



ARTIGO

Potencial mutagênico do chá de folhas e do suco de atemóia (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.) em células hematopoiéticas de ratos Wistar

David Teixeira Guidoti^{1*}, Daniela Granella Gomes Guidoti¹, Alessandra Paim Berti¹, Elisângela Düsman¹ e Veronica Elisa Pimenta Vicentini²

Available online at <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2547>

Recebido: 6 de março de 2013

Recebido após revisão: 25 de novembro de 2013

Aceito: 3 de março de 2014

RESUMO: (Potencial mutagênico do chá de folhas e do suco de atemóia (*Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L.) em células hematopoiéticas de ratos Wistar). A atemóia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*), pertencente à família Annonaceae, é amplamente utilizada na culinária, apresenta altos teores de água, potássio, magnésio, α e β -caroteno, vitaminas e minerais. O presente trabalho avaliou o potencial mutagênico do chá de folhas e do suco de atemóia. Foi utilizado como sistema teste células hematopoiéticas de ratos Wistar, *Rattus norvegicus*, tratados *in vivo* via gavagem, por tratamento agudo (24 horas). Os ratos foram divididos em dois grupos com seis animais cada, constituídos de três machos e três fêmeas por grupo. Esses animais foram tratados com: água (controle negativo), ciclofosfamida (controle positivo), chá das folhas de atemóia e suco da polpa de atemóia. Foram analisadas 100 metafases/animal, totalizando 600 metafases/grupo e o cálculo do índice mitótico feito de 5.000 células/sexo, totalizando 10.000 células/grupo. Os resultados obtidos foram comparados entre si e com os dos controles, pelo teste do qui-quadrado. Observou-se que não houve alteração significativa nos índices de divisão celular e no número de alterações cromossômicas em nenhum dos tratamentos utilizados. Portanto, neste tipo, tempo de tratamento e nestas concentrações testadas, a atemóia não mostrou efeito citotóxico e nem clastogênico no sistema teste empregado.

Palavras-chave: atemóia, citotoxicidade, clastogenicidade, ratos Wistar, planta medicinal.

ABSTRACT: (Mutagenic potential of atemoya (*Annona squamosa* Mill. x *Annona cherimola* L.) leaf tea and juice on hematopoietic cells of Wistar rats). Atemoya (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*) belonging to Annonaceae, is widely used in culinary, it contains high levels of water, potassium, magnesium, α and β -carotene, vitamins and minerals. The current research evaluated the mutagenic potential of atemoya leaf tea and juice. It was used as hematopoietic cells test system of Wistar rats, *Rattus norvegicus*, treated *in vivo* by way of gavage, through acute treatment (24 hours). The rats were divided into two groups of six animals each consisting of three males and three females per group. These animals were treated with: water (negative control), cyclophosphamide (positive control), atemoya leaves tea and atemoya pulp juice. A hundred metaphases/animal was analyzed, totaling 600 metaphases/group and the calculation of mitotic index was made from 5.000 cells/sex, totaling 10.000 cells/group. The obtained results were compared within them and with the control ones through chi-square test. It was observed that there was no significant change neither on the cell division rates nor on the number of chromosomal alterations in any of the treatments used. Therefore, on this type, treatment time and tested concentrations, atemoya did not demonstrate neither cytotoxic nor clastogenic effect on the test system employed.

Key words: atemoya, cytotoxicity, clastogenicity, Wistar rats, medicinal plant.

INTRODUÇÃO

A atemóia, pertencente à Annonaceae, é um fruto resultante do cruzamento entre a cherimóia (*Annona cherimola* Mill.) e a pinha (*Annona squamosa* L.), realizado inicialmente nos Estados Unidos (Pinto *et al.* 2005). A composição fitoquímica da atemóia inclui alto teor de carboidratos, proteína, fibras, potássio, magnésio, ácido ascórbico, α e β -caroteno (Morton 1987), cálcio e traços de lipídeos (NEPA 2006).

A maioria dos estudos fitoquímicos realizados envolvendo espécies de Annonaceae diziam respeito aos alcaloides (Rupprecht *et al.* 1990, Fang *et al.* 1993). No entanto, a partir da década de 80, as pesquisas tomaram novos rumos devido ao isolamento de uma nova classe de substâncias bioativas conhecidas como acetogeninas de anonáceas (Rupprecht *et al.* 1990).

As acetogeninas de Annonaceae são metabólitos se-

cundários obtidos pela via do ácido acético, derivados de ácidos graxos de cadeia longa, contendo de 35 a 39 átomos de carbono (Alali 1999). Essas substâncias têm despertado o interesse de pesquisadores indicando ser um potente agente anticâncer (Alfonso *et al.* 1996).

As pesquisas de genotoxicidade com plantas têm crescido juntamente com o uso terapêutico das mesmas, tendo o objetivo de avaliar a eficácia das plantas quanto às propriedades farmacológicas. Isso se deve ao fato de que muitas plantas, apesar de possuírem efeitos benéficos, podem também causar alterações no material genético (Varanda 2006).

O estudo das plantas medicinais torna-se válido por dois motivos: como uma medida de segurança para o uso popular e para a descoberta de substâncias que tenham efeito quimioterapêutico (Elgorashi *et al.* 2003, Arora *et al.* 2005).

1. Doutorando do Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá. Avenida Colombo nº 5790, Jardim Universitário, Bloco H67, Sala 15, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

2. Docente do Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, PR, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: davidguidoti@live.com

O teste de aberrações cromossômicas é um bom parâmetro de mutagenicidade (Leonard *et al.* 1982). A medula óssea de mamíferos constitui uma ótima ferramenta em estudos de alterações cromossômicas por conter uma grande população de células em divisão com um ciclo celular que se completa entre vinte e duas e vinte e quatro horas (Rabello-Gay *et al.* 1991).

Considerando as propriedades benéficas descritas para atemóia e a ausência de estudos que avaliem a possível ação tóxica dessa planta, largamente utilizada pela população, o presente trabalho teve por objetivo verificar, por meio de análise citogenética, os efeitos tóxicos, em nível celular, e clastogênico, em nível cromossômico, do suco da polpa e do chá de folhas dessa planta, empregando como sistema teste, células de medula óssea de ratos Wistar, *Rattus norvegicus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

As folhas e o fruto de atemóia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*) foram provenientes da CEAGESP - Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo, sem indícios de apodrecimento ou lesão.

Na literatura popular, a indicação para consumo diário pelo homem é de um fruto, sem sementes (em torno de 380 g/1000 mL de água) e quanto ao chá, segundo Navarro *et al.* (2008), a proporção é de 8g de folhas secas/1000 mL de água. Ambas indicações são para o uso da graviola (*Annona muricata*), porém, no presente trabalho, essas concentrações foram utilizadas para ensaio com atemóia.

Para o cálculo das concentrações levou-se em consideração o peso corpóreo (p.c.) de um homem de 70 Kg e um rato de 100 g. Para o suco, foi utilizada 114 g de polpa de atemóia/300 mL de água para o homem, extrapolando para os ratos, a quantidade foi de 0,19 g/0,5 mL de água; para o chá, foi utilizado 1,28 g de folhas de atemóia/160 mL de água, extrapolando para os ratos, a quantidade foi de 0,004 g/0,5 mL de água.

A administração nos ratos foi de forma aguda (única), sendo adotada a concentração equivalente a um copo de 300 mL para o suco e uma xícara de 160 mL para o chá, correspondendo aos valores mencionados acima para administração nos ratos.

O chá foi preparado utilizando 0,4 g de folhas de atemóia, secas em estufa, diluídas em 50 mL de água potável, até levantar fervura, deixando esfriar sobre a bancada até alcançar a temperatura ambiente, e coado em filtro de papel. O suco foi preparado com 19 g de polpa de atemóia, batido em liquidificador, em 50 mL de água potável, em temperatura ambiente.

Tratamento

Para cada tratamento, foram utilizados seis ratos Wistar, para cada grupo controle, sendo três machos e três fêmeas. Os animais procederam do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, UEM/PR, com

aproximadamente 100 g de peso corpóreo (p.c.).

Foram administrados, via gavagem, 0,5 mL de chá de folhas de atemóia/100 g p.c., no primeiro grupo e 0,5 mL de suco de atemóia/100 g p.c., no segundo grupo, em tratamento agudo, em dose única, por vinte e quatro horas.

Para o controle positivo foi administrado o agente clastogênico ciclofosfamida, na concentração de 1,5 mg/mL de água/100 g p.c., via intraperitoneal (i.p.), por 24 horas. O controle negativo foi feito com 1 mL de água/100 g p.c., aplicado via gavagem, por 24 horas.

Os ratos ficaram em caixas separadas, sendo que a água e a ração foram trocadas diariamente e administradas *ad libitum*. Foi injetado nos animais 0,5 mL/100 g p.c. de colchicina na concentração de 0,16% uma hora e meia antes do sacrifício.

Preparação citológica

A técnica utilizada para a obtenção das células da medula óssea de ratos foi baseada na técnica de Ford & Hamerton (1956).

Após o tempo de tratamento e aplicação da colchicina, os animais foram sacrificados. Em seguida, foram retirados os fêmures e suas epífises proximais cortadas.

A medula óssea foi retirada introduzindo no canal medular uma agulha com seringa contendo 5 mL de solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) 0,075M a 37 °C. A suspensão foi deixada em estufa durante 12 minutos a 37 °C.

Passado esse tempo, o material foi centrifugado por 5 min a 800 rpm e o sobrenadante foi descartado. Para a fixação do material foi adicionado ao tubo 5 mL de fixador na proporção 3:1 metanol/ácido acético.

Em seguida, a amostra foi submetida à centrifugação por 5 min a 800 rpm e após esse tempo, ressuspendida em 5 mL de fixador, e centrifugada novamente sob as mesmas condições.

No preparo das lâminas, o método utilizado foi o de espalhamento, pingando algumas gotas da suspensão em lâminas limpas e geladas, contendo um filme de água destilada, mantidas inclinadas com a finalidade de promover o espalhamento do material e rapidamente flambadas para fixação.

A coloração das lâminas foi feita com solução de Giemsa diluído em tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e KH_2PO_4) 0,06 M e pH 6,8 na proporção de 1:30. Após o período de 12 min, as lâminas foram lavadas em água corrente e colocadas para secagem ao ar.

Análise das lâminas

Foi calculado o Índice Mitótico (IM) de 5.000 células por sexo, totalizando 10.000 células por grupo da seguinte forma: $\text{IM} (\%) = (\text{n}^\circ \text{ de células em divisão} / \text{Total de células presentes nos campos}) \times 100$.

Foram analisadas 100 metáfases por animal (fêmeas e machos), contabilizando 300 metáfases por sexo (três machos e três fêmeas), totalizando 600 metáfases por grupo.

Foram preparadas 5 lâminas/animal e a análise das mesmas realizada em microscópio óptico, com aumento

final de 1000 vezes. Foi avaliado também, o aparecimento de alterações como: *gap*, quebra cromatídica (ct), quebra cromossômica (cr), fragmento acêntrico, *minute* e *double minute*.

O cálculo estatístico utilizado foi o teste do qui-quadrado ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas são conhecidas por conterem uma infinidade de compostos que podem apresentar propriedades benéficas ou desencadear efeitos indesejáveis no nosso organismo, como a potencialização da taxa de mutações.

Após os tratamentos com as duas formas de preparo (chá e suco) de *Atemóia*, foi verificado que não houve ação citotóxica nesse sistema teste. As formas de preparo testadas e suas respectivas concentrações também não causaram efeito clastogênico nesse tipo, tempo e forma de tratamento, como mostra a tabela 1.

A análise estatística mostrou a ausência de efeito citotóxico e clastogênico das preparações de *Atemóia*, com valores menores, estatisticamente significativos, que o controle positivo, sendo que o suco apresentou o mesmo percentual de alterações que o controle negativo.

É importante a descoberta de agentes mutagênicos, suas consequências para os seres vivos e seu mecanismo de ação, assim como, a compreensão de como as células modulam esses processos, podendo levar à diminuição ou ao aumento dos danos genéticos (Ribeiro & Marques 2003).

A ausência de atividade mutagênica tem sido descrita para outras espécies de *Annona* como o extrato etanólico de *Annona crassiflora* (araticum) em teste de micronúcleo em camundongos. Observou-se que todas as doses testadas não aumentaram significativamente o número de eritrócitos policromáticos micronucleados em relação ao grupo controle, não exercendo atividade mutagênica, mas atuando de forma antimutagênica, com exceção da dose de 10 mg/kg co-administrada com 4 mg/kg de mitomicina C (Vilar *et al.* 2008).

A atividade antígeno-tóxica do extrato de *A. muricata* puro e associado à doxorubicina foi demonstrada pelo ensaio de detecção de mutação e recombinação somática em asas de *Drosophila melanogaster*. A atividade antígeno-tóxica foi sugerida ao verificar uma redução signifi-

ficativa de manchas, quando associada à doxorubicina (Garcia & Nepomuceno 2011).

Esses resultados obtidos podem ser explicados pela presença de um grupo de metabólitos secundários bioativos, as acetogeninas, presentes em espécies de Annonaceae (Fang *et al.* 1993, Landolt *et al.* 1995), e têm atraído consideravelmente a atenção devido sua estrutura especial e ampla atividade biológica (Jolad *et al.* 1982), como pesticida, citotóxica, antimalária e antitumoral (Fang *et al.* 1993, Zafra-Polo *et al.* 1998).

Ensaio adicionais de citotoxicidade têm sido realizados, mostrando que, embora a maioria das acetogeninas possuam atividade entre diversos tipos de linhagens tumorais humanas, algumas delas mostram notável seletividade para certas linhagens celulares, como o observado no experimento de Pardhasaradhi *et al.* (2005), onde o extrato aquoso e orgânico obtidos de sementes de *Annona squamosa* induziram à apoptose apenas as linhagens celulares tumorais humanas MCF-7 e K-562, não apresentando esse efeito para as células Colo-205, o que representa uma vantagem no uso dessas substâncias por atuarem de forma célula-específica.

Os resultados obtidos no presente trabalho podem ser explicados, em parte, pela presença, na polpa, de α -caroteno e de β -caroteno (Morton 1987), considerados supressores da formação de tumor, atuando na paralisação do ciclo de multiplicação celular, podendo desempenhar um papel importante na prevenção do câncer (Murakoshi *et al.* 1992) e acetogeninas na folha, conforme isolamento realizado por Nascimento *et al.* (2003), que descreveram a ocorrência de uvariamicina, solamina e gonioenina, descritas em outros membros de Annonaceae, mas pela primeira vez relatadas em *Rollinia laurifolia* (Annonaceae).

A ausência de efeitos clastogênicos e citotóxicos do chá e do suco de *Atemóia*, em células hematopoiéticas de ratos Wistar, verificada no presente estudo, pode representar mais um aspecto positivo para a recomendação da inclusão desta planta na dieta humana e seu uso seguro como fitoterápico e/ou aliado em tratamentos quimioterápicos.

Estes resultados podem ser indicativos para a realização de novos experimentos a fim de avaliar a ação antimutagênica do chá e do suco e com isso, descrever novas propriedades medicinais.

Tabela 1. Índices mitóticos (IM) e porcentagens de alterações cromossômicas, obtidos para os diferentes grupos, controles e tratados, de ratos Wistar.

Grupos (mg/mL)	IM	Alterações (%)	<i>Gap</i>	Quebras	Fragmentos acêntricos	<i>Minute</i>	<i>Double Minute</i>
Co+ (1,5 mg/mL)	1,08	128 (21,30)	29 ct e 04 cr	16 ct e 14 cr	20	30	15
Co- (1 mL)	1,40	02 (0,33)	-	02 ct	-	-	-
Chá	1,40	04 (0,66)	-	04 ct	-	-	-
Suco	1,42	02 (0,33)	-	01 ct	-	-	-

Abreviaturas: Co+, controle positivo com ciclofosfamida; Co-, controle negativo com água; Chá, 1,28 g de folhas; Suco, 0,19 g de polpa; cr, cromossômica; ct, cromatídica.

REFERENCIAS

- ALALI, F.Q. 1999. Annonaceous acetogenins: recent progress. *Journal of Natural Products*, 62: 504-540.
- ALFONSO, D., COLMAN-SAIZARBITORIA, T., ZHAO, G.X., SHI, G., YE, Q., SCHWEDLER, J.T. & MCLAUGHLIN, J.L. 1996. Aromin and aromicin, two new bioactive annonaceous acetogenin, possessing an unusual bis-thf ring structure, from *Xylopiya aromatica* (Annonaceae). *Tetrahedron*, 52: 4215-4224.
- ARORA, S., BRITS, E., KAUR, K., SOHI, R.S., KUMAR, S. & VERSCHAEVE, L. 2005. Evaluation of genotoxicity of medicinal plant extracts by the comet and Vitotox (R) tests. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 24: 193-200.
- 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.
- FANG, X.P., RIESER, M.J., GU, Z.M., ZHAO, G.X. & MCLAUGHLIN, J.L. 1993. Annonaceous acetogenins: an updated review. *Phytochemical Analysis*, 4: 49-67.
- FORD, C.F. & HAMERTON, J.L. 1956. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosome. *Stain Technical*, 31: 247-251.
- GARCIA, T.A. & 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*. *Perquirere*, 8: 70-80.
- JOLAD, S.D., HOFFMANN, J.J., SCHRAM, K.H. & COLE, JR. 1982. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). *Journal of Organic Chemistry*, 47: 3151-3153.
- LANDOLT, J.L., AHAMMADSAHIB, K.I., HOLLINGWORTH, R.M., BARR, R., CRANE, F.L., BUERCK, N.L., MCCABE, G.P. & MCLAUGHLIN, J.L. 1995. Determination of structure-activity relationships of *Annonaceous acetogenins* by inhibition of oxygen uptake in rat liver mitochondria. *Chemico-Biological Interactions*, 98: 1-13.
- LEONARD, A., FABRY, L., DEKNUDT, G. & DECAT, G. 1982. Chromosome aberrations as a measure of mutagenesis: cytogenetic extrapolation from animal to man. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 33: 107-113.
- MORTON, J. 1987. Atemoya. Fruits of warm climates. Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/atemoya.html>>. Acesso em: 26 fev. 2013.
- MURAKOSHI, M., NISHINO, H., SATOMI, Y., TAKAYASU, J., HASEGAWA, T., TOKUDA, H., IWASHIMA, A., OKUZUMI, J., OKABE, H., KITANO, H., IWASAKI, R. 1992. Potente preventive action of α -carotene against carcinogenesis: spontaneous liver carcinogenesis and promoting stage of lung and skin carcinogenesis in mice are suppressed more effectively by α -carotene than β -carotene. *Cancer Research*, 52: 6583-6587.
- NASCIMENTO, F.C., BOAVENTURA, M.A.D., ASSUNÇÃO, A.C.S. & PIMENTA, L.P.S. 2003. Acetogeninas de anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifolia*. *Química Nova*, 26: 319-322.
- NAVARRO, S.D., MAURO, M.O. & OLIVEIRA, R.J. 2008. Avaliação da atividade mutagênica antimutagênica da graviola pelo ensaio de *Allium cepa*. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética. Salvador, BA, Brasil, p. 141.
- NEPA - Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação, Universidade Estadual de Campinas. *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, versão 2*. 2006. Campinas: Flamboyant. 105 p.
- PARDHASARADHI, B.V.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.
- 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, UK. 284 p.
- RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A.L.R. & NETO, R.M. 1991. *Mutagenese, Teratogenese e Carcinogenese: Métodos e Critérios de Avaliação*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/ Revista Brasileira de Genética. 246 p.
- RIBEIRO, L.R. & MARQUES, E.K. A importância da Mutagenese Ambiental na Carcinogenese Humana. 2003. In: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F. & MARQUES, E.K. (orgs.) *Mutagenese Ambiental*. Canoas: Ulbra. 355 p.
- RUPPRECHT, J.K., HUI, Y.H. & MCLAUGHLIN, J.L. 1990. Annonaceous acetogenins: a review. *Journal of Natural Products*, 53: 237-278.
- VARANDA, E.A. 2006. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, Araraquara*, 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.
- ZAFRA-POLO, M.C., FIGADERE, B., GALLARDO, T., TORMO, JR. & CORTES, D. 1998. Natural acetogenins from Annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry*, 48: 1087-1117.