

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE MUNDO NOVO
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARCIA ROSA PEREIRA DA SILVA

ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DE EXTRATOS
DE *Pogonopus tubulosus* (A. RICH.) SCHUM (RUBIACEAE), EM
CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*

Mundo Novo – MS
2012

MARCIA ROSA PEREIRA DA SILVA

**ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DE EXTRATOS
DE *Pogonopus tubulosus* (A. RICH.) SCHUM (RUBIACEAE), EM
CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Ciências
Biológicas da Universidade Estadual de
Mato Grosso do Sul, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Zaira da Rosa Guterres

MARCIA ROSA PEREIRA DA SILVA

**ATIVIDADE CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DE EXTRATOS
DE *Pogonopus tubulosus* (A. RICH.) SCHUM (RUBIACEAE), EM
CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

APROVADO EM ____ de _____ de 2012

Profª Drª Zaira da Rosa Guterres - Orientadora - UEMS _____

Profº Drº Carlos Alexandre Fernandes - UEMS _____

Profª Drª Ana Francisca Gomes da Silva - UEMS _____

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela vida, coragem, paciência e disposição para enfrentar todos os obstáculos durante este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC).

Aos meus pais, esposo, filhas e toda minha família em geral pela compreensão e apoio nos momentos difícil durante estes quatros anos de estudos.

A querida Prof^a Dr^a Zaira da Rosa Guterres pela compreensão ajuda e carinho durante estes quatro anos, inclusive pela paciência durante a orientação do meu TCC.

A minha banca, Prof^o Dr^o Carlos Alexandre Fernandes, Prof^a Dr^a Ana Francisca Gomes da Silva e suplente Cassia F. Yano.

A Thalita Zanetti por ter me ajudado muito nos momentos de desespero, com sua calma e delicadeza.

A Universidade Estadual de Mato Grosso de Sul, Unidade de Mundo através da direção, coordenação, secretaria, funcionário e corpo docente pela ajuda e compreensão.

E a todos os que de alguma forma contribuiu para a minha formação acadêmica.

RESUMO

Pogonopus tubulosus (A. Rich.) K. Schum (Rubiaceae) é uma planta que cresce em florestas subtropicais da América do Sul fornece uma das numerosas drogas chamada "Falsa quina" utilizada no tratamento da malária. Deste espécime já foram isolados os alcaloides tubulosine, psicotrina e cefalina, os quais apresentaram atividade antimalária *in vitro* e *in vivo*. O presente trabalho avaliou os efeitos citotóxicos e genotóxicos dos extratos etanólicos obtidos das cascas do caule, dos frutos e das frações obtidas de *P. Tubulosus*, por meio do ensaio SMART, com linhagens específicas de *Drosophila melanogaster*. Para tanto, foram utilizados dois cruzamentos: [1] Cruzamento padrão - ST; [2] Cruzamento de alta bioativação metabólica – HB. Larvas de terceiro estágio de desenvolvimento, resultantes destes cruzamentos foram tratadas cronicamente por 48 horas com os extratos etanólicos de casca do caule e de fruto nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/mL; as frações alcaloídica foram avaliadas nas concentrações de 0,12; 0,25 e 0,50 mg/mL e a não alcaloídica foi avaliada nas concentrações de 0,5; 1,0, 2,0 e 4,0 mg/mL. Como controle positivo utilizou-se o quimioterápico cloridrato de doxorubicina- DXR (0,125 mg/mL) e como controle negativo o solvente contendo água destilada, 1% de Tween-80 e 3% etanol. As frequências de manchas mutantes observadas nos grupos tratados foram comparadas as obtidas no controle negativo. Os resultados observados nos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, indicaram que o extrato etanólico e as frações não alcaloídica não foram genotóxica, já que os resultados não diferiram dos encontrados no controle negativo. No entanto, a concentração de 4,0 mg/mL do extrato etanólico e da fração não alcaloídica foram citotóxica, pois os indivíduos não chegaram a fase adulta. Verificou-se também atividade citotóxica na fração alcaloídica nas concentrações avaliadas, visto que todas as larvas que foram submetidas a esse tratamento morreram.

Palavras chaves: Malária. Alcaloide. Medicina popular. SMART.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. MATERIAIS E MÉTODOS	8
2.1. Coleta, identificação e preparo dos extratos.....	8
2.2. SMART (Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática).....	8
2.3. Cruzamentos.....	10
2.4. Manutenção do meio, obtenção e coleta de larvas e tratamentos.....	11
3. RESULTADOS	12
4. DISCUSSÃO	16
5. CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	20

1. INTRODUÇÃO

A família Rubiaceae possui distribuição cosmopolita, concentrada nos trópicos, sendo a maioria árvores de pequeno porte ou arbustos muito frequentes no sub-bosque, incluindo aproximadamente 550 gêneros e 9000 espécies. No Brasil é representada por cerca de 120 gêneros e 2000 espécies, sendo uma das principais famílias de nossa flora (SOUZA; LORENZI, 2008; TAYLOR et al., 2007).

A família pode ser facilmente reconhecida em campo devido às suas folhas simples, geralmente opostas cruzadas e pela presença de estípulas interpeciolares. As flores de Rubiaceae apresentam as mais variadas formas e cores, podendo ser polinizadas por borboletas, mariposas, abelhas, moscas, aves ou morcegos (JUDD et al., 2009, apud SCHVINN; SILVA, 2011).

Segundo Mabberley (1987 apud DIAS, 2011), o gênero *Pogonopus* é composto por apenas três espécies (*Pogonopus exsertus* (Oerst) Oerst, *Pogonopus speciosus* (Jacq) K. Schum, *Pogonopus tubulosus* (A. Rich.) K. Schum) as quais possuem flores com corola tubular e cores que variam entre rosa, vermelho e roxo. As flores da espécie *P. tubulosus* são dispostas em inflorescências pedunculadas terminais e possuem brácteas em suas axilas (DIAS, 2011).

Dentre os representantes de Rubiaceae, o café (*Coffea arabica* L. e *C. canefora* Pierre ex Froehner) é a principal espécie de interesse econômico. Destacam-se também espécies utilizadas na alimentação como o "jenipapo" (*Genipa americana* L.) (SOUZA; LORENZI, 2008), as utilizadas na indústria farmacêutica como a *Cinchona pubescens*, além de várias espécies empregadas pela medicina popular no tratamento de diversas enfermidades, tais como: hepatite, apendicite, infecção das vias urinárias e para combater o desenvolvimento de câncer (XU et al., 1997; COELHO et al., 2006, apud FERNANDES, 2011).

P. tubulosus fornece uma das numerosas drogas chamadas "Falsa quina" na América do Sul, utilizada contra a malária (KILLEEN et al., 1993, apud SAUVAIN et al., 1996). A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários que pertencem ao gênero *Plasmodium* da família Plasmodidae. Quatro espécies de parasitas da malária são patogênicas para os seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. Malariae* (OLIVEIRA et al., 2009).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a malária é a doença tropical parasitária que mais causa problemas sociais e econômicos no mundo, só é superada em número de mortes pela AIDS. Esta doença afeta cerca de 500 milhões de pessoas causando um milhão de mortes a cada ano. No Brasil, a área de maior endemicidade é a Amazônia, apresentando 99% dos casos (RODRIGUES; DAVID NETO, 2011; SAXENA et al., 2003).

Sauvain e colaboradores (1996) realizaram um estudo fitoquímico do extrato da casca do caule de *P. tubulosus*, na tentativa de encontrar novos produtos antimaláricos, a partir deste extrato foram identificados três alcaloides (tubulosine, psicotrina e cefalina), que apresentaram atividade antimalárica, *in vitro* e *in vivo*. Contudo o alcaloide tubulosine, o principal componente antimalárico isolado a partir desta espécie, apresenta pouco interesse no tratamento curativo da malária devido sua toxicidade.

Apesar de muitas ações benéficas das plantas, alguns de seus constituintes como, por exemplo, os alcaloides e taninos podem ser tóxicos e causar problemas hepáticos, gástricos e alterações no DNA (tais como deleção e recombinação) (AMES, 1983; MARQUES et al., 2003). Para garantir a segurança no uso de plantas, deve ser comprovado que sua utilização não traz riscos à saúde humana por meio de estudos farmacológicos e toxicológicos, sendo então necessária a avaliação de uma possível atividade citotóxica e genotóxica.

O ensaio SMART em células somática de *Drosophila melanogaster* tem sido empregado para avaliar a genotoxicidade e ou antigenotoxicidade de extratos e de metabólitos secundários obtidos de plantas (TÉLLEZ et al., 2007; SANTOS-CRUZ et al., 2012).

Como são escassos os dados na literatura especializada sobre os efeitos citotóxicos e genotóxicos para os extratos e frações isolados da espécie *P. tubulosus*, o presente trabalho teve como objetivo avaliar esses efeitos, utilizando o Teste para Detecção de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation And Recombination Test – SMART) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Coleta, identificação e preparo dos extratos.

O material botânico, as partes aéreas do vegetal (caule e fruto) de *P. tubulosus* (Figura 1) foram coletadas na chácara dos Poderes em Campo Grande – MS, no ano de 2010.

A identificação da espécie foi realizada pela professora MSc. Ubirazilda Maria de Resende sendo a exsicata depositada no herbário CGMS, localizada no Departamento de Biologia da UFMS.

Os extratos foram preparados por Aime Portella, Mestrando em Química Orgânica: Ênfase em Produtos Naturais– UFMS - Campo Grande/MS.



Figura 1: *Pogonopus tubulosus*. Disponível em:
<<http://www.hoybolivia.com/turismo/turisticos/flora/26quina.htm>>
Acessado em 20/10/2012

2.2. Somatic Mutation And Recombination Test – SMART (Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática).

O Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (*Somatic Mutation and Recombination Test – SMART*) baseia-se em mutações encontradas nos tricomas que revestem as asas de *Drosophila melanogaster* (Figura 2). A vantagem de utilizar a *D.*

melanogaster deve-se ao fato de ser um organismo eucarioto com ciclo de vida curto, aproximadamente de 10-12 dias a 25°C. Durante a metamorfose, grupos de células que originarão as asas (discos imaginais) sofrem sucessivas mitoses até se diferenciar completamente. As moscas utilizadas são portadoras de dois genes marcadores para a forma dos pelos das asas: pelos múltiplos, do inglês *multiple wing hair* (*mwh*, 3-0.3) e pelos cujo formato lembra uma chama de vela, do inglês *flare* (*flr³*, 3-38.8), baseado na indução de alterações genéticas as quais originam a perda de heterozigose em células larvais, que são heterozigotas para estes dois genes recessivos (GRAF et al., 1984).

Os dois tipos de manchas possíveis são: manchas simples (somente *mwh* ou *flr³*), que apontam para mutações pontuais e alterações cromossômicas, assim como recombinação mitótica; e manchas gêmeas (células *mwh* e *flr³* adjacentes) (Figura 3), que são fruto exclusivo de recombinações, podendo fornecer indicações preliminares sobre a ação recombinogênica do composto (GRAF et al., 1984; GRAF et al., 1994).

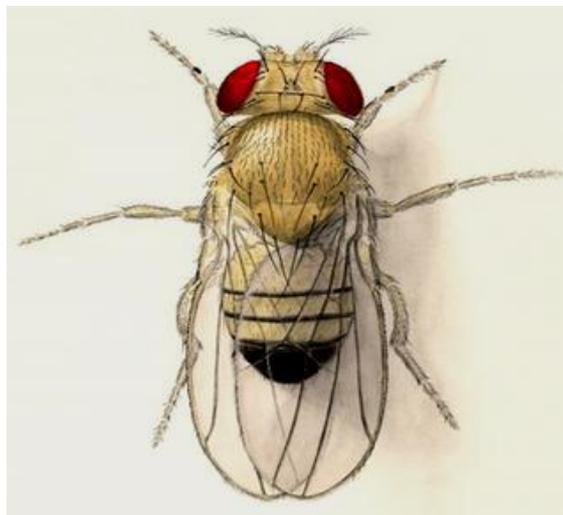


Figura 2: *Drosophila melanogaster*. Disponível em: <<https://gene.sfari.org/GeneDetail/NIPBL>> Acessado em 20/10/2012

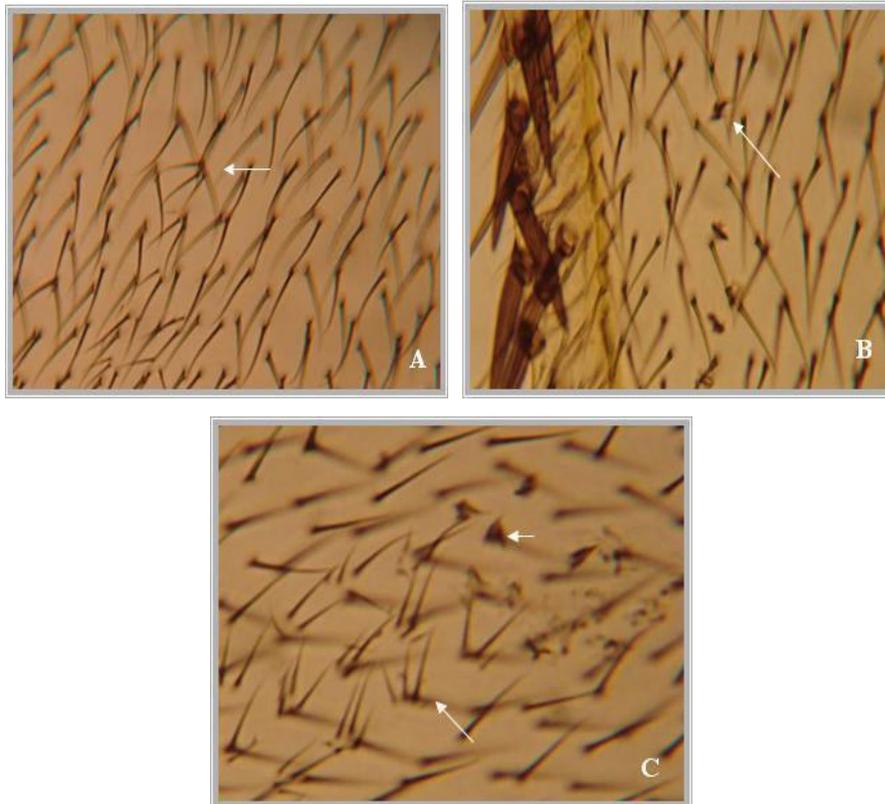


Figura 3: Fotomicrografias evidenciando os tipos de manchas mutantes encontradas. A – mancha simples com pelos múltiplos (*mwh*), a seta da figura A indica pelos (*mwh*). B – mancha simples com pelos *flare* (*flr³*), a seta da figura B indica os pelos do tipo (*flr³*). C – Mancha gêmea, com pelos múltiplos (*mwh*) (seta maior) e pelos *flare* (*flr³*) (seta menor) adjacentes.

2.3. Cruzamentos

O Ensaio SMART foi realizado por meio de cruzamentos experimentais entre linhagens: (*mwh*, *flr³* e *ORR/flr³*) de *D. melanogaster*. Com essas linhagens foram realizados dois diferentes cruzamentos: 1] cruzamento padrão (ST- *standard cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens *flr³* (GRAF et al., 1984) e 2] cruzamento de alta bioativação (HB- *high bioactivation cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens *ORR/flr³* (GRAF; VAN SCHAİK, 1992). Ambos os cruzamentos produzem indivíduos trans-heterozigotos marcados (MH), com constituição genotípica *mwh/flr³*, e indivíduos heterozigotos balanceados (BH), constituídos por *mwh/TM3, Bd^s*, que pode ser facilmente reconhecidos pelos aspectos fenotípicos das asas com bordas recortadas (*serate*). Onde os indivíduos MH permitem detectar a ocorrência de mutações de ponto, pequenas aberrações cromossômicas e recombinações mitóticas proximais e distais, já a análise dos indivíduos BH permite detectar a ocorrência de mutações de ponto e pequenas aberrações cromossômicas (GUZMÁN-TINCÓN; GRAF, 1995).

2.4. Manutenção do meio, obtenção e coleta de larvas e tratamentos.

Os estoques foram mantidos em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura de *Drosophila melanogaster* (820 mL de água, 25 g de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*), 11 g de ágar-ágar, 156 g de banana, 1 g de nipagin) a temperatura de 22° C e a uma umidade relativa do ar de 65%.

Foram selecionadas 400 fêmeas virgens das linhagens *flr*³ e *ORR*, as quais foram cruzadas com 200 machos da linhagem *mwh*, por um período de 48 horas, posteriormente os casais foram transferidos, por um período de 8 horas para frascos contendo uma base sólida de ágar-ágar, coberta por uma camada de fermento biológico (*S. cerevisiae*) suplementado com açúcar, para coleta de ovos. Após 72 ± 4 horas, as larvas de 3° estágio de desenvolvimento, foram lavadas com água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina. Grupos de aproximadamente 100 larvas foram transferidos para tubos de vidro contendo 1,5 g de meio de cultura alternativa (purê de batata instantâneo Yoki®) e 5,0 mL do extrato etanólico dos frutos e cascas do caule nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/mL; e 5,0 mL da fração alcalóidica nas concentrações de 0,12; 0,25 e 0,50 e não alcalóidica nas concentrações de 0,5; 1,0, 2,0 e 4,0 mg/mL; como controle negativo foi utilizado o solvente (composto por água, 3% de etanol e 1% de tween-80), como controle positivo foi utilizado o cloridrato de doxorrubicina na concentração de 0,125 mg/mL.

Adultos emergentes portadores dos dois tipos de genótipos: *mwh* + / + *flr*³ (trans-heterozigoto marcado - MH) e *mwh* + / + *TM3, Bd*^S (heterozigoto balanceado - BH) foram coletados e fixados em etanol 70%. As asas foram destacadas e montadas entre lâminas e lamínulas com solução de Faure (30 g de goma arábica, 50 g de hidrato de cloral, 100 mL de água e 20 mL de glicerol) e analisadas quanto á ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópios ópticos com magnificação de 400X. Para a análise estatística foi utilizado o programa qui-quadrado bicaudal (FREI; WURGLER, 1988) onde (i) positivo: rejeita-se a primeira hipótese e aceita-se a segunda; (ii) fraco positivo: rejeita-se ambas as hipóteses; (iii) inconclusivo: aceita-se ambas hipóteses; (iv) negativo: aceita-se a primeira hipótese e rejeita-se a segunda.

3. RESULTADOS

No Ensaio SMART realizado por meio de cruzamentos experimentais entre os machos da linhagem *mwh* com fêmeas da linhagem *flr³*, cruzamento padrão (ST), verificou-se que o extrato etanólico dos frutos e cascas do caule nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 não foram genotóxicos, pois as frequências de mutações por indivíduo não diferem das encontradas no controle negativo, visto que as frequências de mutações por indivíduos no controle foram de 0,73 e nos grupos tratados variou de 0,4 a 1,10. Porém os extratos apresentaram atividades citotóxicas na concentração de 4,0 mg/mL, já que as larvas desenvolveram-se até o estágio de pupa, e a maioria delas morreram sem atingir a fase adulta (tabela 1).

Tabela 1. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST) após tratamento crônico com extrato etanólico da casca do caule (EEC), dos frutos (EEF) obtidos de *P. tubulosus*.

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2		MSG (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5		MG <i>m</i> = 5		TM <i>m</i> = 2		
<i>ST</i> <i>mwh/flr³</i>										
Contr. Neg.	30	0,60	(18)	0,07	(02)	0,07	(02)	0,73	(22)	22
DXR(0,125)	40	3,17	(127)	2,22	(89)	3,27	(131)	8,67	(347)	347
EEC (0,5)	30	0,37	(11) -	0,13	(04) i	0,07	(02) i	0,57	(17) -	17
EEC (1,0)	30	0,37	(11) -	0,30	(09) +	0,00	(00) i	0,67	(20) -	20
EEC (2,0)	30	0,30	(09) -	0,07	(02) i	0,03	(01) i	0,40	(12) -	12
EEC (4,0)	10	1,00	(10) i	0,10	(01) i	0,00	(00) i	1,10	(11) i	11
EEF (0,5)	20	0,45	(09) i	0,05	(01) i	0,00	(00) i	0,50	(10) i	10
EEF (1,0)	20	0,60	(12) i	0,00	(00) i	0,00	(00) i	0,60	(12) i	12
EEF (2,0)	20	0,55	(11) i	0,05	(01) i	0,00	(00) i	0,60	(12) i	12
EEF (4,0)	*									

D: Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. - m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Nível de significância $\alpha = \beta$ 0,05. ^a Incluindo manchas simples *flr³*; ^b MSP - Manchas simples pequenas, quando até 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^c MSG - Manchas simples grandes, quando mais de 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^d MG - Manchas gêmeas, quando possuir células *flr³* e *mwh* simultaneamente; ^e TM - Total de manchas.

Analisando-se os dados obtidos com os tratamentos realizados com os descendentes HB - cruzamento de alta bioativação (Tabela 2), verifica-se que as frequências de manchas mutantes obtidas nos grupos tratados com os extratos etanólicos das cascas do caule e dos frutos da *P. tubulosus* nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL, não apresentaram atividade genotóxica, pois o número de mutações por indivíduo expressas nos grupos tratados, não difere significativamente das obtidas no controle negativo, visto que as frequências de mutações por indivíduos no controle foram de 0,83 e nos grupos tratados variou de 0,37 a 0,95. Entretanto, na concentração de 4,0 mg/mL, ambos os extratos exerceram atividade citotóxica, pois os resultados foram similares aos obtidos no tratamento realizados com os descendentes ST.

Tabela 2. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* do cruzamento de alta bioativação (HB) após tratamento crônico com extrato etanólico da casca do caule (EEC), dos frutos (EEF) obtidos de *Pogonopus tubulosus*.

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2		MSG (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5		MG <i>m</i> = 5		TM <i>m</i> = 2		
<i>HB</i> <i>mwh/flr³</i>										
Contr. Neg.	30	0,73	(22)	0,07	(02)	0,03	(01)	0,83	(25)	25
DXR(0,125)	40	3,57	(143)	3,05	(122)	4,20	(168)	10,82	(433)	433
EEC (0,5)	30	0,30	(09) -	0,03	(01) i	0,03	(01) i	0,37	(11) -	11
EEC (1,0)	30	0,73	(22) -	0,07	(02) i	0,03	(01) i	0,83	(25) -	25
EEC (2,0)	30	0,43	(13) -	0,13	(04) i	0,03	(01) i	0,60	(18) -	18
EEC (4,0)	10	0,10	(01) -	0,00	(00) i	0,00	(00) i	0,10	(01) -	1
EEF (0,5)	20	0,80	(16) -	0,10	(02) i	0,00	(00) i	0,90	(18) -	18
EEF (1,0)	20	0,65	(13) -	0,05	(01) i	0,10	(02) i	0,80	(16) -	16
EEF (2,0)	20	0,85	(17) i	0,05	(01) i	0,05	(01) i	0,95	(19) -	19
EEF (4,0)	*									

D: Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. - m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Nível de significância $\alpha = \beta$ 0,05. ^a Incluindo manchas simples *flr³*; ^b MSP - Manchas simples pequenas, quando até 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^c MSG - Manchas simples grandes, quando mais de 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^d MG - Manchas gêmeas, quando possuir células *flr³* e *mwh* simultaneamente; ^e TM - Total de manchas.

Na tabela 3 encontram-se os resultados obtidos nos descendentes ST, tratados com as frações alcalóidica nas concentrações de 0,12; 0,25 e 0,50 e não alcalóidica nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/mL. Verifica-se que a fração não alcalóidica não apresentou atividade genotóxica, pois o número de mutações expressas por indivíduo, não difere significativamente das obtidas no controle negativo, uma vez que as frequências de mutações por indivíduos no controle foram de 0,33 e nos grupos tratados variou de 0,57 a 0,63. Porém na concentração 4,0 mg/mL mostrou ser citotóxica, visto que, todas as larvas morreram. Verificou-se que no tratamento com a fração alcalóidica, todas as concentrações foram citotóxica, já que não houve desenvolvimento das larvas.

Tabela 3. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST) após tratamento crônico com a fração não alcalóidica (FN) e alcalóidica (FA) obtidos de *Pogonopus tubulosus*.

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a				Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2	MSG (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5	MG <i>m</i> = 5	TM <i>m</i> = 2	
<i>ST</i> <i>mwh/flr³</i>						
Contr. Neg.	30	0,27 (08)	0,03 (01)	0,03 (01)	0,33 (10)	10
DXR(0,125)	40	3,57 (143)	3,05 (122)	4,20 (168)	10,82 (433)	433
FN (0,5)	30	0,47 (14) i	0,10 (03) i	0,07 (02) i	0,63 (19) i	19
FN (1,0)	30	0,50 (15) i	0,10 (03) i	0,03 (01) i	0,63 (19) i	19
FN (2,0)	30	0,40 (12) i	0,10 (03) i	0,07 (02) i	0,57 (17) i	17
FN (4,0)	*					
FA (0,12)	*					
FA (0,25)	*					
FA (0,50)	*					

D: Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. - m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Nível de significância $\alpha = \beta$ 0,05. ^a Incluindo manchas simples *flr³*; ^b MSP - Manchas simples pequenas, quando até 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^c MSG - Manchas simples grandes, quando mais de 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^d MG - Manchas gêmeas, quando possuir células *flr³* e *mwh* simultaneamente; ^e TM – Total de manchas.

Analisando-se os dados apresentados na tabela 4, nota-se que os resultados obtidos nos descendentes HB tratados com a fração não alcaloídica na concentração 0,5 mg/mL diferem significativamente dos resultados obtidos no controle negativo, visto que a frequência de mutações observadas no grupo tratado é duas vezes maior do que a observada no controle negativo. Sendo assim, então o diagnóstico foi positivo (+), de acordo com Frei e Wurgler (1988). Nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg/mL os resultados estatísticos foram negativo ou inconclusivo, pois a maioria dos indivíduos morreram devido à toxicidade da fração não alcaloídica.

O tratamento com a fração alcaloídica nos descendentes HB apresentou atividade citotóxica em todas as concentrações, resultado similar ao encontrado nos descendentes ST.

Tabela 4. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (*mwh/flr³*) de *D. melanogaster* do cruzamento de alta bioativação (HB) após tratamento crônico com a fração não alcaloídica (FN) e alcaloídica (FA) obtidos de *Pogonopus tubulosus*.

Genótipos e Conc. (mg/mL)	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo (no. de manchas) diag. estatístico ^a								Total manchas <i>mwh</i> ^c (n)
		MSP (1-2 céls) ^b <i>m</i> = 2		MSG (>2 céls) ^b <i>m</i> = 5		MG <i>m</i> = 5		TM <i>m</i> = 2		
<i>HB</i> <i>mwh/flr³</i>										
Contr. Neg.	40	0,35	(14)	0,05	(02)	0,03	(01)	0,43	(17)	17
DXR(0,125)	40	3,57	(143)	3,05	(122)	4,20	(168)	10,82	(433)	433
FN (0,5)	20	0,90	(18) +	0,10	(02) i	0,00	(00) i	1,00	(20) +	20
FN (1,0)	15	0,33	(05) i	0,00	(00) i	0,00	(00) i	0,33	(05) -	5
FN (2,0)	10	0,50	(05) i	0,00	(00) i	0,10	(01) i	0,60	(06) i	6
FN (4,0)	*									
FA (0,12)	*									
FA (0,25)	*									
FA (0,50)	*									

D: Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. - m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Nível de significância $\alpha = \beta$ 0,05. ^a Incluindo manchas simples *flr³*; ^b MSP - Manchas simples pequenas, quando até 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^c MSG - Manchas simples grandes, quando mais de 2 células afetadas com até 3 células de distância; ^d MG - Manchas gêmeas, quando possuir células *flr³* e *mwh* simultaneamente; ^e TM – Total de manchas.

4. DISCUSSÃO

Há poucos relatos na literatura sobre a atividade citotóxica e genotóxica de extratos e de metabólitos secundários obtidos de plantas da família Rubiaceae, especialmente as do gênero *Pogonopus*, este é o primeiro estudo que avalia a atividade genotóxica e citotóxica de extratos, fração não alcaloídica e alcaloídica obtidos da espécie *P. tubulosus*.

Analisando-se os dados obtidos com os tratamentos feitos a partir dos extratos etanólicos da casca e do fruto de *P. tubulosus* nos descendentes ST e HB (Tabelas 1 e 2). Verifica-se que nas concentrações menores os extratos etanólicos desta planta não apresentam atividades genotóxica, mas em concentrações mais elevadas são citotóxicos. Resultados semelhantes foram encontrados por Fernandes (2011) quando investigou a atividade genotóxica e citotóxica de extratos aquosos de raízes de *Galianthe thalictroides*, planta da mesma família da *P. tubulosus*, utilizando o teste SMART.

Apesar do uso popular, pouco é conhecido sobre a atividade genotóxica e citotóxica de extratos e metabólitos secundários obtidos de plantas do gênero *Pogonopus*. O gênero mais estudado da família Rubiaceae é o *Uncaria*, com destaque para a *Uncaria tomentosa*. Extratos aquosos desta planta não apresentaram atividade citotóxica em células de ovário de *hamster* chinês (SANTA MARIA et al., 1997)

Os dados obtidos com os tratamentos feitos com a fração não alcaloídica de *P. tubulosus* realizados com os descendentes ST e HB de *D. melanogaster* (Tabelas 3 e 4), demonstraram que a fração não alcaloídica na linhagem HB foi genotóxica na concentração (0,5 mg/mL); nas concentrações 1,0 e 2,0 mg/mL os resultados obtidos foram estatisticamente negativos ou inconclusivos para genotoxicidade. Estes resultados podem ser atribuídos ao menor número de indivíduos analisados, uma vez que mais de 70% dos descendentes morreram após o tratamento, então, provavelmente só restaram os indivíduos menos suscetíveis de sofrer danos no material genético. A concentração de 4,0 mg/mL foi citotóxica nas linhagens ST e HB. A fração alcaloídica foi citotóxica em todas as concentrações avaliadas nas duas linhagens (ST e HB), a atividade citotóxica pode ser atribuída, aos alcaloides presentes na fração alcaloídica, já que os mesmos inibem a síntese proteica.

Em estudo fitoquímico realizado com a fração alcaloídica da casca de *P. tubulosus* foram isolados alcaloides análogo a emetina, cefalina e tubolosine, apresentando alta atividade citotóxica. A fração alcaloídica apresentou citotoxicidade elevada frente a duas

linhagens de células tumorais de melanoma murino (B16-F10) e mama humana (MCF-7), com IC₅₀ (índice médio de sobrevivência) menor do que o observado para cisplatina e foi ativa contra a linhagem celular de carcinoma de laringe (HEp-2) (GARCEZ, Comunicação pessoal).

A atividade citotóxica pode estar relacionada ao modo de ação dos alcaloides isoquinolínicos (emetina, cefalina e tubulosine) que são inibidores de síntese proteica (GUPTA; SIMINOVITCH, 1977)

Sauvain e colaboradores (1996) realizaram estudo fitoquímico do extrato da casca do caule de *P. tubulosus*, na tentativa de encontrar novos produtos antimaláricos. A partir deste extrato foram identificados alcaloides com atividade antimalárica. Contudo o alcaloide tubulosine, o principal componente antimalárico isolado a partir desta espécie, apresenta pouco interesse no tratamento curativo da malária devido apresentar atividade citotóxica. Isso mostra a necessidade de novos estudos para comprovar as atividade biológicas, genotóxica e/ou citotóxicas das plantas que são utilizadas como medicamento para tratamento, cura e prevenção de doenças, para que possam ser selecionadas as plantas com maior valor medicinal e menos efeitos colaterais.

De acordo com Deene e Hussain (1991), alcaloides do gênero *Nauclea* (Rubiaceae), os quais são formados principalmente por indol e seus derivados glicosilados, podem ser os responsáveis por várias atividades biológicas, incluindo atividade antimalária e analgésica entre outras.

Os alcaloides são uma das principais classes de compostos que possuem atividade antimalárica (SAXENA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2009). Uma das mais antigas e mais importantes drogas antimaláricas é a quinina, um alcaloide que foi isolado por cientistas franceses (PELLETIER; CAVENTOU 1920, apud OLIVEIRA et al, 2009) a partir da casca da *Cinchona spp.* (Rubiaceae).

Metabólitos secundários obtidos de plantas com atividade citotóxica e genotóxica, tais como os alcaloides, são utilizados para tratamento e prevenção de várias doenças, inclusive para o tratamento da malária (OLIVEIRA et al., 2009). No entanto são necessários estudos que comprovem a eficácia desses metabólitos secundários, para que não ocorra risco à saúde.

Garcez, F. R. Comunicação pessoal. 2012. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Departamento de Química – Campo Grande/MS).

De acordo com Kitajima (2007) a camptotecina usada no tratamento do câncer, também tem sido obtida de algumas espécies de Rubiaceae. Esta constatação acentua a importância das Rubiaceas como fonte de protótipos para substâncias anticâncer, além de serem possíveis fontes de uma grande variedade de alcaloides e outros compostos, os quais podem ser dotados de bioatividades como é o caso dos alcaloides utilizados no tratamento da malária.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato etanólico dos frutos e cascas do caule nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 não foram genotóxicos nos descendentes ST e HB. Porém os extratos apresentaram atividades citotóxicas na concentração de 4,0 mg/mL em ambos os descendentes.

A fração não alcaloídica desta planta não apresentou atividade genotóxica nos descendentes ST nas concentrações mais baixas, no entanto na concentração de 4,0 mg/mL mostrou ser citotóxica, visto que, todas as larvas morreram.

A fração não alcaloídica na concentração de 0,5 mg/mL, apresentou atividade genotóxica nos descendentes HB, já que o resultado foi positivo, nas concentrações de 1,0 e 2,0 mg/mL, os resultados estatísticos foram negativo ou inconclusivo, pois a maioria dos indivíduos morreram devido à toxicidade desta fração.

No tratamento com a fração alcaloídica, todas as concentrações foram citotóxicas para os descendentes dos cruzamentos ST e HB.

Os resultados obtidos com o ensaio (SMART) corroboram o uso popular da planta *P. tubulosus* para o tratamento da malária, já que os extrato e a fração não alcaloídica em concentrações de 4,0 mg/mL e a fração alcaloídica em todas as concentrações foram citotóxicas. Certamente os protozoários causadores da malária, morrem após o tratamento com esta planta, devido à presença dos alcaloides, já que os mesmos inibem a síntese de proteína. Por isso é imprescindível os estudos químicos ou biológicos de plantas utilizadas como medicamento, para identificar seus constituintes úteis à saúde humana visando selecionar as plantas com maior valor medicinal e menos efeitos colaterais.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, v.221, n.4617, p.1256-1264, 1983.

DEENI, Y. Y.; HUSSAIN, H. S. N. Screening for antimicrobial activity and for alkaloids of *Nauclea latifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, p. 91–96, 1991.

DIAS, F. F. **Polinização de Quatro Espécies de Rubiaceae Ornitófilas na Serra de Maracajú**. Programa de Pós-Graduação em Ecologia & Conservação/CCBS. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande/MS, 2011. Disponível em: <<https://sistemas.ufms.br/sigpos/portal/trabalhos/download/.../cursold:1...>> Ultimo acesso 20 de setembro de 2012.

FERNANDES, L. M. **Avaliação da atividade genotóxica de extratos e do alcaloide indol-monoterpênico obtidos das raízes de *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae)**. Campo Grande-MS, 2011. [Dissertação – Faculdade de Medicina Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

FREI, H.; WURGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, n.203: p.297-308. 1988.

GRAF, U.; MORAGA, A. A.; CASTRO, R.; DIAS, C.E. Genotoxicity Testing of Different Types of Beverages in the *Drosophila* Wing Somatic Mutation and Recombination Test. Grã-Bretanha. **Elsevier Science**, v. 32, n.5, p. 423-430, 1994.

GRAF, U.; VAN SCHAİK, N. Improved high bio activations cross for the wing somatic mutations and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, Nova York, n. 271, p. 59-67, 1992.

GRAF, U.; WURGLER, F. E.; KATS, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B. E. e KALE, P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, Reston, v. 6, p. 153-188, 1984.

GUPTA, R. S.; SIMINOVITCH, L. The Molecular Basis of Emetine Resistance in Chinese Hamster Ovary Cells: Alteration in the 40s Ribosomal Subunit. **Cell**, v.10, p.61-66, 1977.

GUZMÁN-RINCÓN, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. In: Butterworth F.M. et al (eds). Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental changes. **Plenum Press**, Nova York, p.169-181, 1995.

KITAJIMA, M. Chemical Studies on monoterpenoid indole alkaloids from medicinal plant resources *Gelsemium* and *Ophirrhiza*. **Journal of Natural Medicine**, v.61, p. 14-23, 2007.

MARQUES, R. C. P., MEDEIROS, S. R. B., DIAS, C. S., BARBOSA-FILHO, J. M. & AGNES-LIMA, L. F. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. **Mutation Research**, v.536, p.117-120, 2003.

OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, F. M. BRAGA, F. C.; JÁCOME, R. L. R. P.; VAROTTI, F. P.; PÓVOA, M. M. Derivados de plantas antimaláricos: novas pistas e phythomedicines eficientes. Parte I. Alcalóides. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.81, n.4, 2009.

RODRIGUES, E. C.; DAVID NETO, L. Malaria control in an Amazon municipality. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto/SP, v.19, n.6, 2011.

SANTA MARIA, A. LOPEZ, A. DIAZ, M. M. ALBAN, J. GALAN DE MERA, A. VICENTE ORELLANA, J. A. POZUELO, J. M. Evaluation of the toxicity of *Uncaria Tomentosa* by bioassays in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, p.183–187, 1997.

SANTOS-CRUZ, L. F.; ÁVILA-ACEVEDO, J. G.; ORTEGA-CAPITAINE, D.; OJEDA-DUPLANCHER, J. C.; PERDIGÓN-MOYA, J. L.; HERNÁNDEZ-PORTILLA, L. B.; LÓPEZ-DIONICIO, H.; DURÁN-DÍAZ, A.; DUEÑAS-GARCÍA, I. E.; CASTAÑEDA-PARTIDA, L.; GARCÍA-BORES, A. M.; HERES-PULIDO, M. E. Verbascoside is not genotoxic in the ST and HB crosses of the *Drosophila* wing spot test, and its constituent, caffeic acid, decreases the spontaneous mutation rate in the ST cross. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p. 1082-1090, 2012.

SAUVAIN, M. ; MORETTI, C. ; BRAVO, J. A. ; CALLAPA. J. ; MUNOZ. V. ; RUIZ. E. ; RICHARD, B. ; LE MEN-OLIVIER L. Antimalarial activity of alkaloids from *Pogonopus tubulosus*. **Phytotherapy Research**, La Paz, Bolivia, v.10, p.198-201, 1996.

SAXENA, S.; PANT, N.; JAIN, D. C.; BHAKUNI, R. S. Agente Antimalárico a partir de fontes vegetais. Divisão de Química Medicinal Plant, Instituto Central de Plantas Mediciniais e Aromáticas, PO-CIMAP, Lucknow 226 015. 1314. **Current Science**, Índia, v.85, n.9, 2003.

SCHVINN, T. A.; SILVA, C. A. Florística e fenologia reprodutiva de espécies de Rubiaceae em um fragmento florestal de Tangará da Serra - MT In: Congresso de Iniciação Científica, 4ª. (JC), 2011, Cáceres/MT. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Cáceres/MT: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PRPPG, v.7, 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Rubiaceae em um remanescente de floresta Atlântica no Rio Grande do Norte, Brasil. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum. **Nova Odessa**, 640p. 2008.

TAYLOR, C. M.; CAMPOS, M. T. V. A.; ZAPPI, D. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. **Rodriguésia**, v.58, n.3, p.550, 551, 612, 2007.

TÉLLEZ, M. G. O.; RODRIGUEZ, H. B.; OLIVARES, G. Q.; SORTIBRÁN, A. N.C.; CETTO, A. A.; RODRÍGUEZ-ARNAIZ, R. A phytotherapeutic extract of *Equisetum myriochaetum* is not genotoxic either in the *in vivo* wing somatic test of *Drosophila* or in the *in vitro* human micronucleus test. **Journal of Ethnopharmacology**, México, n.111 p.182–189, 2007.

XU, G. J.; XU, L. S.; WANG, Z. T.; Species systematization and quality evaluation of commonly used chinese traditional drugs. South-China Edition. **Fujian Science And Technology Press**, Fuzhou, v.4, p.658, 1997.