

NATHALIA NOVAK ZOBIOLE

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS, ANTIMUTAGÊNICOS E
IMUNOMODULATÓRIO *IN VIVO* DA FRAÇÃO HIDROMETANÓLICA DE
ANNONA NUTANS E EXTRATO METANÓLICO DE *BYRSONIMA*
VERBASCIFOLIA

CAMPO GRANDE-MS

2015

NATHALIA NOVAK ZOBIOLE

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS, ANTIMUTAGÊNICOS E
IMUNOMODULATÓRIO *IN VIVO* DA FRAÇÃO HIDROMETANÓLICA DE
ANNONA NUTANS E EXTRATO METANÓLICO DE *BYRSONIMA*
VERBASCIFOLIA

Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, na área de Saúde e Tecnologia na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Orientador: Dr. João Máximo de Siqueira

Coorientador: Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

CAMPO GRANDE-MS

2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

NATHALIA NOVAK ZOBIOLE

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS, ANTIMUTAGÊNICOS E
IMUNOMODULATÓRIO *IN VIVO* DA FRAÇÃO HIDROMETANÓLICA DE
ANNONA NUTANS E EXTRATO METANÓLICO DE *BYRSONIMA*
VERBASCIFOLIA

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-
Oeste da Universidade Federal de
Mato Grosso do Sul – UFMS para a
obtenção do título de Doutor.

Resultado _____
Campo Grande (MS), 18 de Junho de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Maximo de Siqueira
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Angela Maria Zanon
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos.
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Aline Ferreira dos Santos
Instituição: Unigran

Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!

Veronica Shoffstall

Aos meus pais José Domingues
e Diloê Irene Zobiole
que sempre estiveram ao meu lado
e por continuarem a me ajudar e apoiar
a correr atrás dos meus sonhos.

Aos meus avós Terezinha, in memoriam,
E Angelo Zobiole

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Mato Grosso do sul, por ter-me possibilitado desenvolver este trabalho.

Ao Prof. Dr. João Máximo de Siqueira pela orientação, dedicação, ensinamentos, estímulo, apoio, paciência e ainda por não me deixar desistir.

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo pelas contribuições da parte fitoquímica de *Byrsonima verbasifolia*.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste pelos valiosos ensinamentos.

Aos animais que deram a vida, sem direito de escolha.

Às “meninas do lab”, Mayra, Stephanie, Sara, Pam e Bia pelo auxílio nos experimentos, paciência, apoio, compreensão, ajuda em todos os momentos.

A amiga Cíntia Alves de Souza Pereira e sua família, um agradecimento mais que especial, por continuar sendo um dos melhores acontecimentos desses anos, pelas alegrias, conversas, festas, conselhos e por me ajudar em todos os momentos, tanto nos profissionais quanto nos pessoais, sempre com bom humor e paciência.

As amigas Jan e Re que sempre se preocuparam comigo, me ajudaram a vencer os momentos mais difíceis e ainda mesmo não sendo da área a escrever os textos.

A Marjo pela paciência e compreensão nos momentos de loucura.

A Jaque (minha mãe em Campo Grande), João e Dudu que me ajudaram muito a concluir essa etapa.

Ao Alisson que me ajudou a compreender os resultados de fitoquímica.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

ANHMF – fração hidrometanólica das folhas de *Annona nutans*

BHT – 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol

CF - ciclofosfamida

DMSO - dimetil sulfóxido

EHMB – extrato bruto das folhas de *Annona nutans*

EX - extrato

FAcOEt – fração acetato de etila das folhas de *Annona nutans*

FCHCl₃ – fração clorofórmica das folhas de *Annona nutans*

FHEX - fração hexânica das folhas de *Annona nutans*

MN - micronúcleos

SF - solução fisiológica

RESUMO

O uso de plantas medicinais na prevenção e tratamento de doenças é empregado desde os primórdios da civilização em diversas culturas. Atualmente essas plantas destacam como sendo uma promissora fonte de agentes anticancerígenos, com seus extratos sendo utilizados na quimioprevenção. Diante desta perspectiva, o presente trabalho avaliou a atividade mutagênica, antimutagênica e imunomodulatória *in vivo* da fração hidrometanólica das folhas *Annona nutans* e do extrato metanólico de *Byrsonima verbascifolia*. Para tanto, foram realizados ensaios do micronúcleo em sangue periférico, fagocitose esplênica e contagem diferencial de células do sangue. Para a fração e o extrato foram utilizados machos Swiss adultos (n=10/grupo), divididos nos seguintes grupos: controle negativo, controle positivo, extrato, pré-tratamento dose única, pré-tratamento doses múltiplas, tratamento simultâneo, pós-tratamento, tratamento contínuo. A coleta de sangue para os ensaios do micronúcleo e contagem diferencial de células sanguíneas foi realizada por punção da veia caudal em 24 (T1), 48 (T2) e 72 horas (T3) após o tratamento com ciclofosfamida ou veículo. Após a coleta os animais foram submetidos à eutanásia para coleta do baço destinado à fagocitose esplênica. Os resultados do ensaio do micronúcleo mostraram que a fração e o extrato apresentaram atividade antimutagênica: *Annona nutans*, nos grupos de pré-tratamento com dose única pré-tratamento com doses múltiplas e doses contínuas, houve reduções de danos de 91,44%, 41,18% e 91,44% , respectivamente, em T1 e 83,58%, 79,48% e 83,58% repectivamente em T2; e para *Byrsonina verbascifolia*, nos grupos de pré-tratamento com dose única, pré-tratamento em doses múltiplas observaram reduções de danos 63% e 48%, respectivamente, em T1 e 92%, 95% , respectivamente, em T2. Em relação ao ensaio de fagocitose esplênica, observou-se que a fração e o extrato, isoladamente e/ou associado à ciclofosfamida, aumentaram a atividade fagocítica, exceto no pós-tratamento e simultâneo somente para o extrato. Quanto aos valores referentes à contagem diferencial de células sanguíneas, estes se mostraram dentro dos padrões de referência/normalidade. Assim, sugere-se que a fração e o extrato possuem atividade antimutagênica, agindo

possivelmente e preferencialmente por desmutagênese, sendo que os micronúcleos são retirados da corrente sanguínea por um aumento da atividade fagocitária, caracterizando assim a imunomodulação. Dessa forma, esses resultados sugerem que a fração e o extrato testados possuem atividade quimioprotetora.

Palavras –chaves: *Byrsonima verbascifolia*, *Annona nutans*, antimutagênico

Abstract

The use of medicinal plants in the prevention and treatment of diseases is being used since the dawn of civilization among different cultures. Currently, these plants stood out for being a promising source of anticancer agents, with their extracts being used in chemoprevention. Given this perspective, this study evaluated the mutagenic, antimutagenic and immunomodulatory in vivo hydromethanol fraction of the leaves from the *Annona nutans* and methanol extract of *Byrsonima verbascifolia*. Therefore, micronucleus assays were performed on peripheral blood, spleen phagocytosis and differential counting of blood cells. For the fraction and the extract males Swiss adults were used (n = 10 / group), divided into the following groups: negative control, positive control, extract, single dose pretreatment, multiple doses pretreatment, simultaneous treatment, post-treatment and continued treatment. Blood collection for micronucleus tests, and blood cell differential counting was performed by puncture of the tail vein 24 (T1), 48 (T2) and 72 hours (T3) after treatment with cyclophosphamide or vehicle. After collecting the animals were sacrificed to collect the spleen for the splenic phagocytosis. The results of the micronucleus test showed that the fraction and extract antimutagenic activity: *Annona nutans* the percentages of damage reduction in groups pre-treated with a single dose pretreatment, multiple doses and continuous doses were 91.44%, 41,18% and 91.44%, respectively, T1 and 83.58%, 79.48% and 83.58% at T2 charge respectively; and *Byrsonima verbascifolia*, in groups pre-treated with a single dose pretreatment of multiple doses observed reductions damage 63% and 48% respectively in T1 and 92%, 95%, respectively, T2. Regarding the spleen phagocytosis assay, it was observed that fraction and extract, separately and/or in combination with cyclophosphamide increased the phagocytic activity except in the post-treatment and for extract simultaneous. The white cells differential blood count were within the reference/normal range. Thus, it is suggested that the fraction and extract have antimutagenic activity, possibly by acting and preferably desmutagenese, with micronuclei are removed from the bloodstream by an increase in phagocytic activity, thus demonstrating immunomodulation. Thus, these results suggest that the fraction and extract tested have chemoprotective activity.

Keywords: *Byrsonima verbascifolia*, *Annona nutans*, antimutagenic.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	vix
1. Introdução	12
1.1 Família Annonaceae	16
1.1.1 <i>Annona nutans</i>	17
1.2 Família Malpighiaceae Juss	18
1.2.1 <i>Byrsonima verbascifolia</i>	20
1.3 Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade	23
1.4 Ensaios Biológicos	23
1.4.1 Teste do micronúcleo em sangue periférico	23
1.4.2 Contagem diferencial de sangue periférico	24
1.4.3 Ensaio de Fagocitose Esplênica	25
1.5 Referências	27
2. Objetivos	41
2.1 Objetivo Geral	41
2.2 Objetivos específicos	41
3. Manuscrito	43
3. 1 Manuscrito 1	43
3. 2 Manuscrito 2	77
4. Discussão	103
4.1 Referência	109
5. Anexos	115