



## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DE GARCINIELLIPTONA FC, UM PRODUTO ISOLADO DE *PLATONIA INSIGNIS* MART.

Déborah Goulart Silveira<sup>1</sup>  
Graciela da Costa Gonçalves<sup>2</sup>  
Lismare da Silva Prado<sup>3</sup>  
Jaqueline Nascimento Picada<sup>4</sup>

### Resumo

A substância Garcinielliptona FC (GFC) é uma benzofenona poliprenilada inédita no gênero *Platonia*, isolada do extrato hexânico das sementes da *Platonia insignis*. A garcineolleptona apresentou resultados satisfatórios como antioxidante (teste *in vitro* e *in vivo*), anticonvulsivante (modelo animal), leishmanicida, antitumoral (cultura celular) e vasorelaxante (modelo animal). Mas sua citotoxicidade e genotoxicidade ainda é questionável, pois os estudos até agora apresentados não analisaram profundamente a segurança do uso da GFC, não tendo assim um perfil toxicológico bem definido, como se é exigido para o desenvolvimento de um novo ativo farmacológico. Com isso o objetivo deste estudo é avaliar as atividades genotóxicas e mutagênicas do isolado GFC extraído da planta *Platonia insignis in vivo*. Para avaliar a atividade genotóxica foi utilizado o teste cometa após tratamento subcrônico em camundongos. A atividade mutagênica foi avaliada pelo teste de micronúcleos em medula óssea dos mesmo animais. Os resultados encontrados foram que GFC não induziu danos ao DNA em sangue e córtex cerebral, mas em fígado houve um aumento significativo nos valores de ID e FD na dose 20 mg/kg, indicando hepatotoxicidade. Contudo GFC não aumentou a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos. As conclusões sugerem que GFC não apresenta atividade mutagênica, mas possui potencial genotóxico em tecidos específicos.

Palavras Chaves: Produto Natural; Toxicidade; Genotoxicidade;

### INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais tem sido muito explorado pela população em geral. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que cerca de 80% da população mundial fez o uso de algum tipo de erva na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total, pelo menos 30% deu-se por indicação médica. É bem provável que das cerca de 200.000 espécies vegetais que possam existir no Brasil, na opinião de alguns autores, pelo menos a metade pode ter alguma propriedade terapêutica útil à população, mas nem 1% dessas espécies com potencial foi motivo de estudos (TANG e HALLIWELL, 2010).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, etc, tem sido objeto de incessantes estudos, com ações farmacológicas já descritas.

<sup>1</sup> Aluna do Curso de Graduação em Psicologia – Bolsista CNPq – [deborahgoulart.psi@gmail.com](mailto:deborahgoulart.psi@gmail.com)

<sup>2</sup> Aluna do Curso de Graduação em Farmácia – Bolsista Fapergs [gracielaconstagoncalves@hotmail.com](mailto:gracielaconstagoncalves@hotmail.com)

<sup>3</sup> Aluna de Mestrado do Laboratório de Genética Toxicológica [lismareprado24@hotmail.com](mailto:lismareprado24@hotmail.com)

<sup>4</sup> Professora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à [jnpicada@gmail.com](mailto:jnpicada@gmail.com)

(CECHINEL FILHO e YUNES, 1998). Pesquisas atuais sobre plantas medicinais mostram uma faceta multicêntrica, onde são abordadas combinações botânicas, fitoquímicas, biológicas e de técnicas moleculares. As plantas medicinais continuam a mostrar um potencial enorme para o desenvolvimento de fármacos para várias doenças (BALUNAS et. al. 2005).

A substância Garcinielliptona FC (GFC) é uma benzofenona poliprenilada inédita no gênero *Platonia*, isolada do extrato hexânico das sementes da *Platonia insignis*. GFC modulou a atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) do hipocampo (COSTA JÚNIOR et al., 2012) e mostrou um possível efeito anticonvulsivante em ratos tratados com pilocarpina (DA SILVA et.al, 2014).

Garcinielliptona foi testada em várias linhagens de células tumorais, avaliando assim seu efeito citotóxico, mostrando resultados significativos em duas linhagens de células, NCI-H-292 e HEP-2, comparados com o controle (doxorubicina); no mesmo estudo foi verificado o seu efeito leishmanicida e que também se mostrou significativo, comparado com o controle (anfotericina-B) (COSTA JUNIOR et al., 2013). Contudo, sua citotoxicidade e genotoxicidade ainda é questionável, pois os estudos até agora apresentados não analisaram profundamente a segurança do uso da GFC, não tendo assim um perfil toxicológico bem definido, como se é exigido para o desenvolvimento de um novo ativo farmacológico. Com isso o objetivo deste estudo é avaliar as atividades genotóxicas e mutagênicas do isolado Garcinelliptona (GFC) extraído da planta *Platonia insignis*.

## **Metodologia:**

### *Teste Cometa*

Foi realizado tratamento subcrônico no Laboratório de Neurofarmacologia e Toxicologia Pré-Clínica, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Camundongos CF-1 machos foram divididos e tratados por 28 dias conforme o grupo: GFC (2, 10 e 20 mg/kg), salina, tween 5%. Após o tratamento, os animais foram eutanasiados e amostras de sangue, fígado e córtex foram coletadas para o teste cometa. O teste cometa foi realizado no Laboratório de Genética Toxicológica da ULBRA.

Foi utilizada a versão alcalina do teste cometa, descrito em TICE et al. (2000). Aliquotas de 10 µL das amostras foram misturadas com uma fina camada de agarose “low melting” 0,75% (95 µL) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%; estas lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise (2,5M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% DMSO na hora do uso), por no mínimo 1 hora até no máximo 72 horas a 4°C, para o rompimento das membranas celulares. As lâminas permaneceram em tampão alcalino (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH > 13) por 20 minutos e subsequentemente foi realizada a eletroforeses a 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 15 minutos em cuba de eletroforese de DNA. Após, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M, pH 7,5 e coradas com solução de prata. As lâminas foram contadas em microscópio ótico. Os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD) e submetidos à análise da variância de uma via (ANOVA) e complementados com o teste de Dunnett. Foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

### *Teste de micronúcleos*

O teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos realizou-se de acordo com os protocolos e recomendações internacionais já estabelecidas (MAVOURNIN et al., 1990). Removeram-se os fêmures dos camundongos sendo eles limpos e as duas extremidades cortadas; com o auxílio de uma agulha histológica extraiu-se a medula óssea sobre uma lâmina com uma gota de soro bovino fetal; depois de homogeneizada, realizou-se o esfregaço do material. Após a preparação do esfregaço, o material foi fixado com metanol por 10

minutos e corado com uma mistura de 10 mL de Giemsa e 90 mL de tampão fosfato (pH 5,8) por 5 minutos; em seguida as lâminas foram enxaguadas em água destilada deixando-as secar em temperatura ambiente. Inicialmente foi determinada uma relação entre os eritrócitos jovens (policromatófilos-EPC) e os maduros (normocromatófilos-ENC), em 1000 células eritróides de cada roedor. Esta relação evita a ocorrência de falso-negativos devido à falta de EPC. Juntamente foram contados 1000 EPCs por lâmina, sendo duas lâminas por animal, para avaliação de frequência de micronúcleos.

Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  DP e a significância estatística foi determinada pela análise de variância de uma via (ANOVA) complementada pelo Teste de Dunnett para comparações múltiplas. Em todas as comparações, foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$

## RESULTADO E DISCUSSÕES

O ensaio cometa foi utilizado para detectar efeitos genotóxicos medidos como danos no DNA, tais como quebras de cadeia simples e dupla, sítios álcali-lábil, e ligações cruzadas DNA-DNA e DNA-proteínas. GFC não apresentou efeitos genotóxicos no sangue e córtex cerebral (tabela 1), corroborando, assim, a falta de toxicidade sistêmica em doses mais baixas. A falta de efeitos genotóxicos no córtex cerebral está de acordo com os resultados dos testes comportamentais, em que o GFC não prejudicou a coordenação motora e relaxamento muscular no teste de rotarod ou locomoção geral no campo aberto (dados não mostrados). No entanto, o GFC a 20 mg / kg induziu danos ao DNA no fígado (Table 1), sugerindo uma sobrecarga hepática causada pelo acúmulo de administração repetitiva ou pela geração de produtos genotóxicos durante a biotransformação.

GFC é um benzofenona poliisoprenilada, e alguns efeitos tóxicos já têm sido atribuídas a benzofenonas. Em estudos de dose repetida, efeitos degenerativos foram observados no fígado de ratos, sugerindo que o fígado pode ser o alvo principal da toxicidade de benzofenonas (Anadón et al., 2009). Em um estudo realizado por Bardana et al. (1991), benzofenona foi administrada a ratos na sua dieta, a 20 mg / kg / dia durante 90 dias e 100 ou 500 mg / kg / dia durante 28 dias. Houve um aumento nos pesos absoluto e relativo do fígado, e o exame histopatológico mostrou alterações. Portanto, o efeito genotóxico mostrado na dose de GFC 20 mg / kg no ensaio do cometa neste estudo pode estar relacionada com a sua estrutura molecular.

Tabela 1: Ensaio cometa no sangue, fígado, e no córtex cerebral de camundongos tratados por 28 dias, com salina (0,9% NaCl), veículo (10% de Tween) e garcinielliptone FC (GFC). As amostras foram colhidas 24 horas após a última administração.

Tecido	Grupo	DI <sup>a</sup> (mean $\pm$ SD)	DF <sup>b</sup> (mean $\pm$ SD)
Sangue	Salina	4.0 $\pm$ 3.6	2.7 $\pm$ 2.3
	Veículo	3.0 $\pm$ 2.6	3.0 $\pm$ 2.6
	GFC 2 mg/kg	4.3 $\pm$ 3.1	3.0 $\pm$ 1.7
	GFC 10 mg/kg	3.0 $\pm$ 2.0	2.3 $\pm$ 1.5
	GFC 20 mg/kg	5.7 $\pm$ 4.5	4.7 $\pm$ 3.2
Fígado	Salina	2.2 $\pm$ 2.3	1.8 $\pm$ 2.2
	Veículo	2.8 $\pm$ 3.5	1.7 $\pm$ 1.9
	GFC 2 mg/kg	4.3 $\pm$ 4.1	2.7 $\pm$ 2.1
	GFC 10 mg/kg	4.5 $\pm$ 2.2	4.2 $\pm$ 2.1
	GFC 20 mg/kg	19.0 $\pm$ 10.8 ***	10.8 $\pm$ 7.0 **
Cortex	Salina	54.0 $\pm$ 11.5	50.7 $\pm$ 6.8

	Veículo	72.5 ± 19.2	57.0 ± 17.8
	GFC 2 mg/kg	72.7 ± 12.7	48.7 ± 17.6
	GFC 10 mg/kg	43.0 ± 9.0	37.0 ± 12.5
	GFC 20 mg/kg	57.7 ± 25.5	43.7 ± 11.5
CP <sup>c</sup>	-	210.3 ± 42.1***	91.0 ± 8.7***

N = 5 animais por grupo. DI: índice de Danos - pode variar de 0 (completamente intactas, 100 células x 0) a 400 (com dano máximo 100 x 4); DF (%): frequência de danos - foi calculada com base no número de células com cauda versus aquelas sem a cauda. CP: controle positivo: células do sangue periférico do grupo salina foram tratadas *ex vivo* com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,25 mM. Diferença significativa: \* p ≤ 0,05; \*\*\* p ≤ 0,001 (ANOVA, teste de Dunnett) em comparação com o grupo salina.

O teste do micronúcleo foi realizado no final dos procedimentos experimentais para detectar actividades clastogênicas e aneugênicas, que aumentam a frequência de micronúcleos e sugerem efeitos mutagênicos ao nível cromossômico (Mavournin et al., 1990). Como mostrado na Tabela 2, GFC não aumentou a frequência de micronúcleos na medula óssea, sugerindo que não possui efeitos mutagênicos.

Tabela 2. Avaliação da atividade mutagênica pela análise de micronúcleos em medula óssea de camundongos tratados 28 dias com solução salina (NaCl 0,9%), veículo (10% tween) ou garcinielliptone FC (GFC). As amostras foram colhidas 24 h horas após as últimas administrações.

Grupo	MNEPC <sup>a</sup> in 2,000 EPC	Ratio EPC/ENC <sup>b</sup>
	Média ± DP	Média ± DP
Salina	4.7 ± 2.7	1.2 ± 0.3
Veículo	3.8 ± 2.8	1.3 ± 0.4
GFC 2 mg/kg	4.2 ± 2.3	1.0 ± 0.3
GFC 10mg/kg	3.5 ± 1.6	1.0 ± 0.1
GFC 20 mg/kg	3.0 ± 2.4	0.9 ± 0.2
CP <sup>c</sup>	15.3 ± 2.5***	1.0 ± 0.1

N = 5 animais por grupo.

aMNPCE: micronúcleos em eritrócitos policromáticos.

bRatio PCE / NCE: relação eritrócitos policromáticos / monocromáticos.

CPC: ciclofosfamida 40 mg / kg (ip dose única).

\*\*\* P < 0,001, diferença estatisticamente significativa entre o grupo de solução salina (ANOVA. Dunnett's test).

## CONCLUSÕES

GFC não apresentou respostas mutagênicas na medula óssea e genotoxicidade no córtex cerebral e sangue após 28 dias de tratamento. A dose mais elevada (20 mg / kg) induziu danos ao DNA no tecido hepático, sugerindo hepatotoxicidade com esta dose. Considerando os efeitos toxicológicos de GFC encontradas, estudos adicionais que investigam possível indução de mutações pontuais e propriedades antitumorais desta droga são recomendados.

## REFERÊNCIAS

- ANADÓN, A. et. al. Toxicological evaluation of benzophenone. Scientific Opinion of the Panel on food contact materials, enzymes, flavourings and processing aids (CEF). **EFSA J.** p. 1-30, 2009.
- BALUNAS, Marcy J.; KINGHORN, A. Douglas. Drug discovery from medicinal plants. **Life sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.
- CECHINEL FILHO, Valdir; YUNES, Rosendo A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- DA COSTA JÚNIOR, Joaquim S. et al. Superoxide dismutase and catalase activities in rat hippocampus pretreated with garcinielliptone FC from *Platonia insignis*. **Pharmaceutical biology**, v. 50, n. 4, p. 453-457, 2012.
- COSTA JÚNIOR, Joaquim S. et al. Cytotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. **Natural product research**, v. 27, n. 4-5, p. 470-474, 2013.
- DA SILVA, Ana Paula dos SCL et al. Behavioral and neurochemical studies in mice pretreated with garcinielliptone FC in pilocarpine-induced seizures. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 124, p. 305-310, 2014.
- MAVOURNIN, Kathleen H. et al. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 239, n. 1, p. 29-80, 1990.
- TANG, Soon Yew; HALLIWELL, Barry. Medicinal plants and antioxidants: what do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? **Biochemical and biophysical research communications**, v. 394, n. 1, p. 1-5, 2010.
- SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. Pará Belém, p.300, 2005.
- SILVA, Ana Paula S. C. L. et. al. Estudos comportamentais e neuroquímicos em camundongos pré-tratados com garconielliptone gfc em convulsões induzidas por pilocarpina. 2014.