
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA/ANTIMUTAGÊNICA DO LÁTEX DE *Himatanthus obovatus* (TIBORNA)

EVALUATION OF THE MUTAGENIC/ANTIMUTAGENIC ACTIVITY OF THE LATEX OF *Himatanthus obovatus* (TIBORNA)

Maria Alice Montes de Sousa¹, Susy Ricardo Lemes Pontes^{2*}, Carolina Ribeiro³,
Lee Chen Chen³, Paulo Roberto de Melo-Reis⁴

¹Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia, GO.

²Docente do Centro Universitário Goyazes. Trindade, GO.

³Universidade Federal de Goiás. Goiânia-GO.

⁴Docente da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia, GO.

*Correspondente: susy.pontes@unigy.edu.br

Resumo

Objetivo: avaliar a atividade mutagênica/antimutagênica do látex do *Himatanthus obovatus*, popularmente conhecido por tiborna. Métodos: Utilizou-se o modelo experimental de mutagenicidade de Ames. Na avaliação da atividade mutagênica, alíquotas das culturas “pernoite” de *Salmonella typhimurium* de TA-100 foram incubadas em tubos de triplicatas com diferentes concentrações (1:2, 1:5 e 1:10) do látex de *H. obovatus*. Na avaliação da antimutagenicidade, o controle positivo (1,5 µg de azida sódica) foi co-administrado com as diferentes concentrações do látex de *H. obovatus*. Resultados: Os resultados demonstraram que o látex de *H. obovatus* apresentou ação mutagênica em todas concentrações. A análise antimutagênica do látex nas concentrações foram comparadas com o controle positivo (azida sódica), os resultados das concentrações 1:2 e 1:5 não demonstraram diminuição significativa no número de colônias revertentes ($p > 0,05$), mas na concentração de 1:10 obteve maior porcentagem de inibição de mutagenicidade. Conclusão: o látex de *H. obovatus* apresentou ação mutagênica em todas as concentrações testadas.

Palavras-chave: *Himatanthus obovatus*. Látex. Mutagênese. Plantas medicinais.

Recebido: Jun 2021 | Aceito: Jun 2021 | Publicado: Jul 2021



Abstract

Objective: to evaluate the mutagenic/antimutagenic activity of latex from *Himatanthus obovatus*, popularly known as tiborna. Methods: Ames' experimental mutagenicity model was used. In the evaluation of mutagenic activity, aliquots of “overnight” cultures of *Salmonella typhimurium* de TA-100 were incubated in triplicate tubes with different concentrations (1:2, 1:5 and 1:10) of *H. obovatus* latex. In the evaluation of antimutagenicity, the positive control (1.5 µg of sodium azide) was co-administered with different latex concentrations of *H. obovatus*. Results: The results showed that latex de *H. obovatus* showed mutagenic action at all concentrations. The antimutagenic analysis of latex concentrations were compared with the positive control (sodium azide), the results of 1:2 and 1:5 concentrations did not show a significant decrease in the number of revertant colonies ($p > 0.05$), but in the concentration of 1:10 obtained the highest percentage of mutagenicity inhibition. Conclusion: the latex of *H. obovatus* showed mutagenic action at all concentrations tested.

Keywords: *Himatanthus obovatus*. Látex. Mutagênese. Plantas medicinais.

Introdução

As plantas medicinais são amplamente utilizadas para uso de diversas doenças, como anemia, doenças respiratórias, úlceras, verminoses, no auxílio da cicatrização de feridas e entre outras. A escolha da terapêutica a ser usada ocorre na maioria dos casos sem orientação médica, e estas plantas possuem inúmeras atividades comprovadas cientificamente como: analgésica, antitérmica, anti-inflamatória, antialérgica, antiparasitária e antibacteriana¹.

Durante o processo evolutivo, as plantas desenvolveram mecanismos naturais de defesa, como a síntese de substâncias químicas tóxicas e genotóxicos contra-ataques de bactérias, fungos, insetos e animais predadores^{2,3,4}.

Os estudos realizados para análise das substâncias encontradas nas plantas, tem aumentado o interesse sobre esta área de pesquisa, por demonstrar várias atividades biológicas contra fungos, bactérias, vírus e insetos⁵⁻⁷.

Entre essas plantas com propriedades medicinais está a *Himatanthus obovatus*, popularmente conhecida como Tiborna, a qual é uma árvore de médio porte arbustiva, que pertence à Família Apocynaceae. É nativa do cerrado na região Centro-Oeste e nas savanas amazônicas; tendo como nome popular “leiteira”, “Tiborna” ou “Pau de leite”⁸.

Algumas propriedades terapêuticas do *H. obovatus* são relatadas em tratamentos de herpes, úlceras e verminoses. Se faz uso da casca da raiz, da folha, da madeira, da raiz, do látex do tronco e das folhas, sendo colocado com alto valor medicinal, na forma das populares “garrafadas” para tratar verminoses, infecção intestinal e como depurativo do sangue. Também é relatado pela população local que o látex do tronco tem poder cicatrizante e germicida⁹.

Em virtude do intenso uso de plantas medicinais pela população, tais como a tiborna, destaca-se a importância de aumentar os estudos científicos que validem seu uso seguro. Com esse propósito, o presente estudo avaliou a atividade mutagênica/antimutagênica do látex da *H. obovatus*.

Métodos

A estirpe de *Salmonella typhimurium* TA100 foi incubada em caldo nutritivo, 37°C, sob agitação constante durante 12 horas, atingindo a fase estacionária de crescimento. Na avaliação da atividade mutagênica, as alíquotas das culturas “pernoite” de *S. typhimurium* de TA-100 foram incubadas com diferentes as concentrações de 1:2, 1:5 e 1:10 do látex de *H. obovatus*, durante 25 minutos, em tubos em triplicata com agitação constante. Na avaliação da antimutagenicidade, o controle positivo (1,5 µg de azida sódica para a cepa TA100) foi co-administrado com as diferentes concentrações 1:2, 1:5 e 1:10 do látex de *H. obovatus*.

Após a incubação, foi adicionado ágar glicosado liquefeito à temperatura de 45°C, contendo solução de histidina/biotina (0,5 mM). O conteúdo foi transferido para as placas de Petri, em triplicata, contendo meio MEVB sólido (meio mínimo glicosado), em seguida foram incubadas a 37°C, durante 48 h em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD). Após este período, foram contados os números de colônias revertentes prototróficas para histidina, considerando-se a média aritmética dos resultados entre as placas, apresentados pela média do número de revertentes prototróficas de cada experimento independente realizado em triplicata¹⁰.

Análise de dados

Para avaliação da mutagenicidade após a contagem do número de revertentes, foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose utilizada. Para calcular a razão de mutagenicidade, utilizou-se a expressão:

$$RM = \frac{\text{média do n}^\circ \text{ de revertentes por placa teste (espontâneos + induzidos)}}{\text{média do n}^\circ \text{ de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos)}}$$

Considera-se como resultado positivo para mutagenicidade quando o número de colônias revertentes nas placas teste for igual ou superior ao dobro do número de colônias revertentes espontâneas do controle negativo¹⁰. Os resultados também foram avaliados pelo teste estatístico ANOVA e *post hoc* Tukey o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Para avaliação da antimutagenicidade, a normalidade dos resultados foi avaliada pelo teste estatístico ANOVA e *post hoc* Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo quando comparado ao controle positivo. A análise estatística foi realizada utilizando o software Bioestat versão 5.3. A porcentagem de inibição da mutagenicidade (PI) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$PI(\%) = \left[1 - \left(\frac{n. \text{ de revertentes na placa teste} - RE}{n. \text{ de revertentes na placa do controle positivo} - RE} \right) \right] \times 100$$

Placa teste: placas incubadas com mutágeno e composto.

Placa do controle positivo: placa incubada somente com o mutágeno.

RE: revertentes espontâneos (cepas testes incubadas na ausência de composto e mutágeno)

Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta os resultados da avaliação mutagênica e antimutagênica do látex de *H. obovatus* no teste de Ames. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Na avaliação da mutagenicidade, as concentrações do látex (1:2, 1:5 e 1:10 µL/placa) apresentaram um aumento no número de revertentes prototróficas para a cepa testada TA100. Os resultados apontaram uma diferença significativa entre o controle negativo e as diferentes concentrações do látex, pelo teste ANOVA e *post hoc* Tukey ($p < 0,05$). Em todas as concentrações do látex observou-se uma $RM \geq 2$. O maior valor de RM foi obtido na concentração 1:2 µL/placa, na qual observou-se uma $RM = 14,9$. O látex de *H. obovatus* apresentou efeito mutagênico em todas as concentrações testadas.

A análise antimutagênica do látex de *H. obovatus* mostrou que todas as concentrações (1:2, 1:5 e 1:10 µg/placa) co-tratadas com azida sódica causou uma diminuição do número de revertentes prototróficas em comparação com o controle positivo. No entanto, esta diminuição não indicou uma diferença significativa entre o controle positivo e as diferentes concentrações do látex ($p > 0,05$). A maior porcentagem de inibição de mutagenicidade (PI) foi observada na concentração de 1:10 µL/placa do látex, onde observou-se uma $PI = 59,8\%$. Estes resultados sugerem um efeito antimutagênico do látex de *H. obovatus*.

Tabela 1. Média edesvio padrão (DP) obtidos de três experimentos independentes em triplicata das colônias revertentes de histidina, índice mutagênico (MI) e porcentagem de inibição (IP) de mutagenicidade da estirpe do teste de *Salmonella typhimurium* - TA100. Tratamento realizado com doses do látex da tiberna.

Tratamento	Mutagenicidade		Antimutagenicidade	
	TA 100		TA 100	
	Média ± DP	RM	Média ± DP	IP (%)
Controle Negativo ¹	28.7 ± 11.7	1,0	56.3 ± 62.9	–
Controle Positivo ²	1069.3 ± 41.5	37,3	1448.7 ± 644.2	–
Látex – 1:2	428 ± 11.5 ^A	14,9	781.3 ± 223.8 ^D	46,1
Látex – 1:5	275.3 ± 202.2 ^A	9,6	653.3 ± 198.5 ^D	54,9
Látex – 1:10	120.3 ± 113.3 ^A	4,2	583 ± 237.2 ^D	59,8

¹10 µl de água destilada; ² 3,0 µg de Azida sódica para TA100.

ANOVA e teste de Tukey. **Mutagenicidade:** ^A Existe diferença significativa quando comparado ao controle negativo ($P < 0.05$) e ^B Não existe diferença significativa quando comparado ao controle negativo ($p > 0.05$). **Antimutagenicidade:** ^C Existe diferença significativa quando comparado ao controle positivo ($p < 0,05$) e ^D Não existe diferença significativa quando comparado ao controle positivo ($p > 0,05$).

Acerca da atividade mutagênica de *H. obovatus*, foi possível verificar neste estudo que o mesmo apresenta efeito mutagênico em cepa de *S. typhimurium* nas concentrações de 1:2, 1:5 e 1:10.

Paz et al.¹¹ detectaram que o látex de *H. sucuuba*, apresenta atividade mutagênica através dos testes *Allium cepa* e Cometa nas concentrações de 2g/100ml e 3g/100ml. Além disso, este látex possui significativa mutagenicidade pela presença de micronúcleos e aberrações cromossômicas em linfócitos humanos nestas mesmas doses.

O plumierídeo possui propriedades inibitória de crescimento de plantas e potencial antifúngico. O plumierídeo iridóides é considerada a substância ativa do látex de *H. obovatus* e sua estrutura possui esterilização da unidade glicosídica, amidação e hidrólise de éster, desencadeando a formação de derivados que demonstraram aumento da citotoxicidade¹².

Segundo Wood et al.¹³ o látex do gênero *Himatanthus* apresenta uma lactona, denominada iridoide plumericina, a qual apresenta potencial efeito lesivo ao DNA, além de inibir em até 50% o crescimento de células neoplásicas durante a fase G1.

A análise antimutagênica do látex de *H. obovatus* mostrou que as concentrações 1:2 e 1:5 levou a uma diminuição do número de revertentes prototróficas, mas na concentração de 1:10 obteve uma maior porcentagem de inibição de mutagenicidade, indicando um efeito antimutagênico do látex de *H. obovatus*. A composição fitoquímica do látex pode indicar o motivo deste efeito antimutagênico, a presença de terpenos e iridóides tem sido relatada correm no látex de diferentes espécies e *Himatanthus*.

Em outro estudo, com o látex de *Himatanthus articulatus* também não ocorreu um aumento a frequência de danos ao DNA através dos ensaios cometa e micronúcleo em medula óssea de camundongos. O efeito protetor contra danos ao DNA induzidos pelo peróxido de hidrogênio é verificado no látex desta espécie¹⁴.

Conclusão

Através dos métodos aplicados neste estudo, concluiu-se que o látex de *H. obovatus* apresentou ação mutagênica em todas as concentrações testadas com a cepa bacteriana mutante de *Salmonella typhimurium* TA100. O látex não apresentou ação antimutagênica significativas nas concentrações utilizadas em meio ao tratamento

simultâneo com a substância mutagênica a Azida sódica na *Salmonella typhimurium* TA100.

Referências

1. Parente AMLP. Contributo para o estudo da angiogênese em tumores mamários caninos: influência do fator de crescimento vascular do endotélio e da Ciclooxygenase 2 [Dissertação]. Vila Real, Portugal: Universidade de Trás - os - Montes e Alto Douro; 2012.
2. Castro DB, Santos DB, Ferreira HD, Santos SC, Chen-Chen L. Atividades mutagênica e citotóxica do extrato de *Cochiospermum regium* Mart. (algodãozinho-do-campo) em camundongos. *Rev Bras OL Méd.* 2004;6(3):15-19.
3. Melo-Reis PR, Andrade LS, Silva CB, Araújo LMM, Pereira MS, Mrue F, Chen-Chen L. (2010). Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax látex. *Braz J Biol.* 2010;70(1):189-194.
4. Lemes SR, Chaves DA, Silva-Júnior NJ, Carneiro CC, Chen-Chen L, Almeida LM, Gonçalves PJ, Melo-Reis PR. Antigenotoxicity protection of *Carapa guianensis* oil against mitomycin C and cyclophosphamide in mouse bone marrow. *An Acad Bras Ciênc.* 2017;89(3 Suppl).
5. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga VF, Cryngberg NF, Echevarria A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim Nova.* 2002; 25(3):429-438.
6. Jones PH, Christodoulos K, Dobbs N, Thavasu P, et al. Combination antiangiogenesis therapy with marimastat, captopril and fragmin in patients with advanced cancer. *Brit J Cancer.* 2044;5: (1):30-6.
7. Fukumasu H, Latorre AO, Bracci N, Górnaiak SL, Dagli MLZ. Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do cancer. *Revista Brasileira de Toxicol.* 2008; 21(2).
8. Carmo EJS, Diniz BM, Nascimento MS, Melo RSF, Allem LN, Ribeiro S, Morais A, Figueiredo DL. Caracterização anatômica de folhas adultas de *Himatanthus obovatus* (M.Arg.) Wood (Apocynaceae). In: Seminário de Iniciação Científica (Sic-UEG). Universidade Estadual de Goiás; 2005.
9. Coelho AA. Efeito de extratos de plantas do Cerrado em *Dipetalogaster maxima* (Uhler) (Hemiptera, Reduviidae). *Rev Bras Entomol.* 2009;53(3):444-451.
10. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res.* 1983;113:173-215.

11. Paz MFCJ, Alencar MVOB, Soars RLL, Costa DAF, Nunes AT, Cavalcante AACM. Avaliação tóxica, citotóxica, mutagênica e genotóxica do látex da *Himatanthus sucuuba*: uma questão de saúde pública. *Acta Biol Parana*. 20123;42:7-27.
12. Dobhal MP, Li G, Gryshuk A, Graham A, Bhatanager AK, Khaja SD, Joshi YC, Sharma MC, Oseroff A, Pandey RK. Structural modifications of plumieride isolated from *Plumeria bicolor* and the effect of these modifications on in vitro anticancer activity. *J Org Chem*. 2004; 69(19):6165-72.
13. Wood LK, Lee K, Vaisberg AJ, Kingston DG, Neto CC, Hammond CB. A bioactive spirolactoneiridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. *Chem Pharm Bull*. 2001;49(11):1477-1478.
14. Rebouças SO, Silva J, Groff AA, Nunes EA, Ianistchi M, Ferraz ABF.. The antigenotoxic activity of latex from *Himatanthus articulatus*. *Braz J Pharmacogn*. 2013;22(2): 389-396.