



PROSPECÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO ALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Antonia ovata* Pohl (*Loganiaceae*) E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO CARCINOGENÉTICO EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila melanogaster*

R. C. R. PEREIRA¹, M. P. O. RAMOS² e M. A. VASCONCELOS³

¹ Graduando em Engenharia Química - Centro Universitário de Patos de Minas

² Professora orientadora – docente no Centro Universitário de Patos de Minas

³ Professora coorientadora – docente no Centro Universitário de Patos de Minas

E-mail para contato: contatoraphaelpereira@gmail.com

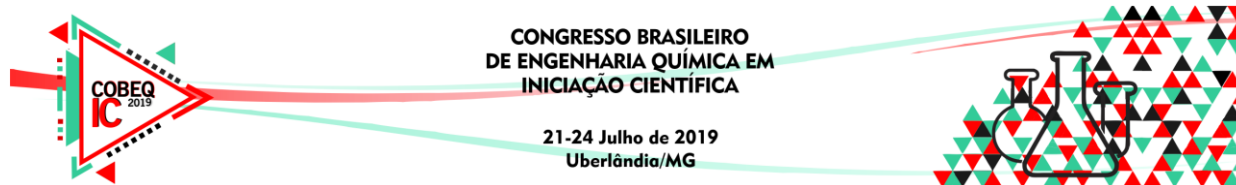
RESUMO - *Antonia ovata* pohl (*Loganiaceae*) é uma espécie encontrada no Cerrado brasileiro, sendo relevante devido a sua ação icotóxica. Objetiva-se avaliar a carcinogenicidade do extrato alcoólico das folhas da *A. ovata* em células somáticas de *Drosophila melanogaster* e fazer a sua prospecção química. Realizou-se o teste WTS em *D. melanogaster* provenientes do cruzamento de fêmeas WTS/TM3 com machos MWH/MWH, tratadas com os controles negativo (etanol - 5%), positivo (Doxorrubicina - 4mM) e concentrações do extrato (0,625; 1,25 e 2,5 mg/ml). A prospecção seguiu as metodologias: saponinas (espuma-agitação), flavonoides (fita de Mg), taninos (FeCl₃), cumarinas (UV), triterpenos e esteroides (Liebermann-Burchard). Constata-se que não houve diferenças significativas na frequência de tumores nas concentrações utilizadas, além da presença de flavonoides, saponinas, cumarinas, esteroides e taninos. Nas presentes condições, o extrato etanólico de *A. ovata* não induz formação de tumores em *D. melanogaster* devido à ação antioxidante dos flavonoides e taninos presentes.

1. INTRODUÇÃO

Devido à sua grande biodiversidade, a flora brasileira é considerada uma das mais ricas do mundo, com mais de 56.000 espécies, sendo 4.756 de Algas, 33.297 de Angiospermas, 1.571 de Briófitas, 5.719 de fungos, 29 de gimnospermas e 1361 de Samambaias e Licófitas. (FORZZA, 2019). Sabe-se que as plantas da família *Loganiaceae* são conhecidas pelo seu conteúdo de alcaloides e iridoides. Além disso, há apenas um representante dessa família que apresenta saponinas em seu conteúdo, o gênero denominado *Antonia ovata* Pohl. (MAGID *et al.*, 2010).

De acordo com Luitgards-Moura *et al.*, (2002), essa espécie é muito utilizada por comunidades indígenas na região de Roraima para a pesca, devido ação icotóxica nos peixes e seu estudo também comprova a ação inseticida da planta em *Lutzomyia longipalpis*.

Desta forma, analisando as propriedades deste vegetal e sua fácil aquisição, é relevante pesquisar o seu possível efeito carcinogênico em diferentes organismos modelos. Sendo assim, este trabalho objetiva avaliar o efeito carcinogênico do extrato alcoólico das folhas de *A. ovata* por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (WARTS) em células



somáticas de *Drosophila melanogaster*, determinando as principais classes de metabólitos presentes na planta.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Antonia ovata* Pohl

Proveniente da família *Loganiaceae*, o gênero *Antonia* possui diversas espécies, mas é a *Antonia ovata* Pohl uma das mais popularmente encontradas no Brasil, no Cerrado e nas Savanas de Roraima, onde é encontrada na forma de arbusto, de acordo com o estudo de Miranda e Absy (2000). Segundo estudo de Luitgards-Moura *et al.* (2002), *Antonia ovata* Pohl faz parte de um grupo de plantas conhecidas pelo seu efeito ictiotóxico, genericamente denominado de timbó. A utilização de plantas com essa propriedade é muito comum nas tribos indígenas da Amazônia, para fins pesqueiros. Seu uso, de acordo com Magid *et al.* (2010) é devido à presença saponinas em sua composição, metabólito que teve comprovação de seu efeito tóxico em peixes no estudo de Tabarelli e Bonoldi (1945).

2.2 *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster tem sido utilizada intensivamente para pesquisas de mutação e em testes de curto prazo para identificar carcinógenos. (Vogel *et al.*, 1999). Nepomuceno (2015) caracteriza a *D. melanogaster* como um modelo bem estabelecido para estudo genético pois tem uma geração curta de 10 dias a 25°C, seu caráter morfológico tem sido facilmente detectável, possui grande número de mutantes e variedades genéticas, os meios de cultura são baratos e simples e é capaz de ativar efeitos de mutação e carcinogênese *in vivo*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e Obtenção do Extrato das Folhas de *Antonia ovata* Pohl

O material vegetal foi coletado na região de Tabocas – MG em março de 2018, sendo posteriormente submetido à secagem em estufa de ar circulante a uma temperatura de 40°C por 48 horas até desidratação. A seguir o material foi triturado e submetido à extração com etanol absoluto por percolação durante alguns dias. Após isso, realizou-se a filtração do percolado e o etanol reduzido foi recuperado em rotaevaporador, obtendo-se o extrato etanólico de *A. ovata*.

3.2 WARTS (WTS) - Teste Para Detecção de Clones de Tumor Epitelial em *Drosophila melanogaster*

Para realização do teste WTS (WARTS) foram utilizadas duas linhagens mutantes de *D. melanogaster* (WTS e MWH) portadoras dos marcadores genéticos WARTS (WTS, 3-100) e *multiple wing hairs*, (3-03). O meio de cultura é composto por 820 mL de água, 25g de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*), 11 g de ágar, 156 g de banana e 1g de nipagin. Foram utilizadas larvas heterozigotas de 72 horas WTS+/-MWH tratadas com soluções de 5mL do extrato nas concentrações de 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL e 0,625 mg/mL.

Após o tratamento, as moscas adultas de pêlo longo foram analisadas para visualização e contagem da presença de tumores. As diferenças estatísticas entre as frequências de tumores das concentrações testadas e os controles, foram calculadas utilizando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney, empregando o nível de significância $\alpha=0,05$. Em todos os experimentos foram utilizados 25ml de água de osmose reversa como solvente para diluir 0,03538g de cloridrato de doxorrubicina, resultando em uma concentração de 0,4mM, sendo a DXR o controle positivo.

3.3 Caracterização química para identificação de metabólitos especiais

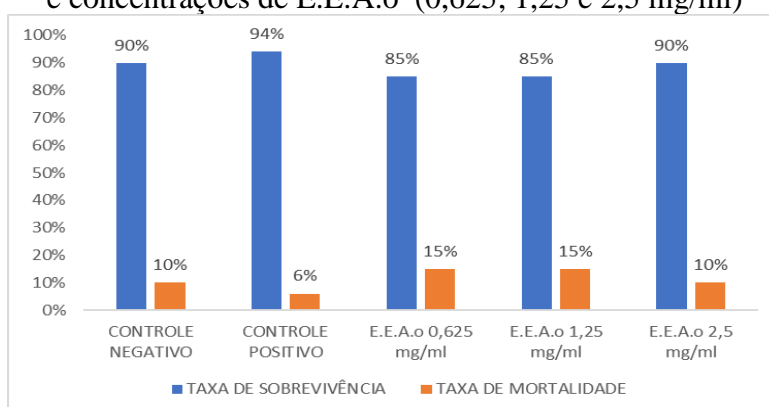
Os ensaios químicos para avaliar a presença de saponinas (espuma-agitação), flavonoides (reação com fita de magnésio), taninos (reação com cloreto férrico), cumarinas (observação sob UV) e triterpenos e esteroides (reação de Liebermann-Burchard) seguiram os métodos convencionais descritos por Nunes e Ribeiro (2017) e Pereira *et al.* (2017) por mudança de cor e/ou formação de precipitados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 WARTS (WTS) - Teste para Detecção de Clones de Tumor Epitelial em *Drosophila melanogaster*

Foi realizado teste de toxicidade do extrato das folhas de *A. ovata* nas concentrações de 0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL. A Figura 1 mostra que a taxa de mortalidade não foi superior à 15 %; desta forma, confirmando não toxicidade e assegurando a utilização destas concentrações.

Figura 1 – Taxas de mortalidade e sobrevivência de *D. melanogaster* expostas ao controle negativo (Etanol 5%), ao controle positivo (Doxorrubicina) e concentrações de E.E.A.o (0,625; 1,25 e 2,5 mg/ml)



Fonte: Dados da pesquisa, 2019.

Após a coleta das *D. melanogaster* sobreviventes e contagem para análise dos tumores epiteliais, foi elaborada a Tabela 1, que apresenta a frequência de tumores em cada parte do organismo analisada: olhos, cabeça, corpo, asas, pernas e halteres, além do total de tumores encontrados no controle positivo de Doxorrubicina (DXR - 0,4 mM) e negativo de Etanol 5%.



Tabela 1 - Frequência do clones tumores epiteliais observada em *D. melanogaster*, heterozigoto para o gene supressor de tumor *WTS*, tratadas isoladamente com os controles negativo (Etanol 5%), positivo (DXR 0,4mM) e concentrações do Extrato Etanólico de *A. ovata* (0,625; 1,25 e 2,5 mg/ml)

Tratamentos			Nº de moscas	Número de tumores analisados							Frequência (Nº de tumores/mosca)
E.E.A.o (mg/ml)	DXR (mM)	Etanol (%)		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter	Total	
0	0	5	150	15	7	46	65	20	6	158	1,06 (158)
0	0,4	0	150	20	165	745	375	286	80	1664	11,14 (1664)*
0,625	0	0	150	25	6	52	86	23	14	204	1,37 (204)
1,25	0	0	150	9	20	66	73	26	16	208	1,58 (208)
2,5	0	0	150	14	9	50	113	14	14	212	1,43 (212)

Diagnóstico estatístico de acordo com o teste de Mann-Whitney. Nível de significância $p \leq 0,05$.

* Valor considerado diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

A Tabela 1 mostra que houve diferenças significativas na frequência de tumores encontrada no controle positivo (DXR – 0,4 mM) se comparada ao negativo, o que se comprova pelo mecanismo de ação da Doxorrubicina, que segundo Kaiserová *et al.* (2006), induz o estresse oxidativo, formando espécies reativas de oxigênio, que causam danos a células cardíacas e neoplásicas, devido à fraca defesa antioxidante que as células possuem.

Sendo assim, a Tabela 1 mostra que o teste para detecção de tumores foi eficiente para identificar que não há potencial carcinogênico, pois não houve alteração significativa em relação ao número de tumores encontrados nas concentrações de 2,5; 1,25; e 0,625 mg/ml.

Portanto, verificou-se a necessidade de realizar testes de prospecção química do extrato, para a identificação de compostos que possam ter contribuído com a ausência de atividade carcinogênica.

4.2 Identificação de Metabólitos Especiais

Com base nos testes de identificação de metabólitos especiais, foi elaborada a Tabela 2, que apresenta os resultados obtidos nos testes para evidenciar a presença desses metabólitos, bem como as evidências de resultado positivo.

Tabela 2 – Metabólitos especiais nas folhas de *Antonia ovata Pohl*

Metabólito	Teste	Evidência	Resultado
Flavonoides	Shinoda	Mudança de cor (avermelhada)	++
Cumarinas	NaOH 10%	Fluorescência em luz UV ($\lambda \sim 365$ nm)	+
Cumarinas	KOH e Metanol	Fluorescência em luz UV ($\lambda \sim 365$ nm)	+
Triterpenos	Liebermann-Burchard	Mudança de cor (vermelho \rightarrow marrom)	-
Esteroides	Liebermann-Burchard	Mudança de cor (verde \rightarrow azul)	++
Taninos hidrolisáveis	$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 10%	Precipitado esbranquiçado	-
Taninos hidrolisáveis	FeCl_3 2%	Mudança de cor (azul)	-
Taninos condensados	FeCl_3 2%	Mudança de coloração (verde)	++
Saponinas	Teste de espuma	Formação de espuma	++

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Tendo em vista os resultados apresentados na Tabela 2, as folhas de *Antonia ovata Pohl* possuem flavonoides, cumarinas, esteroides, taninos condensados e saponinas. Nesse sentido, a presença de cumarinas, de acordo com Ruivo (2012), permite aplicações da planta na fitoquímica devido à sua atuação como antioxidante, inibição de agregação plaquetária e anti-inflamatória. Já os esteroides, segundo Queiroz (2009), podem ser aplicados no controle de colesterol, como método anticoncepcional e além de aplicações na cosmética e nutrição.

Segundo Ruivo (2012), os flavonoides são importantes para o aumento da resistência capilar, além de possuírem propriedades antioxidantes, calmantes, desenvolvendo ação anti-inflamatória e atuam como agentes antienvhecimento na cosmética. Além disso, conforme Castejon (2011), os taninos estão sendo atribuídos a atividades antibacterianas, reparação de tecidos e cicatrização de feridas, estimulação de células fagocíticas, e ação antioxidante.

Machado *et al.* (2008) relacionam as moléculas de radicais livres à ocorrência de tumores, fato que pode ser comprovado devido a capacidade destas moléculas atacarem as biomoléculas como o DNA. Neste contexto, os antioxidantes por serem compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de biomoléculas, como o DNA, evitam o início ou propagação das reações de oxidação em cadeia (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004) e a ocorrência de divisões celulares descontroladas, responsáveis pelos tumores.

Tendo em vista a presença significativa de flavonoides e taninos, sugere-se que esses metabólitos foram os mais impactantes nos resultados do Teste WTS em *Drosophila melanogaster*, devido a sua comprovada atuação antioxidante (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; PESSUTO *et al.* 2009).

5. CONCLUSÃO

A presença de flavonoides, saponinas, cumarinas, esteroides e taninos nas folhas de *Antonia ovata Pohl* torna o vegetal utilizável na indústria farmacêutica na aplicação em medicamentos e em produtos cosméticos.

No teste WTS em *Drosophila melanogaster*, não foi constatada atividade carcinogênica quando aplicadas as concentrações de 0,625; 1,25 e 2,5 mg/mL do extrato, fato este que pode estar relacionado à presença dos flavonoides e taninos encontrados em maior quantidade no extrato da planta.

São sugeridas pesquisas futuras em relação à atividade anticarcinogênica do extrato, com aplicação em organismos de forma associada a Doxorubicina (DXR – 0,4 mM).

6. REFERÊNCIAS

- CASTEJON, F.V. Taninos e Saponinas. 2011. 29 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*. v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.
- FORZZA, R. C. Flora do Brasil 2020 em construção. *Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 1 mar. 2019.
- KAISEROVÁ, H.; HARTOG, G. J. M. den; SIMUNEK, T.; SCHRÖTEROVÁ, L.; KVASNICKOVA, E.; BAST, A. Iron is not involved in oxidative stress-mediated

- cytotoxicity of doxorubicin and bleomycin. *British Journal Of Pharmacology*. p. 920-930, 2006.
- LUITGARDS-MOURA, J.F., BERMUDEZ, E. G. C., ROCHA, A. F. I. da; TSOURIS, P., ROSA-FREITAS, M.G. Preliminary assays indicate that *Antonia ovata* (Loganiaceae) and *Derris amazonica* (Papilionaceae), ichthyotoxic plants used for fishing in Roraima, Brazil, have an insecticide effect on *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, p.737-742, 2002.
- MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.
- MAGID, A., BOBICHON, H., LALUN, N., LONG, C., MORETTI, C., LAVAUD, C., Cytotoxic triterpenoid saponins from the stem bark of *Antonia ovata*. *Phytochemistry*. v. 71, p. 429-434, 2010.
- MIRANDA, I. S.; ABSY, M. L. Fisionomia das savanas de Roraima, Brasil. *Acta Amazônica*, Manaus, v. 3, n. 30, p.423-440, 2000.
- NEPOMUCENO, J. C. Using the *Drosophila melanogaster* to Assessment Carcinogenic Agents through the Test for Detection of Epithelial Tumor Clones (WARTS). *Advanced Techniques In da Biology & Medicine*. v.3, 149 p. 2015.
- NUNES, R. F.; RIBEIRO, K. P.; Identificação de metabólitos secundários e determinação de antocianinas e flavonoides totais em sementes de *Bixa orellana* L. (Urucum). In: XXII Jornada em Engenharia Química. Anais. Uberlândia: Peteq, 2017. p. 107 - 110.
- PEREIRA, R. C. R. *et al.* Produção de pomada cicatrizante à base do extrato glicólico de cladódios da Pitaia Vermelha (*Hylocereus undatus*). In: XXII Jornada em Engenharia Química. Anais. Uberlândia: Peteq, 2017. p. 320 - 326.
- PESSUTO, M. B. *et al.* Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 2, p.412-416, 26 jan. 2009.
- QUEIROZ, G. S. Análise de Esteroides em Extratos Vegetais e Estudo Fitoquímico e Biológico Preliminar de *Brunfelsia uniflora*. Relatório de Estágio - Curso de Química, Departamento de Química, Ufsc, Florianópolis, 56 f., 2009.
- RUIVO, J. S. P. Fitocosmética: aplicação de extratos vegetais em cosmética e dermatologia. Mestrado - Curso de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 96 f., 2012.
- TABARELLI, N. J. F.; BONOLDI, V. Da ação da saponina sobre peixes: *Guarus (Poecilia sp.)* e *Acarás (Geophagus sp.)*. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária*, v. 3, n. 1, p.19-26, dez. 1945.
- VOGEL, E. W.; GRAF, U.; FREI, H. J.; NIVARD, M. M. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC Sci Publ* 146: 427- 470, 1999.