiloba* (LIRA, 2008).

Para elucidar os possíveis mecanismos de ação dos produtos naturais em antimutagênese diferentes protocolos de tratamento podem ser utilizados (MAURO et al., 2014). Portanto, neste estudo, camundongos machos tratados com extrato metanólico de *Byrsonina verbascifolia* e ciclofosfamida, pré-tratamento ou tratamento simultâneo indicam ações desmutagênicas, o pós-tratamento sugere mecanismo de bioantimutagênico e o tratamento contínuo está relacionado as ações desmutagênicas e bioantimutagênico (ANTUNES; ARAÚJO, 2000; SILVA et al., 2005).

O grupo pré-tratamento nos protocolos dose única e doses múltiplas, em 24 horas, mostraram uma percentagem de redução de danos de 63%, 48%, demonstrando que o extrato metanólico atua de forma quimiopreventiva, já o tratamento contínuo não foi capaz de prevenir os danos. Os grupos simultâneo

e pós-tratamento apresentaram redução de danos de 47% e 0,01%. Estes dados sugerem que o extrato metanólico possui ação tanto desmutagênica como bioantimutagênico. Sendo que a atividade desmutagênica foi mais eficaz tal como sugerido pela redução de danos nos protocolos do grupo pré-tratamento no ensaio do micronúcleo. Vale ressaltar que o tratamento contínuo e o pós-tratamento não são uma boa prática terapêutica, uma vez que não apresentam boas reduções de danos.

Segundo Mendanha et al. (2010), a *B. verbascifolia* possui atividade antimutagênica frente aos danos causados pela doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Estudos realizados com *B. basiloba* e *B. crassa* no tratamento simultâneo com as seguintes doses: 100, 75 e 50 mg/ml para a primeira e 166, 124,5 e 83 mg/ml para a segunda, demonstrou redução de danos de 7,42%, 40% e 40,75%; e 43,73%, 49,66% e 42,97% respectivamente (LIRA, 2007).

O grupo pré-tratamento nos protocolos dose única e doses múltiplas e contínuo, em 48 horas, mostraram uma percentagem de redução de danos de 92%, 95% e 32%, demonstrando que o extrato atua de forma quimiopreventiva. Os grupos simultâneo e pós-tratamento apresentaram redução de danos de 56% e 31%. Estes dados sugerem que o extrato possui ação tanto desmutagênica como bioantimutagênico. Sendo que a atividade desmutagênica foi mais eficaz tal como sugerido pela redução de danos nos protocolos do grupo pré-tratamento no ensaio do micronúcleo. O aparecimento de uma maior frequência de micronúcleos em 48 horas é resultado da agressão ocorrida nas 24 horas anteriores.

Quando foram relacionados os dados do teste do micronúcleo com os resultados da fagocitose esplênica, pode-se notar que a taxa de fagocitose se encontrou significativamente maior que no controle, exceto para o pós-tratamento e o simultâneo. Esse fato sugere que a administração do extrato proporciona um aumento da atividade fagocítica o que indica imunomodulação, características essas que permitem inferir a atividade quimioprotetora para o composto. Vale ressaltar que quando foram comparados os dados de micronúcleo e fagocitose esplênica do tratamento contínuo pode-se observar que o mesmo não previne a formação de micronúcleos mas aumenta a fagocitose.

Esses dados corroboram com os achados na contagem de células diferenciais, uma vez que foram encontradas alterações no número de monócitos circulantes, sugerindo assim que os monócitos possivelmente poderiam já ter migrado para o baço, explicando assim o aumento da atividade fagocítica. Os monócitos correspondem a aproximadamente de 1-6% das células brancas do sangue, elas tem a capacidade de migrar dos vasos sanguíneos e se instalarem nos tecido onde se diferenciam em macrófagos (KELLEY et al., 1988; LEWIS et al, 1999). Eles tem a função de remover corpos estranhos, parasitas e bactérias, promover ou inibir a inflamação, atuar no reparo e renovação dos tecidos, ação microbicida e tumoricida (KLIMP et al., 2002). Sendo assim, presume-se que a redução da frequência de micronúcleos em reticulócitos do sangue periférico pode estar relacionada com a melhoria da atividade fagocítica das células do baço (ALVES de LIMA, 2001), principalmente no grupo contínuo.

Existem poucos estudos relacionados à atividade imunomodulatória dos extratos de *Byrsonima* sp. Estudos realizados com extratos de *B. crassa* e *B. intermédia* não demonstraram atividade imunoestimulante (CARDOSO, 2006).

As plantas são uma grande fonte de substâncias com ação na modulação do sistema imunológico (BASSO et al., 2005). Atividades imunorregulatórias, imunossupressoras e imunoestimuladoras vem sendo pesquisadas em um grande número de plantas e suas biomoléculas (PATWARDHAN; MANISH, 2005). A imunomodulação pode ser exercida através da supressão ou potencialização dos elementos do sistema imuno (KIRKLEY, 1999). Devido a isso, vários estudos têm sido realizados com o intuito de encontrar substâncias capazes de auxiliar as defesas do nosso organismo no combate de microrganismos patogênicos, doenças auto-imune ou mesmo o câncer (LABRO, 2000).

Os resultados demonstram que o extrato metanólico de *B. verbascifolia* possui efeito imunomodulatório por melhorar a atividade fagocítica do baço e atua por desmutagênese e biomutagênese, ressaltando que o melhor desempenho foi por desmutagênese.

5. Referências

Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T., Iwatsuki, K. (2001) Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **48**, 487-491.

Almeida, S. P. (1998) Cerrado: Espécies Vegetais Úteis. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, Ministério da Agricultura e do Abastecimento*. 1st edn. EMBRAPA-CPAC, Planaltina.

Alves de Lima, P. L. (2001) Avaliação da modulação da genotoxicidade pelo cogumelo *Lentinula edodes* (shitake). Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina (FMB). Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Antunes, L. M. G. e Araujo, M. C. P. (2000) Mutagenicity and antimutagenicity of the main food colorings. *Revista de Nutrição*, **13**, 81-88.

Basso, L. A., da Silva, L. H., Fett-Neto, A. G., de Azevedo, W. F. Jr., Moreira Ide, S., Palma, M. S., Calixto, J. B., Astolfi Filho, S., dos Santos, R. R., Soares, M. B., Santos, D. S. (2005) The use of biodiversity as source of new chemical entities against denifed molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis and T-cell mediated diseases. A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**, 575-606.

Behling, E. B., Sendão, M. C., Francescato, H. D. C., Antunes, L. M. G., Bianchi, M. L. P. (2004) Flavonoide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, **15**, 285-292.

Calixto, J. B. (2001) Plantas medicinais sob a ótica da química moderna. 1.ed. Chapecó: Argos – Editora Universitárias.

Cardoso, C. R., de Syllos Cólus, I. M., Bernardi, C. C., Sannomiya, M., Vilegas, W., Varanda, E. A. (2006) Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology*, **225**, 55-63.

Cecílio, A. B., Faria, D. B., Oliveira, P. C., Calda, S., Oliveira, D. A., Sobral, M. E. G., Duarte, M. G. R., Moreira, C. P. S., Silva, C. G., Almeida, V. L. (2012) Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *Journal of Ethnopharmacology*, **141**, 975-981.

Costa, R. M. A., Menk, C. F. M. (2000) Biomonitoramento de mutagênese ambiental. *Biotecnologia: ciência e desenvolvimento*, **3**, 24-26.

Dalla Vechia, L., Gnoatto, S. C. B., Gosmann, G. (2009) Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. *Química Nova*, **32**, 1245-1252.

Dauer, A., Hensel, A., Lhoste, E., Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V. (2003) Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (Hep G2) using single cell gel electrophoresis. *Phytochemistry*, **63**, 199-207.

Gonçalves, C. A., Siqueira, J. M., Carollo, C. A., Mauro, M. de O., de Davi N., Cunha-Laura, A. L., Monreal, A. C., Castro, A. H., Fernandes, L., Chagas, R. R., Auharek, S. A., Oliveira, R. J. (2013a) Gestational exposure to *Byrsonima verbascifolia*: teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **150**, 843-850.

Gottlieb, O. R., Mendes, H. P., Magalhães, M. T. (1975) Triterpenoids from *Byrsonima verbascifolia*. *Phytochemistry*, **14**, 1456.

Gusmão, E.; de Almeida Vieira, F., Meira da Fonseca Júnior, É. (2006) Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.) *CERNE*, **12**, 84-91.

Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T., Ishidate, M. Jr. (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*, **245**, 245-249.

Kelley, J. L., Rozek, M. M., Sueram, C.A., Schartz, C. J. (1998) Activation of human peripheral blood monocytes by lipoproteins. *The American Journal of Pathology*, **130**, 233–231.

Kirkley, S. A. (1999) Proposed mechanism of transfusion-induced immunomodulation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **6**, 652-657.

Klimp, A. H., De Vries, E. G., Scherphof, G. L., Daemen, T. (2002) A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **44**, 143-161.

Labro, R. (2000) Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immune-fairy tales”? *Clinical Microbiology Reviews*, **13**, 615-650.

Lewis, J. S., Lee, J. A., Underwood, J. C., Harris, A. L., Lewis, C. E. (1999) Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *Journal of Leukocyte Biology*, **66**, 889-900.

Lira, L. M., Dos Santos, F. V., Sannomiya, M., Rodrigues, C. M., Vilegas, W., Varanda, E. A. 2008. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. *Journal of Medicinal Food*, **11**, 111-119.

Lira, W. M. (2007) Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico de extratos e compostos vegetais obtidos a partir dos gêneros *Byrsonima* e *Davilla*. Tese (doutorado). Unesp. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara.

Lopes, F. C. M. (2004) Avaliação da atividade imunológica *in vitro* de *Alchornea* spp quanto à produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral- α por macrófagos murinos. Dissertação de Mestrado, FCF/Unesp, SP – Brasil.

Lopez, A., Hudson, J. B., Towers, G. H. (2001) Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **77**, 189-196.

Mauro, M. O., Pesarini, J. R., Marin-Morales, M. A., Monreal, M. T., Monreal, A. C., Mantovani, M. S., Oliveira, R. J. (2014) Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. *Genetics and Molecular Research*, **13**, 4808-4819.

Mendanha, D. M., Ferreira, H. D., Felício, L. P., Silva, E. M, Pereira, D. G., Nunes, W. B., Carvalho, S. (2010) Modulatory effect of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Biology*, **9**, 69-77.

Morais, M. L. E. A. (2013) Determination of antioxidant potential *in vitro* of brazilian Cerrado fruits: *Revista Brasileira de Fruticultura*, **35**, 355-360.

Naruzawa, E. S., Papa, M. F. S. (2011) Antifungal activity of extracts from Brazilian Cerrado plants on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Corynespora cassiicola*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **13**, 408-412.

Oliveira, R. J. (2009) Os compostos 6-dimetilaminopurina e ciclohexamida são genotóxicos, mutagênicos, alteram o desempenho reprodutivo e a expressão dos genes TP53, CASP9 e CCNA em sistemas testes de mamíferos. Tese de Doutorado. Unesp, Rio Claro- SP.

Panizza, S. (1998) Plantas que Curam: Cheiro de Mato. 3rd edn. IBRASA, São Paulo.

Park, M., Cho, H., Jung, H., Lee, H., Hwang, K. T. (2014) Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Tannin Fraction of the Extract from Black Raspberry Seeds Compared to Grape Seeds. *Journal of Food Biochemistry*, **38**, 259–270.

Patwardhan, B., Gautam, M. (2005) Botanical immunodrugs: scope and opportunities. *Drug Discovery Today*, **10**, 495-502.

Saeed, N., Khan, M. R., Shabbir, M. (2012) Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **12**, p. 1-12.

Sannomiya, M., Rodrigues, C. M., Coelho, R. G., dos Santos, L. C., Hiruma-Lima, C. A., Souza Brito, A. R., Vilegas, W. (2004) Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). *Journal of Chromatography A*, **1035**, 47-51.

Sawaya, A. C. H. F., Tomazela, D. M., Cunha, I. B. S., Bankova, V. S., Marcucci, M. C., Custódio, A. R., Eberlin, M. N. (2004) Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst*, **129**, 739-744.

Schmitz, W., Saito, A. Y., Estevão, D., Saridaki, H. O. (2005) Green tea as a chemoprotector. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, **26**, 119-130.

Silva, A. F. da, Oliveira, R. J., Matuo, R., Ribeiro, L. R., Mantovani, M. S. (2005) Effects of *Agaricus blazei* on clastogenicity induced by ultraviolet radiation in culture of CHO-K1 cells. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, **26**, 131-140.

Vilar, J. B., Ferreira, F. L., Ferri, P. H., Guillo, L. A., Chen Chen, L. (2008) Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. *Brazilian Journal of Biology*, **68**, 141-147.

Zhang, J., Zhan, B., Yao, X., Gao, Y., Shong J. (1995) Antiviral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. against genital Herpes virus *in vitro*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, **20**, 556-558.

Tabela 2 – Parâmetros relativos ao desenvolvimento ponderal dos camundongos tratados com *Byrsonima verbascifolia* e controles:

Grupos Experimentais	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle Negativo	42,68±5,04 ^a	42,83±4,97 ^a
Controle Positivo	40,21±2,51 ^a	39,81±2,24 ^{a,b}
Extrato metanólico	38,75±3,23 ^{a,b}	38,32±3,10 ^{a,b}
Pré-tratamento – Dose Única	38,41±5,02 ^a	37,03±4,28 ^b
Pré-tratamento – Doses ms	41,90±3,58 ^a	40,56±3,37 ^a
Tratamento Simultâneo	34,63±4,15 ^b	35,89±4,85 ^b
Pós-tratamento	40,37±3,43 ^a	38,48±3,54 ^a
Tratamento Contínuo	38,01±2,02 ^a	36,20±2,41 ^b

Legenda: Controle Negativo – Veículo *Byrsonima verbascifolia* (solução DMSO 1%)+ Solução Fisiológica; Controle Positivo – Veículo *Byrsonima verbascifolia* (Solução Fisiológica) + Ciclofosfamida (75mg/kg p.c., i.p.). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$; ANOVA/Tukey).

Tabela 3 – Parâmetros relativos ao desenvolvimento ponderal, peso de órgãos e peso relativo dos órgãos dos camundongos tratados com *Byrsonima verbascifolia* e controles:

Parâmetros	Grupos Experimentais							
	Controle Negativo	Controle Positivo	<i>B. verbascifolia</i>					
			Extrato	Pré-tratamento		Tratamento Simultâneo	Pós-tratamento	Tratamento Contínuo
				Dose Única	Doses Múltiplas			
Desenvolvimento Ponderal								
Ganho de Peso	0,15 ± 1,93 ^{b,c}	- 0,40 ± 0,78 ^{b,a,c}	- 0,43 ± 1,50 ^{b,a}	- 1,37 ± 1,88 ^{b,a}	- 1,33 ± 1,11 ^{b,a}	1,26 ± 1,44 ^c	- 1,90 ± 0,83 ^a	- 1,81 ± 0,87 ^a
Peso dos Órgãos								
Coração	0,20 ± 0,04 ^{a,b}	0,19 ± 0,02 ^{a,b}	0,20 ± 0,04 ^a	0,23 ± 0,02 ^a	0,20 ± 0,03 ^{a,b}	0,19 ± 0,03 ^{a,b}	0,17 ± 0,13 ^b	0,18 ± 0,01 ^b
Pulmão	0,23 ± 0,04 ^c	0,21 ± 0,04 ^{b,c}	0,23 ± 0,04 ^{b,c}	0,19 ± 0,02 ^{a,b}	0,25 ± 0,02 ^c	0,22 ± 0,01 ^{b,c}	0,17 ± 0,01 ^a	0,19 ± 0,02 ^{a,b}
Fígado	0,03 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	1,58 ± 0,19 ^b	1,61 ± 0,22 ^b	1,50 ± 0,14 ^b	1,45 ± 0,24 ^b	1,49 ± 0,15 ^b	1,46 ± 0,19 ^b
Bexiga	0,03 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,02 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,01 ^a
Rins	0,03 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	0,45 ± 0,03 ^b	0,46 ± 0,05 ^b	0,49 ± 0,04 ^b	0,45 ± 0,04 ^b	0,45 ± 0,05 ^b	0,43 ± 0,06 ^b
Peso Relativo dos Órgãos								
Coração	0,0046 ± 0,0007 ^a	0,0048 ± 0,0004 ^{a,b}	0,0049 ± 0,0007 ^{a,b}	0,0057 ± 0,0010 ^b	0,0049 ± 0,0004 ^{a,b,c}	0,0050 ± 0,0011 ^{a,c}	0,0043 ± 0,0003 ^c	0,0048 ± 0,0004 ^{a,b}
Pulmão	0,0055 ± 0,0009 ^{a,b}	0,0053 ± 0,0010 ^{a,b}	0,0061 ± 0,0012 ^a	0,0052 ± 0,0008 ^{a,b}	0,0063 ± 0,0007 ^a	0,0063 ± 0,0006 ^a	0,0046 ± 0,0006 ^b	0,0053 ± 0,0006 ^{a,b}
Fígado	0,0336 ± 0,0038 ^a	0,0400 ± 0,0032 ^{a,b}	0,0394 ± 0,0051 ^{a,b}	0,0456 ± 0,0083 ^b	0,0320 ± 0,0083 ^a	0,0366 ± 0,0030 ^a	0,0400 ± 0,0075 ^{a,b}	0,0345 ± 0,0080 ^a
Bexiga	0,0007 ± 0,0002 ^a	0,0012 ± 0,0002 ^b	0,0011 ± 0,0004 ^{a,b}	0,0012 ± 0,0005 ^b	0,0012 ± 0,0004 ^{a,b}	0,0008 ± 0,0002 ^{a,b}	0,0008 ± 0,0001 ^{a,b}	0,0010 ± 0,0002 ^{a,b}
Rins	0,0111 ± 0,0014 ^a	0,0112 ± 0,0015 ^a	0,0113 ± 0,0015 ^a	0,0128 ± 0,0014 ^a	0,0114 ± 0,0014 ^a	0,0010 ± 0,0014 ^a	0,0118 ± 0,0006 ^a	0,0112 ± 0,0013 ^a

Legenda: Controle Negativo – Veículo *B. verbascifolia* (solução DMSO 1%)+ Solução Fisiológica; Controle Positivo – Veículo *B. verbascifolia* (Solução Fisiológica) + Ciclofosfamida (100mg/kg p.c., i.p.). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05; ANOVA/Tukey).

Tabela 4 – Valores médios $\pm$ desvio padrão da média referentes ao ensaio de micronúcleo em sangue periférico de camundongos tratados com *Byrsonima verbascifolia* e controles:

Grupos Experimentais	Tempo de Coleta					
	24 horas		48 horas		72 horas	
	Média $\pm$ DP	%RD	Média $\pm$ DP	%RD	Média $\pm$ DP	%RD
Mutagenicidade						
Controle Negativo	2,80 $\pm$ 1,03 ^a	-	5,90 $\pm$ 2,02 ^{a,b}	-	3,20 $\pm$ 1,48 ^{a,b}	-
Controle Positivo	21,50 $\pm$ 2,99 ^d	-	32,70 $\pm$ 3,33 ^e	-	4,56 $\pm$ 1,67 ^b	-
Extrato metanólico	7,2 $\pm$ 3,00 ^b	-	3,2 $\pm$ 1,40 ^a	-	2,90 $\pm$ 1,37 ^{a,b}	-
Antimutagenicidade						
Pré-tratamento – Dose Única	9,7 $\pm$ 1,89 ^{a,b}	63%	8,00 $\pm$ 1,45 ^b	92%	3,3 $\pm$ 1,16 ^{a,b}	-
Pré-tratamento – Doses Múltiplas	12,5 $\pm$ 4,20 ^c	48%	7,2 $\pm$ 1,81 ^b	95%	2,2 $\pm$ 1,00 ^a	-
Tratamento Simultâneo	12,6 $\pm$ 2,06 ^c	47%	17,5 $\pm$ 2,17 ^c	56%	3 $\pm$ 0,81 ^{a,b}	-
Pós-tratamento	21,8 $\pm$ 2,35 ^d	0,01%	24,2 $\pm$ 2,70 ^d	31%	5,6 $\pm$ 1,17 ^c	-
Tratamento Contínuo	26,6 $\pm$ 3,23 ^e	-0,26%	7,87 $\pm$ 1,81 ^b	32%	4 $\pm$ 1,15 ^{a,b,c}	-

Legenda: Controle Negativo – Veículo *Byrsonima verbascifolia* (solução DMSO 1%)+ Solução Fisiológica; Controle Positivo – Veículo *Byrsonima verbascifolia* (Solução Fisiológica) + Ciclofosfamida (75mg/kg p.c., i.p.). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$; ANOVA/Tukey).

Tabela 5 – Número total de células analisadas, valores médios $\pm$ desvio padrão da média e porcentagem de células com e sem evidência de fagócitos esplênica em camundongos tratados com *B. verbascifolia* e controles:

Grupos Experimentais	Total de células sem evidência de fagocitose			Total de células com evidência de fagocitose		
	No. Absoluto	Média $\pm$ DP	Porcentagem	No. Absoluto	Média $\pm$ DP	Porcentagem
Controle Negativo	615	68,33 $\pm$ 16,10 ^a	34,16%	1185	131,67 $\pm$ 16,10 ^a	65,84%
Controle Positivo	201	22,33 $\pm$ 3,42 ^b	11,16%	1601	177,89 $\pm$ 3,65 ^b	88,83%
Extrato metanólico de <i>A. Nutans</i>	260	28,88 $\pm$ 5,23 ^{b, c}	13%	1740	171,11 $\pm$ 5,23 ^{b, d}	87%
Pré-tratamento – Dose Única	339	33,90 $\pm$ 6,40 ^c	16,95%	1661	166,10 $\pm$ 6,40 ^{d, e}	83,05%
Pré-tratamento – Doses Múltiplas	356	35,6 $\pm$ 7,60 ^c	17,80%	1644	164,40 $\pm$ 7,60 ^{d, f}	82,20%
Tratamento Simultâneo	556	61,77 $\pm$ 5,26 ^a	27,80%	1444	138,22 $\pm$ 5,26 ^a	72,20%
Pós-tratamento	600	66,66 $\pm$ 6,44 ^a	30%	1400	133,33 $\pm$ 6,44 ^a	70%
Tratamento Contínuo	486	48,6 $\pm$ 6,04 ^d	24,30%	1514	151,40 $\pm$ 6,04 ^c	75,70%

Legenda: Controle Negativo – Veículo *Byrsonima verbascifolia* (solução DMSO 1%)+ Solução Fisiológica; Controle Positivo – Veículo *Byrsonima verbascifolia* (Solução Fisiológica) + Ciclofosfamida (75mg/kg p.c., i.p.). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$; ANOVA/Tukey).

Tabela 6 – Valores Médios $\pm$ Desvio Padrão da contagem diferencial de células do sangue de camundongos tratados com *Byrsonima verbascifolia* e controles:

Parâmetros	Valores de Referência (%)	Grupos Experimentais							
		Controle Negativo	Controle Positivo	Extrato B.verbascifolia	Pré-tratamento		Tratamento Simultâneo	Pós-tratamento	Tratamento Contínuo
					Dose Única	Doses Múltiplas			
		24 horas							
Linfócito	55,0 - 95,0	66,10 ± 5,80 ^b	67,90±8,2 ^b	77,4±2,67 ^{c,d}	55,5±6,88 ^a	78,0±2,80 ^{c,d}	69,9±2,80 ^{b,c}	78,3±6,84 ^d	76,5±5,25 ^{c,d}
Neutrófilo	10,0 - 40,0	37,00 ± 3,70 ^d	31,9 ± 2,48 ^d	20,4±2,71 ^a	44,2±6,54 ^c	22,0±2,79 ^a	29,6±5,58 ^b	20,7±7,24 ^a	22,0±4,99 ^a
Monócito	0,1 - 3,5	0,10±0,31 ^a	0,00±0,00 ^a	0,2±0,42 ^a	0,3±0,67 ^a	0,00±0,00 ^a	0,3±0,48 ^a	0,4±0,84 ^a	0,4±1,26 ^a
Eosinófilo	0,0 - 0,4	0,10±0,31 ^a	0,30±0,67 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,2±0,42 ^a	0,3±0,94 ^a
Basófilo	0,0 - 0,3	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,4±0,69 ^{a,b}	0,8±1,13 ^b
		48 horas							
Linfócito	55,0 - 95,0	81,20 ± 5,41 ^{c,d}	71,20± 8,70 ^b	76,1±8,28 ^{c,b}	37,9±5,76 ^a	81,1±6,04 ^{c,d}	81,6±7,32 ^{c,d}	75,3±3,68 ^{c,b}	86,0±5,71 ^d
Neutrófilo	10,0 - 40,0	24,60±20,40 ^b	28,10 ± 8,41 ^b	23,7±8,43 ^{b,a}	61,8±5,86 ^c	18,9±6,04 ^a	20,4±6,72 ^a	24,5±347 ^a	13,0±3,40 ^{b,a}
Monócito	0,1 - 3,5	0,10±0,31 ^a	0,20±0,63 ^a	0,2±0,42 ^a	0,3±0,48 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,2±0,42 ^a	0,00±0,00 ^a
Eosinófilo	0,0 - 0,4	0,30±0,67 ^a	0,20±0,42 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
Basófilo	0,0 - 0,3	0,40±0,70 ^a	0,10±0,31 ^{a,b}	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b
		72 horas							
Linfócito	55,0 - 95,0	68,7 ± 3,89 ^b	67,4 ± 6,17 ^b	77,1±3,93 ^{b,c}	46,6±17,62 ^a	81,9±3,14 ^c	80,2±4,40 ^c	81,8±3,90 ^c	76,2±4,31 ^{b,c}
Neutrofilo	10,0 - 40,0	31,1 ± 3,63 ^d	32,3 ± 5,67 ^d	22,7±3,97 ^a	53,1±17,32 ^c	18,0±2,90 ^a	19,7±4,45 ^b	19,0±3,16 ^a	23,8±4,31 ^a
Monócito	0,1 - 3,5	0,10±0,31 ^a	0,30±0,67 ^a	0,1±0,31 ^a	0,3±0,48 ^a	0,1±0,31 ^a	0,1±0,31 ^a	0,2±0,42 ^a	0,00±0,00 ^a
Eosinófilo	0,0 - 0,4	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00a	0,00±0,00 ^a
Basófilo	0,0 - 0,3	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,1±0,31 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a

Legenda: Controle Negativo – Veículo *Byrsonima verbascifolia* (solução DMSO 1% + Solução Fisiológica); Controle Positivo – Veículo *Byrsonima verbascifolia* (Solução Fisiológica) + Ciclofosfamida (75mg/kg p.c., i.p.). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05; ANOVA/Tukey).

4. DISCUSSÃO

Os estudos das plantas medicinais utilizados na medicina popular são de significativa importância, levando a descoberta de novas fontes de novos fármacos com potencial quimioterapêutico (ELGORASHI et al., 2003; ARORA et al., 2005; VARANDA, 2006).

Atualmente, o número de investigações científicas relativo aos efeitos biológicos e farmacológicos de extratos, frações e outros derivados de plantas medicinais é consideravelmente grande, conduzindo ao isolamento de inúmeras classes de compostos químicos com diversas propriedades, entre elas, atividades antioxidantes, anticarcinogênicas, antimutagênicas e imunomodulatórias. Esse potencial farmacológico pode proporcionar a descoberta de novos fármacos para o tratamento de diversas patologias como, neurodegenerativas, infecções e câncer (LOPES, 2004).

Sabe-se que a mutação é um dos eventos iniciadores do câncer e a prevenção ou mesmo o combate desses eventos seria uma alternativa para a prevenção dessas mutações. Substâncias que atuam prevenindo esses episódios são denominadas de antimutagênicas (LIRA, 2007).

Estudos fitoquímico e farmacológico de espécies vegetais tem se intensificado nos últimos anos.

As famílias Annonaceae e Malpighiaceae, objeto de estudo no presente trabalho, apresentam uma grande variedade de efeitos biológico e farmacológicos e tem sido associados a sua diversidade química (GONZALEZ-ESQUINCA et al., 2014; ALALI et al., 1999; GUILHON-SIMPLICIO e PEREIRA, 2011).

Apesar dos estudos terem se intensificado com espécies da família Annonaceae na Malpighiaceae, pesquisas realizadas com a *Annona nutans* e *Byrsonima verbasifolia* ainda são escassas, principalmente no que se refere a mutagenicidade, antimutagenicidade e imunomodulação.

Estudos de Santos Pimenta e colaboradores (2003) com *A. nutans* indicaram atividades pesticida e antitumoral. Algumas substâncias desta planta já foram identificadas, tais como acetogeninas (GLEYE et al., 2000), com atividades citotóxica, pesticidas, antitumoral, antiparasitária (ALALI et al., 1999, WAECHTER et al., 1998); alcalóides (SANTOS PIMENTA et al., 2003), com

efeitos citóxico e antiparasitário (LIMA, 2012); quercetina (SILVA et al., 2015 2015) com atividades antidiabético, antioxidante (PANDA e KAR, 2007; LAGE et al., 2014), e derivados de ácido cinâmico com efeito antitumoral (LIU et al., 1995).

Estudo fitoquímico realizado com extrato hexânico de *B. verbascifolia* mostrou a presença de sitosterol, β -amirina, ácido 3-O-acetiloleanólico, friedelina, β -amirenona, 3-O-acetillupeol e glocidona (GOTTLIEB et al., 1975). O extrato metanólico mostrou a presença de derivados de catequina e quercetínico (GONÇALVES et al., 2013b). Estudos a respeito da atividade biológica dessa planta, mostra que ela possui atividades antiviral e antibacteriana (LOPEZ et al., 2001; CECÍLIO et al., 2012), antifúngica (NARUZAWA; PAPA, 2011) e antioxidante (MORAIS et al., 2013).

Tendo em vista as diversas atividades biológicas dos compostos destas plantas, o presente estudo avaliou atividade (anti)mutagênica e imunomodulatória do extrato hidroetanólico da *A. nutans* e do extrato metanólico de *B. verbascifolia* por meio do teste do micronúcleo, contagem diferencial de células no sangue periférico e atividade fagocitária esplênica.

De acordo com os resultados encontrados, a administração da fração hidrometanólica de *A. nutans* e o extrato metanólico de *B. verbascifolia* não apresentou atividade mutagênica. Esse estudo corroborou com o estudo realizados com extrato de *A. nutans* em fêmeas prenhas (GONÇALVES et al., 2013a) e com espécies do mesmo gênero de *Annona* (VILAR et al., 2008; THAKKAR et al., 2010; VILAR et al., 2011; GARCIA; NEPOMUCENO, 2011); assim como com estudos realizados com extrato metanólico de *B. verbascifolia* em fêmeas prenhas (GONÇALVES et al., 2013b) extrato metanólico de *B. crassa*, (CARDOSO et al., 2006), extrato etanólico e clorofórmico de *B. basiloba* (LIRA, 2008), respectivamente.

Para a elucidação do(s) mecanismo(s) de ação dos compostos químicos ou moléculas biológicas em antimutagênese diferentes protocolos de tratamento precisam ser analisados (MAURO et al., 2014). Portanto, neste estudo, camungondos machos tratados com a fração hidrometanólica de *A. nutans* e o extrato metanólico de *B. verbascifolia* e ciclofosfamida, utilizando os protocolos pré-tratamento e pós-tratamento para indício de ação bioantimutagênica, o protocolo de tratamento simultâneo para indício de ação

desmutagênica e, para ação tanto bioantimutagênica, quanto desmutagênica o protocolo de dose contínua (ANTUNES; ARAUJO, 2000; SILVA et al., 2005).

Substâncias que atuam por mecanismo de desmutagênese inativam os agentes mutagênicos parcial ou totalmente pela interação química ou enzimática antes da interação com o DNA. As moléculas que atuam por bioantimutagênese suprimem o processo de mutação depois do DNA sofrer dano, agindo como moduladoras do reparo e replicação do DNA, agindo em nível celular (BHATTACHARYA, 2011).

De acordo com os resultados obtidos para o extrato de *A. nutans*, o grupo pré-tratamento nos protocolos dose única, doses múltiplas e o contínuo, em 24 horas, mostraram uma percentagem de redução de danos de 91,44%, 41,18% e 91,44%, respectivamente, demonstrando que o extrato atua de forma quimiopreventiva. Os grupos simultâneos e pós-tratamento apresentaram uma baixa taxa na redução de danos. Estes dados sugerem que este extrato possui ação tanto bioantimutagênica, como desmutagênica. Sendo que a atividade desmutagênica foi mais eficaz, como sugerido pela redução de danos no protocolo do grupo contínuo no ensaio do micronúcleo.

De acordo com Thakkar et al. (2010), o extrato da folha de *A. squamosa*, em 24 horas, mostrou que no grupo pré-tratamento houve uma redução significativa na frequência de aberrações estruturais cromossômicas induzidas por ciclofosfamida em células de medula óssea, mostrando assim seu efeito desmutagênico. Ainda, segundo Dragano et al. (2010), a polpa do fruto de *A. crassiflora* potencializou a ação da ciclofosfamida (CP) e não apresentou efeitos mutagênicos e antimutagênicos.

Já para o extrato metanólico de *B. verbascifolia*, o grupo pré-tratamento nos protocolos dose única e doses múltiplas, em 24 horas, mostraram uma percentagem de redução de danos de 63% e 48%, respectivamente, demonstrando que o extrato atua de forma quimiopreventiva. O tratamento contínuo não foi capaz de prevenir os danos. Os grupos simultâneo e pós-tratamento apresentaram redução de danos de 47% e 0,01%, respectivamente. Estes dados sugerem que o extrato possui ação bioantimutagênica. Sendo que a atividade desmutagênica foi mais eficaz, como sugerido pela redução de danos nos protocolos do grupo pré-tratamento no ensaio do micronúcleo. Vale ressaltar que o tratamento contínuo e o pós-tratamento não são indicados

como prática terapêutica eficiente, uma vez que não apresentam boas reduções de danos.

O grupo pré-tratamento, nos protocolos dose única, doses múltiplas, e contínuo, em 48 horas, mostraram uma percentagem de redução de danos de 92%, 95% e 32%, respectivamente, sugerindo que o extrato atua de forma quimiopreventiva. Os grupos simultâneo e pós-tratamento apresentaram redução de danos de 56% e 31%, respectivamente. Estes dados sugerem que o extrato possui ação tanto desmutagênica, como bioantimutagênica. Sendo que a atividade bioantimutagênica foi mais eficaz, tal como foi sugerido pela redução de danos nos protocolos do grupo pré-tratamento no ensaio do micronúcleo. O aparecimento de uma maior frequência de micronúcleos em 48 horas é resultado da agressão ocorrida nas 24 horas anteriores.

Segundo Mendanha et al. (2010), a *B. verbascifolia* possui atividade antimutagênica frente aos danos causados pela doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. Estudos realizados com *B. basiloba* e *B. crassa*, no tratamento simultâneo e com as seguintes doses: 100, 75 e 50 mg/ml para a primeira e 166, 124,5 e 83 mg/ml para a segunda, demonstraram reduções de danos de 7,42%, 40% e 40,75%; e 43,73%, 49,66% e 42,97%, respectivamente (LIRA, 2007). Ainda, estudos realizados com *B. fagifolia* não demonstraram efeitos mutagênicos (CARDOSO, 2006).

Quando relacionados os dados do teste do micronúcleo com os resultados da fagocitose esplênica para os extratos do presente trabalho, pode-se notar que a taxa de fagocitose se encontrou significativamente maior que no controle, com exceção do pós-tratamento para *A. nutans* e pós-tratamento para *B. verbascifolia*. Esse fato sugere que a administração da fração hidrometanólica de *A. nutans* e do extrato metanólico de *B. verbascifolia* proporciona um aumento da atividade fagocítica, que pode indicar imunomodulação, características que permitem atribuir a atividade quimioprotetora. Os resultados observados para os ensaios de micronúcleo e fagocitose esplênica no tratamento contínuo do extrato metanólico de *B. verbascifolia* não preveniram a formação de micronúcleos, porém aumentou a fagocitose.

Esses dados corroboram com os achados na contagem de células diferenciais, pois não houve alteração no número de monócitos circulantes,

sugerindo que os monócitos poderiam ter migrado para o baço, explicando assim o aumentado da atividade fagocítica.

Os monócitos correspondem a aproximadamente de 1-6% das células brancas do sangue, elas tem a capacidade de migrarem dos vasos sanguíneos e se instalarem nos tecido, onde se diferenciam em macrófagos (KELLEY et al., 1988; LEWIS et al, 1999). Possuem a função de remover corpos estranhos, parasitas e bactérias, promover ou inibir a inflamação, atuar no reparo e renovação dos tecidos, ação microbicida e antitumoral (KLIMP et al., 2002). Sendo assim, presume-se que a redução da frequência de micronúcleos em reticulócitos do sangue periférico pode estar relacionada com a melhoria da atividade fagocítica das células do baço (ALVES DE LIMA, 2006), principalmente no grupo contínuo da fração hidrometanólica de *A. nutans*.

Existem poucos dados relacionados à atividade imunomodulatória de extratos. Segundo Gonçalves et al. (2013a), a fração hidrometanólica de *A. nutans* em fêmeas prenhas não demonstrou atividade imunomodulatória, assim como os extratos de *A. glabra* que inibiu a migração natural de granulócitos, dose – dependente, sugerindo ação antiinflamatória, entretanto não foi observado relação a imunomodulação (SIEBRA et al., 2009). Os mesmos resultados foram observados para *B. verbascifolia* em relação as fêmeas prenhas, onde não se observou atividade imunomodulatória (GONÇALVES et al., 2013b) e estudos com os extratos de *B. crassa* e *B. intermédia* não demonstraram atividade imunoestimulante (CARDOSO, 2006).

As plantas são uma importante fonte de substâncias químicas com ação na modulação do sistema imune (BASSO et al., 2005). Atividades imunossupressoras, imunoestimuladoras ou imunorregulatórias vem sendo investigadas utilizando-se grande número de plantas e seus constituintes (PATWARDHAN; MANISH, 2005). Várias plantas usadas como medicinais tem mostrado efeitos antimicrobiano, anti-carcerígenos e antiinflamatórios, entre outros, modulando as respostas imunes, sendo estes denominados de imunomoduladores (BIN-HAFEEZ et al., 2003). Esses agentes imunomoduladores podem estimular macrófagos, aumentar a proliferação de linfócitos T, promover a formação de anticorpos, ativar o sistema complemento e modular a secreção de citocinas (BIELLA, 2007). Uma variedade de substâncias, como polissacarídeos, lectinas, saponinas, flavonoides, polifenóis

oriundas de plantas são capazes de estimular o sistema imune apresentando tal atividade (NUNES-PINHEIRO et al., 2003).

De acordo com os resultados apresentados, a fração hidrometanólica de *A. nutans* e o extrato metanólico de *B. verbascifolia* possuem efeito imunomodulatório por melhorar a atividade fagocítica do baço e atuar tanto por desmutagênese como por biotransmutação, com um melhor desempenho por desmutagênese.

4. 1 REFERÊNCIAS

Alali, F. Q., Liu, X., McLaughlin, J. L. (1999) Annonaceous acetogenins: recent progress. *Journal of Natural Products*, **62**, 504-540.

Alves de Lima, P. L. (2001) Avaliação da modulação da genotoxicidade pelo cogumelo *Lentinula edodes* (shitake). Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina (FMB). Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Alves de Lima, P. L., 2006. *Lentinula edodes* (Berk.) Singer: Mecanismo de modulação da mutagênese química *in vivo* e alterações de efeito durante a estocagem. 46p. Tese -Doutorado em Patologia. Faculdade de Medicina-UNESP- Botucatu- São Paulo- Brasil.

Antunes, L. M. G. e Araujo, M. C. P. (2000) Mutagenicity and antimutagenicity of the main food colorings. *Revista de Nutrição*, **13**, 81-88.

Arora, R., Gupta, D., Chawla, R., Sagar, R., Sharma, A., Kumar, R., Prasad, J., Singh, S., Samanta, N., Sharma, R. K. (2005) Radioprotection by plant products: present status and future prospects. *Phytotherapy Research*, **19**, 1-22.

Basso, L. A., da Silva, L. H., Fett-Neto, A. G., de Azevedo, W. F. Jr., Moreira Ide, S., Palma, M. S., Calixto, J. B., Astolfi Filho, S., dos Santos, R. R., Soares, M. B., Santos, D. S. (2005) The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis and T-cell mediated diseases. A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**, 575-606.

Bhattacharya, S. (2011) Natural Antimutagens: A Review. *Research Journal of Medicinal Plant*, **5**, 116-126.

Biella, C. A. (2007) Avaliação da atividade imunomoduladora de *Alternanthera tenella* Colla e investigação de ações do extrato aquoso em modelo de artrite

experimental. Tese (doutorado). Faculdade de Ciências Aplicadas à Farmácia. Ribeirão Preto.

Bin-Hafeez, B., Haque, R., Parvez, S., Pandey, S., Sayeed, I., Raisuddin, S. (2003) Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract in mice. *International Immunopharmacology*, **3**, 257-265.

Cardoso, C. R., de Syllos Cólus, I. M., Bernardi, C. C., Sannomiya, M., Vilegas, W., Varanda, E. A. (2006) Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Toxicology*, **225**, 55-63.

Cecílio, A. B., Faria, D. B., Oliveira, P. C., Calda, S., Oliveira, D. A., Sobral, M. E. G., Duarte, M. G. R., Moreira, C. P. S., Silva, C. G., Almeida, V. L. (2012) Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *Journal of Ethnopharmacology*, **141**, 975-981.

Silva, A. F., Oliveira, R. J., Matuo, R., Ribeiro, L. R., Mantovani, M. S. (2005) Effects of agaricus blazei on clastogenicity induced by ultraviolet radiation in culture of CHO-K1 cells. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, **26**, 131-140.

Lima, J. P. S., Pinheiro, M. L. B., Santos, A. M. G., Pereira, J. L. S., Santos, D. M. F., Barison, A., Costa, E. V. (2012) Atividade Antileishmania e Citotóxica *In Vitro* de *Annona mucosa* (Annonaceae). *Revista Virtual de Química*, **4**, 692-702.

Dragano, N. R., Venancio, V. P., Paula, F. B. A., Lucia, F. D., Fonseca, M. J. O., Azevedo, L. (2010) Influence of Marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress in vivo. *Plant Foods for Human Nutrition*, **65**, 319-325.

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

Garcia, T. A. e Nepomuceno, J. C. (2011) Atividade antigenotóxica da polpa da graviola (*Annona muricata*), avaliada por meio do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em asas de *Drosophila melanogaster*. *Unipam*, **8**, 70-80.

Gleye, C., Raynaud, S., Fourneau, C., Laurens, A., Laprévote, O., Serani, L., Fournet, A., Hocquemiller, R. (2000) Cohibins C and D, two important metabolites in the biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and *Annona nutans*. *Journal of Natural Products*, **63**, 1192-1196.

Gonçalves, C. A., Silva, N. L., Mauro, M. O., David, N., Cunha-Laura, A. L. , Auharek, S. A., Monreal, A. C., Vieira, M. C., Silva, D. B., Santos, F. J., Siqueira, J. M., Oliveira, R. J. (2013b) Evaluation of mutagenic, teratogenic, and immunomodulatory effects of *Annona nutans* hydromethanolic fraction on pregnant mice. *Genetics and Molecular Research*, **13**, 4392-4405.

Gonçalves, C. A., Siqueira, J. M., Carollo, C. A., Mauro, M. de O., de Davi N., Cunha-Laura, A. L., Monreal, A. C., Castro, A. H., Fernandes, L., Chagas, R. R., Auharek, S. A., Oliveira, R. J. (2013a) Gestational exposure to *Byrsonima verbascifolia*: teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. *Journal of Ethnopharmacology*, **150**, 843-850.

González-Esquinca, A. R., De-La-Cruz-Chacón, I., Castro-Moreno, M., Orozco-Castillo, J. A., Riley- Saldaña, C. A. (2014). Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. *Revista Brasileira de Fruticultura*, **36**, 01-16.

Gottlieb, O. R., Mendes, H. P., Magalhães, M. T. (1975) Triterpenoids from *Byrsonima verbascifolia*. *Phytochemistry*, **14**, 1456.

Guilhon-Simplicio, F. e Pereira, M. D. M. (2011) Chemical and pharmacological aspects of *Byrsonima* (Malpighiaceae). *Química Nova*, **34**, 1032-1041.

Kelley, J. L., Rozek, M. M., Sueram, C.A., Scharz, C. J. (1998) Activation of human peripheral blood monocytes by lipoproteins. *The American Journal of Pathology*, **130**, 233–231.

Klimp, A. H., De Vries, E. G., Scherphof, G. L., Daemen, T. (2002) A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, **44**, 143-161.

Lage, G. A., Medeiros, F. da S., Furtado Wde, L., Takahashi, J. A., de Souza Filho, J. D., Pimenta, L. P. (2014) The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. *Natural Product Research* **28**, 808-811.

Lewis, J. S., Lee, J. A., Underwood, J. C., Harris, A. L., Lewis, C. E. (1999) Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *Journal of Leukocyte Biology*, **66**, 889-900.

Lira, W. M. (2007) Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico de extratos e compostos vegetais obtidos a partir dos gêneros *Byrsonima* e *Davilla*. Tese (doutorado). Unesp. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara.

Lira, W. M., dos Santos, F. V., Sannomiya, M., Rodrigues, C. M., Vilegas, W., Varanda, E. A. (2008) Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. *Journal of Medicinal Food*, **11**, 111-119.

Liu, L., Hudgins, W. R., Shack, S., Yin, M. Q., Samid, D. (1995) Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention. *International Journal of Cancer*, **62**, 345-350.

Lopes, F. C. M. (2004) Avaliação da atividade imunológica *in vitro* de *Alchornea* spp quanto à produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral- α por macrófagos murinos. Dissertação de Mestrado, FCF/Unesp, SP – Brasil.

Lopez, A., Hudson, J. B., Towers, G. H. (2001) Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **77**, 189-196.

Mauro, M. O., Pesarini, J. R., Marin-Morales, M. A., Monreal, M. T., Monreal, A. C., Mantovani, M. S., Oliveira, R. J. (2014) Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. *Genetics and Molecular Research*, **13**, 4808-4819.

Mendanha, D. M., Ferreira, H. D., Felício, L. P., Silva, E. M, Pereira, D. G., Nunes, W. B., Carvalho, S. (2010) Modulatory effect of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genetics and Molecular Biology*, **9**, 69-77.

Morais, M. L., Silva, A. C. R., Araújo, C. R. R., Esteves, E. A., Dessimoni-Pinto, N. A. V. (2013) Determinação do potencial antioxidante *in vitro* de frutos do Cerrado brasileiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, **35**, 355-360.

Naruzawa, E. S., Papa, M. F. S. (2011) Antifungal activity of extracts from Brazilian Cerrado plants on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Corynespora cassicola*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, **13**, 408-412.

Nunes-Pinheiro, D. C. S., Leite, A. K. R. M., Farias, V. M., Braga, L. T., Lopes, C. A. P. (2003) Immunomodulatory activity of the medicinal plants: perspectives for veterinary medicine. *Ciência Animal*, **13**, 23-32.

Panda, S., Kar, A. (2007) Antidiabetic and antioxidative effects of *Annona squamosa* leaves are possibly mediated through quercetin-3-O-glucoside. *Biofactors*, **31**, 201-210.

Patwardhan, B., Manish, G. (2005) Botanical immunodrugs: scope and opportunities. *Drug Discovery Today*, **10**, 495-502.

Santos Pimenta, L. P., Pinto, G. B., Takahashi, J. A., Silva, L. G., Boaventura, M. A. (2003) Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). *Phytomedicine*, **10**, 209-212.

Siebra, C. A., Nardin, J. M., Florão, A., Rocha, F. H., Bastos, D. Z., Oliveira, B. H., Weffort-Santos, A. M. (2009). Potencial antiinflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **19**, 82-88.

Silva, N. L., Zobiole, N. N., Silva, D. B., Sartorid, A. L. B., Oliveira, R. J., Pinto, M. E. A., Santosa, F. J. L., Siqueira, J. M. (2015, 2015) Constituintes químicos e atividade fitotóxica das folhas de *Annona nutans*. *Química Nova*

Thakkar, T. H., Solanki H. K., Tripathi, P., P. N. J., Jani, G. K. (2010) Evaluation of antimutagenic potential of *Annona squamosa* leaf extract. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, **1**, 114-123.

Varanda, E. A. (2006) Atividade mutagênica de plantas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **27**, 1-7.

Vilar, J. B., Ferreira, F. L., Ferri, P. H., Guillo, L. A., Chen Chen, L. (2008) Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. *Brazilian Journal of Biology*, **68**, 141-147.

Vilar, J. B., Ferri, P. H., Chen-Chen, L. (2011) Genotoxicity investigation of araticum (*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test. *Brazilian Journal of Biology*, **71**, 197-202.

Waechter, A., Yaluff, G., Inchausti, A., Arias, A. R., Hocquemiller, R., Cavé, A., Fournet, A. (1998) Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Acetogenins Isolated from *Annona glauca*. *Phytotherapy Research*, **12**, 541-544.

5. Anexos



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 311 da Doutoranda Nathalia Novak Zobiole, sob a orientação do Prof. João Máximo Siqueira referente ao projeto de pesquisa, "Avaliação dos efeitos antigenotóxicos, atnimutagênicos e anticarcinogênicos de extratos, frações e substâncias isoladas de espécies vegetais do cerrado in vivo", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 29 de junho de 2011.

Campo Grande (MS), 29 de junho de 2011.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Joice Stein', is written over a horizontal line.

Coordenadora da CEUA