

Evaluation of the protective cytogenetic activity of *Parahancornia fasciculata* (Apocynaceae)

Gleicyanne Furtado Frazão*
Keren Hapuque da Silva Souza*
Mayck Rian Gonçalves Magalhães**
Edwin Bryan Santos do Livramento**
Paulo de Assis Barbosa Romano**
Alessandra Azevedo do Nascimento*
Moacir de Azevedo Bentes Moonteiro Neto*

Abstract

Parahancornia fasciculata is a large fruit tree, native to the Amazon region, where it is popularly known as “Amapazeiro”. It is widely used in folk medicine to assist in the treatment of several pathologies: malaria, lung problems, among other diseases. Thus, considering the usual use of this plant, the present study evaluated the protective cytogenetic action of *Parahancornia fasciculata* on polychromatic erythrocytes of Swiss mice. The animals received different concentrations of *Parahancornia fasciculata* (250, 500, 1000 and 2000 mg/kg b.w.) including positive (Doxorubicin, DXR, 16 mg/kg b.w.), negative (water), and vehicle (Dimethylsulfoxide, DMSO) control groups. Dosages were administered to the animals via gavage, as well as the negative control and vehicle; the positive control was administered intraperitoneally. The animals remained in the daily treatment with the respective doses for 15 days for genotoxic evaluation. Caudal peripheral blood samples were collected at 24h, 48h, 7 and 15 days. For the antigenotoxic evaluation, on the 14th day the mice were treated with intraperitoneal injections of DXR. Peripheral caudal blood samples were obtained at 24h and 48h. Subsequently, 2,000 polychromatic erythrocytes were counted per animal in each group, to assess the frequency of micronuclei. The results showed that the methanolic extract of *Parahancornia fasciculata* was not genotoxic, as it did not present statistically significant differences when compared to the negative control. Animals treated with the different concentrations of *Parahancornia fasciculata* extract associated with DXR, obtained a significant reduction in Micronucleated Polychromatic Erythrocytes when compared to the positive control. Therefore, the methanolic extract of *Parahancornia fasciculata* demonstrated a protective action against DNA damage induced by DXR and did not demonstrate a genotoxic effect.

Keywords: Lifestyle. Body composition. Student Health. Food Service.

INTRODUCTION

Brazil is responsible for 15 to 20% of the total biodiversity in the world, with about 60,000 plants existing in the Brazilian flora, of which only 4,800 species have been studied regarding their bioactive compounds. In this context, there is a clear imperative to

develop research aimed at evaluating the therapeutic potential of medicinal plants¹.

Among the little studied plants is *Parahancornia fasciculata*, it is a large, fruitful tree, native to the Amazon region, it has an erect and elevated trunk, and the crown is

DOI: 10.15343/0104-7809.202044412420

*Universidade Federal do Amapá - UNIFAP. Macapá – AP, Brasil.

**Faculdade Estácio de Macapá. Macapá – AP, Brasil.

E-mail: gleicyannefrazao@hotmail.com

formed by many opposite and independent branches². The leaves are lanceolate, opposite, with 12 to 15 major secondary veins³. The fruits are globular, about 8 cm in diameter, the seed has a dark brown and light-yellow color and may contain a brown border with a yellow center. Morphologically, it is smooth, ovoid-flat, and has a central and oval-shaped hilum⁴.

The species is popularly known as "Amapazeiro", "Mapá" or "Amapá", its bark produces a medicinal exudate in the form of latex that is popularly called "Leite do Amapá" and is used in folk medicine to cure Malaria, pulmonary problems, gastritis, weakness and scarring⁵. Although biological activities have been observed empirically, they can be scientifically explained according to the chemical composition of *Parahancornia fasciculata*⁶.

In the dichloromethane extract of the bark and latex, the pentacyclic triterpenes lupeol, β -amyrin and α -amyrin and their acetylated derivatives were isolated and identified⁶. Using the same methodology, steroids β -sitosterol, stigmasterol, and β -sitosterone were isolated from the roots. In another study, using methanolic extract, a large mixture of carbohydrates, methylmyosinosol, and phenylethanoid derivatives was identified with cornoside as the main constituent⁶.

Studies on the evaluation of the protective cytogenetic action of the species *Parahancornia fasciculata* are not reported in the scientific literature, which made it necessary to carry out this research due to the completion of steps to register a probable herbal medicine based on this plant with the National Health Surveillance Agency (ANVISA)⁷.

Since cytogenetic tests are a condition for the safety and viability of registration and commercialization of any medicine, this research proposed to evaluate the genotoxic and antigenotoxic activities of the methanolic extract of the leaves of *Parahancornia fasciculata* in polychromatic erythrocytes of Swiss mice.

MATERIAL AND METHODS

Chemical agent inducing chromosomal damage in DNA *in vivo*

The DXR ampoule containing 50 mg at 98% purity was purchased from Sare Drogarias Ltda, São Paulo, SP, Brazil. This compound dissolved in distilled water was used as an inducer of micronuclei in peripheral blood cells of mice (positive control). The dose of DXR (16 mg/kg body weight, b.w.) was selected based on its effectiveness in inducing chromosomal damage⁸.

Evaluation of the Frequency of Polychromatic Erythrocytes

The peripheral blood micronucleus assay was performed according to the protocol described by MacGregor *et al.*^{9,10}. A total of 2000 polychromatic erythrocytes (PCEs) were analyzed per animal to determine the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs). A total of 400 erythrocytes per animal were scored to calculate the Nuclear Division index [NDI, PCE/PCE+NCE (normochromatic erythrocytes) to determine treatment

cytotoxicity¹¹. The slides were analyzed blindly using an optical microscope with a 100x immersion objective.

For the protective evaluation, the percentage of reduction in the frequency of MNPCs was calculated using the formula:

$$\% \text{ Reduction} = \frac{\text{Frequency of MNPCs in A} - \text{Frequency of MNPCs in B}}{\text{Frequency of MNPCs in A} - \text{Frequency of MNPCs in C}} \times 100$$

Where A corresponds to the group treated with DXR (positive control), B corresponds to the group treated with *Parahancornia fasciculata* and DXR, and C corresponds to the group treated with water (negative control).

Obtaining the methanolic extract from the bark of *Parahancornia fasciculata* (Apocynaceae)

The *Parahancornia fasciculata* bark was collected in the municipality of Macapá-AP, at KM 09, with GPS location: Lat. 00° 04' 06.2" S; Long. 51° 08' 01.5" W. From the specimen collected an exsiccatae was prepared, which was composed with branches of the species mentioned. These branches, after cleaning, were dried by compression, and then were sent and deposited as No. 019140 at the Herbário Amapaense of the Institute of Scientific and Technological Research of Amapá.

The *Parahancornia fasciculata* bark collected were dried in a circulating air oven at 45°C until complete dehydration.

After drying, the shells were crushed in a knife mill, and the crushed material was macerated with methyl alcohol (liquid

extractor), in a proportion of 1:5 (1 kg of plant material/5 L of methanol). The mixture was homogenized for 10 days, in order to break the concentration zones inside the flask, providing better contact between the solvent and the plant material.

After maceration, the extracted solution was vacuum filtered. Then, the liquid was placed in a rotary evaporator (Q344b2, Quimis) at 78 rpm and 60°C in order to completely remove the solvent through evaporation, resulting in the methanolic extract of the *Parahancornia fasciculata* bark.

Animals used in the experiment

For the experiment, Swiss male mice weighing approximately 25 grams were purchased. The animals came from the Multidisciplinary Center for Biological Investigations in the Area of Laboratory Animal Science - CEMIB of the University of Campinas - UNICAMP. The mice remained in collective cages in a quarantined experimental room, under controlled conditions of temperature (23±2°C), humidity (50±10%), 12 hours of light-dark cycle, with *ad libitum* access to food and water. The project was submitted to the Research Ethics Committee of the Federal University of Amapá (CEUA/UNIFAP) in accordance with the Arouca Law 11.794/2008, which regulates the use of animals in research, approved and filed under number 14/2017 .

Experimental design

Swiss mice were divided into different experimental groups of six animals each. The doses of *Parahancornia fasciculata* were selected based on the guidelines of the National Health Surveillance Agency

(ANVISA) 8. In order to investigate its potential genotoxicity, *Parahancornia fasciculata* was administered by gavage in a volume of 0.5 ml per 25 g of weight in doses of 250, 500, 1000 and 2000 mg/kg b.w. per day for each animal for 15 days. Peripheral blood samples were collected at 24 and 48 hours and 7 and 15 days after the start of treatment. For protective evaluation, animals treated with different concentrations of *Parahancornia fasciculata* received intraperitoneal (0.3 ml per 25 g b.w.) DXR (16mg/kg b.w.) on the 14th day. Peripheral blood samples were collected 24 and 48 hours after treatment with DXR. The different doses of *Parahancornia fasciculata* were prepared from a stock solution of 400 g. The vehicle group was treated by gavage (0.5 ml per 25 g of b.w.) with the same amount of DMSO used to prepare 2000 mg of *Parahancornia fasciculata* per kg/b.w.

Statistical analysis

The data went through tests of normality and homogeneity of variances, to verify the parametric nature of the data. After these statistical analyses, they underwent analysis of variance for entirely randomized experiments (ANOVA), with calculations of the F statistic and its respective p-value. In cases where $p \leq 0.05$, the treatment averages were compared using the Tukey method, with the calculation of the minimum significant difference $p = 0.05$, using the Graph Pad Prism® program.

RESULTS

There was no statistically significant difference in micronucleus induction between groups treated with different doses of *Parahancornia fasciculata* and the negative control ($P > 0.05$; Table 1). These findings indicated the absence of a genotoxic effect of the different concentrations of *Parahancornia fasciculata* at different sampling times used in the present study.

With a single intraperitoneal dose of DXR associated with gavage administration of each concentration of *Parahancornia fasciculata* extract, a reduction between 43.76% to 50.68% could be observed for the 24-hour treatment, and in 48 hours it was observed from 51.50% to 63.62% (Table 2), when compared to the group of animals treated only with DXR. It is worth mentioning that there was no increase in the reduction of genotoxicity in the 24h and 48h periods in relation to the increase in extract dosages, thus indicating a lack of a dose-response relationship. In the protective action tests, where doxorubicin was used, it was observed that the frequency of Micronucleated Polychromatic Erythrocytes (MNPCEs) was lower in animals treated with DMSO + DXR than in those treated only with DXR; however, these differences were not statistically significant.

For the cytotoxic evaluation the results of nuclear division index (NDI), in the treatment of 24h, 48h, 7 and 15 days (table 3) and 24 and 48h (table 4) associated with DXR, no differences were observed between the treated groups with the concentrations of the methanolic extract of *Parahancornia fasciculata* and their respective controls, demonstrating the absence of cytotoxicity.

Table 1 – Frequency of Micronucleated Polychromatic Erythrocytes (MNPCEs) in peripheral blood of male Swiss mice, treated with different concentrations of *Parahancornia fasciculata* and their respective controls after 24, 48 h, and 7 and 15 days after treatment.

Treatment (mg.kg ⁻¹ p.c.)	MNPCEs/1000 PCEs ^a			
	24h	48h	7 days	15 days
Control	1.08 ± 0.79	1.17 ± 0.71	1.17 ± 0.71	1.08 ± 0.79
DMSO	0.92 ± 0.90	0.91 ± 0.90	1.25 ± 0.45	1.25 ± 0.45
<i>P. fasciculata</i> 250 mg	1.67 ± 0.77	1.33 ± 0.49	1.33 ± 0.49	1.50 ± 0.52
<i>P. fasciculata</i> 500 mg	2.25 ± 0.75	1.83 ± 0.71	1.33 ± 0.49	1.33 ± 0.49
<i>P. fasciculata</i> 1000 mg	2.00 ± 0.85	1.67 ± 0.49	1.67 ± 0.49	1.67 ± 0.65
<i>P. fasciculata</i> 2000 mg	2.75 ± 1.06	1.67 ± 0.49	1.67 ± 0.49	1.33 ± 0.65
DXR				24.8 ± 0.86*

Two thousand PCEs were analyzed per animal, for a total of 12,000 cells per group;
^aValues of mean ± standard deviation;
 *Statistically significant difference when compared to the control (P < 0.05);
 DXR, Doxorubicin;
 DMSO, Dimethylfulfoxide.

Table 2 – Frequency of Micronucleated Polychromatic Erythrocytes (MNPCEs) in peripheral blood of male Swiss mice treated with different concentrations of *Parahancornia fasciculata* and their respective controls after 24, 48 hours of treatments.

Treatment (mg.kg ⁻¹ b.w)	MNPCEs/1000 PCEs ^{a,b}			
			100% REDUCTION	
	24h	48h	24h	48h
Control	1.1 ± 0.80	1.8 ± 0.72	-	-
DMSO + DXR	22.8 ± 0.70 ^c	24.2 ± 1.03 ^c	-	-
DXR	23.2 ± 1.19 ^c	24.5 ± 0.90 ^c	-	-
<i>P. fasciculata</i> 250mg + DXR	13.5 ± 1.24 ^{c,d}	12.5 ± 1.24 ^{c,d}	43.76%	51.50%
<i>P. fasciculata</i> 500mg + DXR	13.1 ± 0.90 ^{c,d}	12.1 ± 1.16 ^{c,d}	45.70%	53.22%
<i>P. fasciculata</i> 1000mg + DXR	13.0 ± 1.04 ^{c,d}	11.7 ± 1.83 ^{c,d}	46.15%	54.94%
<i>P. fasciculata</i> 2000mg + DXR	12.4 ± 1.04 ^{c,d}	9.67 ± 0.98 ^{c,d}	50.68%	63.52%

^aValues of mean ± standard deviation;
 Two thousand PCEs were analyzed per animal, for a total of 12,000 cells per group;
 *Statistically significant difference when compared to the control (p-value);
 Statistically significant difference when compared to the DXR group.

Table 3 – Frequency of Cell Division Index - NDI in peripheral blood of male Swiss mice treated with different concentrations of *Parahancornia fasciculata* and their respective controls after 24, 48 h, 7 and 15 days of treatments.

CONCENTRATION mg/kg b.w.	24 hours ^{a,b}	48 hours ^{a,b}	7 days ^{a,b}	15 days ^{a,b}
Control	0.11 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.02
DMSO	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.02
DXR				0,09 ± 0.02
<i>P. fasciculata</i> 250 mg	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.02
<i>P. fasciculata</i> 500 mg	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.01
<i>P. fasciculata</i> 1000 mg	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.01
<i>P. fasciculata</i> 2000 mg	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.01

Positive Control (DXR);
 Vehicle (DMSO) Dimethylsulfoxide.
^a400 blood cells were analyzed per animal, for a total of 2400 cells per treatment (PCE/PCE + NCE);
^bMean values ± standard deviation.

Table 4 – Frequency of Cell Division Index - NDI in peripheral blood of male Swiss mice treated with different concentrations of *Parahancornia fasciculata* associated with DXR and their respective controls after 24 AND 48 h of treatments.

CONCENTRATION mg/kg b.w.	24 horas ^{a,b}	48 horas ^{a,b}
Controle Negativo	0.11 ± 0.05	0.09 ± 0.01
DXR	0,08 ± 0.02	0,08 ± 0.02
DMSO + DXR	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01
<i>P. fasciculata</i> 250 mg + DXR	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01
<i>P. fasciculata</i> 500 mg + DXR	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.01
<i>P. fasciculata</i> 1000 mg + DXR	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.02
<i>P. fasciculata</i> 2000 mg + DXR	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.01

Positive Control (DXR);

Vehicle (DMSO) Dimethylsulfoxide;

^a400 erythrocytes were analyzed per animal, for a total of 2400 cells per treatment (PCE/PCE + NCE);

^bMean values ± standard deviation.

DISCUSSION

Pre-clinical tests are of fundamental importance in screening studies of medicinal plants¹². Among toxicological tests are cytogenetics such as the micronucleus test. The micronucleus induction methodology in peripheral blood erythrocytes has been used to assess genotoxic and antigenotoxic activities as it is effective for identifying agents capable of inducing or preventing chromosomal damage¹³.

The micronucleus test has the characteristic of evaluating the effects of certain substances, which are observed in PCEs, which in turn have a short life span, thus, indicating recently induced damage¹⁴.

The presence of a micronucleus results

in damage to chromosomes, is capable of breaking chromosomes or affecting the formation of the metaphase plate, and also compromises the mitotic spindles responsible for the unequal distribution of chromosomes during the cell division process¹⁵.

The results also show that the extract of *Parahancornia fasciculata* causes a significant reduction in the frequency of MNPCs induced by DXR, although the mechanisms underlying the protective (antigenotoxic) effects of *Parahancornia fasciculata* are not completely understood, and the properties of the compounds of this plant are probably responsible for effects observed in the present study. The genotoxic activity of the chemotherapeutic agent DXR has been attributed to its ability to produce free radicals¹⁶, which cause different types of cell damage, including DNA cleavage. The chemical structure of DXR favors the generation of free radicals and the compound can bind to iron and form complexes with DNA, inducing a break in the double strand¹⁷. Some studies have shown that oxidative damage is probably related to the formation of free radicals, accompanied by reduced antioxidant capacity¹⁸. Here are some mechanisms considered: (1) intercalation in DNA, leading to the inhibition of macromolecule synthesis; (2) generation of free radicals, leading to DNA damage or lipid peroxidation; (3) DNA binding and alkylation; (4) cross-linking of DNA; (5) interference with DNA unwinding or DNA strand separation and helicase activity; (6) direct effects of the membrane; (7) initiation of DNA damage via inhibition of topoisomerase II; and (8) induction of apoptosis in response to inhibition of topoisomerase II^{19,20}.

It is understood that the formation of free radicals occurs when the release of an electron, which the anthracycline ring of DXR suffers, can react with tissue macromolecules²¹. Thus, DXR is used as a micronucleus inducer, frequently used in mutagenicity tests as a positive control, which is the compound used in the referred study²².

The results show that the methanolic extract of *Parahancornia fasciculata* caused a significant reduction in the frequency of MNPCs induced by DXR. Although many mechanisms underlying the antigenotoxic effects of *Parahancornia fasciculata* are not yet fully understood, the antioxidant properties of the compounds in this plant are probably responsible for the effects observed in the present study.

The concentrations administered of the extract of *Parahancornia fasciculata* did not show proportional increases in the reduction of genotoxic activity in the period of 24h and 48h, thus inferring that there is no relationship with the dose-response, leading to an inconsistent bioavailability of the compound in the cell. On the other hand, the assessment of dose effects is complicated by the fact that many chemoprotective compounds act simultaneously at different levels of protection²³. On this basis, it is suggested that the observed lack of response to the doses used can be attributed to the activation of different mechanisms depending on the dose levels of the extract of *Parahancornia fasciculata*.

It is important to consider that the proportion of drug absorption decreases

with an increase in body surface, and the relationship between body surface and weight is not linear. Therefore, conversion must be done using allometric calculations to determine the expected dose for humans²⁴.

The NDI results obtained in this study demonstrated that there was no reduction in the percentage of PCEs in relation to the total number of erythrocytes in all treatment groups, when compared to the negative control animals, showing the absence of cytotoxic potential of the different treatments under the experimental conditions used.

Compounds with a high cytotoxicity index are able to completely inhibit dividing cells. The cytotoxic effect in the assay is necessarily evaluated on the cells' ability to divide²⁵, so that their cytotoxicity is directly proportional to the sample concentration and exposure time²⁶.

According to a study by Silva *et al.*²⁷, a bioassay was carried out to verify the preliminary toxicity of the extract of the species *Parahancornia fasciculata* with *Artemia salina*. In their study, it was demonstrated that through the acute preclinical toxicological assay in concentrations of up to 2000 mg/kg no toxic effect was observed. Therefore, the present study corroborates that described by Silva *et al.* (2016) because it was performed with lower concentrations of the extract (250, 500, 1000 and 2000 mg/kg b.w.) of the species *Parahancornia fasciculata* for the investigation of the complementary toxicological tests.

CONCLUSION

Indeed, the present study demonstrated that the extracts of *Parahancornia fasciculata*, did not have genotoxic effects, but demonstrated efficacy in reducing DXR-induced chromosome damage in the micronucleus assay in peripheral blood of Swiss mice. Although the exact mechanism underlying the protective effect (antigenotoxicity) of *Parahancornia fasciculata* is not completely understood, its antioxidant activity may explain its effect

on the genotoxicity of DXR. Therefore, the ability of *Parahancornia fasciculata* extract to reduce the frequency of DXR-induced MNPCEs is an indication of its promising and potential chemoprotective properties. Further studies should be carried out to better characterize the mechanism of action of *Parahancornia fasciculata* as well as to quantify its different constituents at plasma levels for a rational implementation of chemopreventive strategies.

REFERENCES

1. Da Silva GA, Ishikawa T, Da Silva MA. Projeto de implantação do horto de plantas medicinais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Alfenas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Medicamentos. Alfenas/MG, 2011.
2. Rios M, Martins-da-Silva RCV, Sabogal C, Martins J, Da Silva RN, De Brito RR, et al. Benefícios das plantas de capoeira para a comunidade Benjamin Constant, Pará, Amazônia Brasileira. Belém: CIFOR, 2001. 54p.
3. Galuppo S, Plowden C. Amapá: o fortificante da Amazônia. In: Shanley P, Medina G (Org.). Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. Belém, CIFOR, 2005. p. 92-96.
4. Matta A. Flora Médica Brasileira. 3 ed. Vol 1. Manaus: Editora Valer, 2003. p. 356.
5. Shanley P, Medina G (Ed.). Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. Cifor, 2005.
6. Carvalho MG, Velloso CRX, Braz-Filho R, Costa WF. Acyl-lupeol esters from Parahancornia amapa (Apocynaceae). J Braz Chem Soc. 2001;12(1):556-9.
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Guia para Condução De Estudos Não Clínicos De Toxicologia E Segurança Farmacológica Necessários Ao Desenvolvimento De Medicamentos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2013.
8. Venkatesh P, Shantala B, Jagetia GC, Rao KK, Baliga MS. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by Aegle marmelos in mouse bone marrow: a micronucleus study. Integr Cancer Ther. 2007;6(1):42-53.
9. MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, Margolin BH, Ramel C, Salamone MF, et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. Mutation Research [revista em internet]. 1987 [acesso em 26 de novembro de 2019];189(2):103-12. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0165121887900164>.
10. Mersch-Sundermann V, Kassie F, Bohmer S, Lu WQ, Wohlfahrth R, Sobel R, et al. Extract of Toxicodendron quercifolium caused genotoxicity and antigenotoxicity in bone marrow cells of CD1 mice. Food Chem Toxicol [revista em internet]. 2004 [acesso em 29 de outubro de 2019];42(10):1611-7.
11. Waters MD, Brady AL, Stack HF, Brockman HE. Antimutagenicity profiles for some model compounds. Mutat Res Genet Toxicol. 1990;238(1):57-85.
12. Maciel MAM, Pinto CA, Veiga Junior VF. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Quim nova [revista em internet]. 2002 [acesso em 01 de dezembro de 2019];25(3):429-38. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422002000300016&script=sci_abstract&tlng=pt.
13. Grawe J. Flow cytometric analysis of micronuclei in erythrocytes. Methods Mol Biol [revista em internet]. 2005 [acesso em 02 de dezembro de 2019];291(1): 69-83. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15502213>.
14. Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. Mutagênese ambiental. 1 ed. Vol 1. Canoas: ULBRA; 2003.
15. Flores M, Yamaguchi UM. Micronucleus test: an evaluation for genotoxic screening. J Health [revista em internet]. 2008 [acesso em 27 de novembro de 2019]; 1(3):337 - 40.
16. Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H. Doxorubicin (Adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. Pharmacol Ther [revista em internet]. 1990 [acesso em 24 de novembro de 2019]; 47(2): 219-31. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2203071>.

17. Eliot H, Gianni L, Myres C. Oxidative destruction of DNA by the adriamycin-iron. *Biochemistry* [revista em internet]. 1984 [acesso em 23 de novembro de 2019];28;23(5):928-36. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6324858>.

18. Myers CE, McGuire WP, Liss RH, Iffrim I, Grotzinger K, Young RC. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* [revista em internet]. 1977 [acesso em 26 de novembro de 2019]; 8;197(4299):165-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/877547>.

19. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* [revista em internet]. 1999 [acesso em 27 de novembro de 2019]; 57(7):727-41. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075079>.

20. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* [revista em internet]. 2004 [acesso em 26 de novembro de 2019];56(2):185-229. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15169927>.

21. Bruton LL, Chebner BA, Knolmann BC. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman*. 13 ed. Vol 1. Porto Alegre: AMGH Editora, 2012.

22. Tavares DC, Cecchi AO, Antunes LMG, Takahashi CS. Protective effects of the amino acid glutamine and of ascorbic acid against chromosomal damage induced by doxorubicin in mammalian cells. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis* [revista em internet]. 1998 [acesso em 23 de novembro de 2019]; 18(4):153-161. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1520-6866\(1998\)18:4%3C153::AID-TCM1%3E3.0.CO;2-P](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1520-6866(1998)18:4%3C153::AID-TCM1%3E3.0.CO;2-P).

23. Knasmüller S, Steinkellner H, Majer BJ, Nobis EC, Scharf G, Kassie F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspect and extrapolation aspect and extrapolation problems. *Food Chem Toxicol* [revista em internet]. 2002 [acesso em 26 de novembro de 2019]; 40(8):1051-62. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12067564>.

24. Reigner BG, Blesch KS. Estimating the starting dose for entry into humans: principles and practice. *Eur J Clin Pharmacol* [revista em internet]. 2002 [acesso em 23 de novembro de 2019];57(12): 835-45. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11936701>.

25. Galloway SM. Chromosome aberrations induced in vitro: mechanisms, delayed expression, and intriguing questions. *Environ Mol Mutagen* [revista em internet]. 1994 [acesso em 23 de novembro de 2019]; 23(1):44-53. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/em.2850230612>.

26. Kumar MR, Aithal K, Rao BN, Udupa N, Rao BS. Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. *Toxicol In Vitro* [revista em internet]. 2009 [acesso em 23 de novembro de 2019]; 23(2):242-50. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19121382>.

27. Silva SL, Nascimento AZ, Ribeiro EFB, Ribeiro RB, Alves CM, Santos AM, Burmann APR, Mira Nero RA. Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). *Acta Amazônica* [revista em internet]. 2016 [acesso em 16 de dezembro de 2019]; 46(1): 73 - 80. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672016000100073.

Received in january 2020.

Accepted in august 2020.

Avaliação da ação citogenética protetora da *Parahancornia fasciculata* (Apocynaceae)

Gleicyanne Furtado Frazão*
Keren Hapuque da Silva Souza*
Mayck Rian Gonçalves Magalhães**
Edwin Bryan Santos do Livramento**
Paulo de Assis Barbosa Romano**
Alessandra Azevedo do Nascimento*
Moacir de Azevedo Bentes Moonteiro Neto*

412

Resumo

A *Parahancornia fasciculata* é uma árvore frutífera de grande porte, nativa da região Amazônica, onde é conhecida popularmente como “Amapazeiro”. É amplamente utilizada na medicina popular auxiliando no tratamento de diversas patologias: malária, problemas pulmonares, entre outras enfermidades. Assim, considerando o uso costumeiro desta planta, o presente estudo avaliou a ação citogenética protetora da *Parahancornia fasciculata* em eritrócitos policromáticos de camundongos Swiss. Os animais receberam diferentes concentrações da *Parahancornia fasciculata* (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg p.c) incluindo grupos controle positivo (Doxorrubicina, DXR, 16 mg/kg p.c), negativo (água) e veículo (Dimetilsulfóxido, DMSO). As dosagens foram administradas nos animais via gavagem, assim como o controle negativo e veículo; já o controle positivo foi administrado intraperitonealmente. Os animais permaneceram no tratamento diário com as respectivas doses durante 15 dias para avaliação genotóxica. Foram coletadas amostras de sangue periférico caudal nas horas: 24h, 48h, 7 e 15 dias. Para a avaliação antigenotóxica, no 14º dia os camundongos foram tratados com injeções intraperitoneal de DXR. Obteve-se coleta de amostras sanguíneas periférico caudais nas horas: 24 e 48h. Posteriormente foi feita contagem de 2 mil eritrócitos policromáticos por animal de cada grupo, para avaliação da frequência de Micronúcleos. Os resultados demonstraram que o extrato metanólico da *Parahancornia fasciculata* não foi genotóxico, pois não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao controle negativo. Os animais tratados com as diferentes concentrações do extrato da *Parahancornia fasciculata* associados a DXR, obtiveram uma redução de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados significativa quando comparado ao controle positivo. Portanto, o extrato metanólico da *Parahancornia fasciculata* demonstrou ação protetora frente aos danos no DNA induzidos pela DXR e não demonstrou efeito genotóxico.

Palavras-chave: Antigenotoxicidade. Genotoxicidade. Micronúcleo.

INTRODUÇÃO

O Brasil é responsável por 15 a 20% da biodiversidade total do mundo, com cerca de 60.000 plantas existentes na flora brasileira, dessas apenas 4.800 espécies foram estudadas quanto aos seus compostos bioativos. Neste contexto, é notório o imperativo de desenvolver

pesquisas objetivando avaliar o potencial terapêutico de plantas medicinais¹.

Dentre as plantas pouco estudadas está a *Parahancornia fasciculata*, é uma árvore de grande porte, frutífera, nativa da região Amazônica, possui tronco ereto e elevado,

DOI: 10.15343/0104-7809.202044412420

*Universidade Federal do Amapá - UNIFAP. Macapá - AP, Brasil.

**Faculdade Estácio de Macapá. Macapá - AP, Brasil.

E-mail: gleicyannefrazao@hotmail.com

sendo a copa formada por muitos galhos opostos e independentes entre si². As folhas são lanceoladas, opostas, com 12 a 15 nervuras secundárias maiores³. Os frutos são globosos, com cerca de 8 cm de diâmetro, a semente apresenta coloração marrom-escura e amarelo-claro, podendo conter borda marrom com o centro amarelo. Morfológicamente, lisa, ovoide-achatada, hilo do tipo central e ovalado⁴.

A espécie é conhecida popularmente como “Amapazeiro”, “Mapá” ou “Amapá”, suas cascas produzem um exsudato medicinal em forma de látex que é popularmente chamado de “Leite do Amapá” e é utilizado na medicina popular na cura de Malária, problemas pulmonares, gastrite, fraqueza e cicatrização⁵. As atividades biológicas embora tenham sido observadas empiricamente, podem ser explicadas cientificamente em função da composição química da *Parahancornia fasciculata*⁶.

No extrato diclorometânico da casca e do látex foram isolados e identificados os triterpenos pentacíclicos lupeol, β -amirina e α -amirina e seus derivados acetilados⁶. Utilizando a mesma metodologia, das raízes foram isolados os esteroides β -sitosterol, stigmasterol e β -sitosterona. Em outro estudo, usando extrato metanólico, identificou-se uma grande quantidade de mistura de carboidratos, metilmioinositol e derivados de feniletanóides tendo como principal constituinte o cornosídeo⁶.

Estudos sobre a avaliação da ação citogenética protetora da espécie *Parahancornia fasciculata* não são relatados na literatura científica, o que tornou necessária a realização desta pesquisa em função do cumprimento de etapas para registro de um provável fitoterápico a base desta planta junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁷.

Uma vez que testes citogenéticos são uma condição para a segurança e viabilização de registro e comercialização de qualquer medicamento, esta pesquisa propôs avaliar as atividades genotóxica e antígenotóxica do extrato metanólico das folhas de *Parahancornia fasciculata* em eritrócitos policromáticos de camundongos Swiss.

MATERIAL E MÉTODOS

Agente químico indutor de danos cromossomos no DNA in vivo

A ampola DXR contendo 50 mg a 98% de pureza foi adquirida da Sare Drogarias Ltda, São Paulo, SP, Brasil. Este composto dissolvido em água destilada foi utilizado como indutor de micronúcleos em células sanguíneas periféricas de camundongos (controle positivo). A dose de DXR (16 mg/kg de peso corpóreo, p.c.) foi selecionada com base em sua eficácia na indução de danos cromossômicos⁸.

Avaliação da Frequência dos Eritrócitos Policromáticos

O ensaio do micronúcleo de sangue periférico foi realizado conforme o protocolo descrito por MacGregor *et al.*^{9,10}. Uma soma de 2000 eritrócitos policromáticos (EPCs) foi analisada por animal para determinação da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCsMN). Um total de 400 eritrócitos por animal foram pontuados para calcular o índice de Divisão Nuclear [IDN, EPC/EPC+ENC (Eritrócitos normocromáticos) para determinar a citotoxicidade do tratamento¹¹. As lâminas foram analisadas cegamente usando microscópio óptico com objetiva de imersão de 100x.

Para avaliação protetora, o percentual de redução na frequência de EPCsMN foi calculado, usando a fórmula:

$$\% \text{ redução} = \frac{\text{Frequência de EPCsMN em A} - \text{frequência de EPCsMN em B}}{\text{Frequência de EPCsMN em A} - \text{frequência de EPCsMN em C}} \times 100$$

Onde A corresponde ao grupo tratado com DXR (controle positivo), B corresponde ao grupo tratado com *Parahancornia fasciculata* e DXR e o C corresponde ao grupo tratado com água (controle negativo).

Obtenção do extrato metanólico das cascas do caule da *Parahancornia fasciculata* (Apocynaceae)

As cascas do caule de *Parahancornia fasciculata* foram coletadas no município de Macapá-AP, no KM 09, com localização GPS: Lat.00° 04' 06.2'' S Long.: 51° 08' 01.5'' W. A partir do espécime coletado preparou-se uma excisada, a qual era composta com galhos da espécie citada. Estes galhos, após limpeza, secaram por compressão, e na sequência foram encaminhados e depositados com N° 019140 no Herbário Amapaense do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá.

As cascas do caule de *Parahancornia fasciculata* coletadas secaram em estufa de ar circulante a 45°C até a sua completa desidratação.

Após a secagem, as cascas foram trituradas num moinho de facas, e o material triturado foi macerado com álcool metílico (líquido extrator), numa proporção de 1:5 (1 kg de material vegetal/5 L de metanol). A mistura foi homogeneizada durante 10 dias, com objetivo de quebrar as zonas de concentração dentro do frasco, proporcionando melhor contato do solvente com o material vegetal.

Após a maceração, a solução extrativa foi filtrada a vácuo. Em seguida, colocou-se o líquido em um evaporador rotatório (Q344b2, Quimis) a 78 rpm e 60°C com a finalidade de remover todo o solvente através de sua evaporação, resultando no extrato metanólico das cascas de *Parahancornia fasciculata*.

Animais utilizados no experimento

Para realização do experimento adquiriu-se camundongos Swiss machos pesando aproximadamente 25 gramas. Os animais foram provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigações Biológicas na Área da Ciência de Animais de Laboratório- CEMIB da Universidade de Campinas- UNICAMP. Os camundongos permaneceram em gaiolas coletivas em uma sala experimental em quarentena, sob condições controladas de temperatura (23 ± 2 oC), umidade ($50 \pm 10\%$), 12 horas de ciclo claro-escuro, com acesso *ad libitum* a ração e água. O projeto foi submetido ao comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amapá (CEUA/ UNIFAP) de acordo com o que preconiza a Lei Arouca 11.794/2008 que regulamenta o uso de animais em pesquisa, aprovado e protocolado com o número 14/2017.

Delineamento experimental

Os camundongos Swiss ficaram divididos em diferentes grupos experimentais de seis animais cada. As doses de *Parahancornia fasciculata* foram selecionadas com base nas diretrizes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)⁸. A fim de investigar a sua potencial genotoxicidade, a *Parahancornia fasciculata* foi administrada por gavagem em um volume de 0,5 ml por 25g de peso em doses de 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg de p.c por dia para cada animal durante 15 dias. Amostras de sangue periférico eram coletadas as 24 e 48 horas e 7 e 15 dias após o início do tratamento. Para avaliação protetora, os animais tratados com diferentes concentrações de *Parahancornia fasciculata* receberam DXR (16mg/kg de

p.c); intraperitoneal; (0,3 ml por 25 g p.c) no 14º dia. As amostras de sangue periférico foram coletadas após 24 e 48 horas do tratamento com DXR. As diferentes doses de *Parahancornia fasciculata* foram preparadas a partir de uma solução estoque de 400 g. O grupo veículo foi tratado por gavage (0,5ml por 25g de p.c.) com a mesma quantidade de DMSO usada para preparar 2000 mg de *Parahancornia fasciculata* por kg/p.c.

Análise estatística

Os dados passaram por testes de normalidade e homogeneidade das variâncias, para verificar a natureza paramétrica dos dados. Após essas análises estatísticas eles se submeteram a análise de variância para experimentos inteiramente aleatorizados (ANOVA), com cálculos da estatística F e de seu respectivo “p-value”. Nos casos que $p \leq 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa $p=0,05$, usando o programa Graph Pad Prism®.

RESULTADOS

Não se observou nenhuma diferença estatisticamente significativa na indução de micronúcleos entre os grupos tratados com diferentes doses de *Parahancornia fasciculata*

e o controle negativo ($P > 0,05$; Tabela 1). Estes achados indicaram a ausência de efeito genotóxico das diferentes concentrações da *Parahancornia fasciculata* em diferentes tempos de amostragem utilizados no presente estudo.

Com a realização de uma única dosagem via intraperitoneal de DXR associado à administração por gavage de cada concentração do extrato de *Parahancornia fasciculata* pôde ser observada uma redução entre 43,76% a 50,68% para o tratamento de 24 horas e em 48 horas foi de 51,50% a 63,62% (Tabela 2), quando comparada ao grupo de animais tratados apenas com DXR. Vale ressaltar que não houve um aumento na redução de genotoxicidade nos períodos de 24h e 48h em relação ao aumento das dosagens de extrato, indicando assim uma falta de relação dose-resposta. Nos testes de ação protetora, onde foi utilizada doxorubicina observou-se que a frequência de Eritrócito Policromáticos Micronucleados (EPCMNs) foi menor em animais tratados com DMSO + DXR do que nos tratados apenas com DXR, porém essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Para a avaliação citotóxica os resultados de índice de divisão nuclear (IDN), no tratamento de 24h, 48h, 7 e 15 dias (tabela 3) e 24 e 48h (tabela 4) associados com DXR, não foram observadas diferenças entre os grupos tratados com as concentrações do extrato metanólico de *Parahancornia fasciculata* e seus respectivos controles, demonstrando ausência de citotoxicidade.

Tabela 1 – Frequência de Eritrócito Policromáticos Micronucleados (EPCMN) em sangue periférico de camundongos Swiss machos, tratados com as diferentes concentrações de *Parahancornia fasciculata* e seus respectivos controles após 24, 48 h, e 7 e 15 dias após tratamento.

Tratamento (mg.kg'p.c.)	EPCMN/1000 EPCs ^a			
	24h	48h	7 dias	15 dias
Controle	1,08 ± 0,79	1,17 ± 0,71	1,17 ± 0,71	1,08 ± 0,79
DMSO	0,92 ± 0,90	0,91 ± 0,90	1,25 ± 0,45	1,25 ± 0,45
<i>P. fasciculata</i> 250 mg	1,67 ± 0,77	1,33 ± 0,49	1,33 ± 0,49	1,50 ± 0,52
<i>P. fasciculata</i> 500 mg	2,25 ± 0,75	1,83 ± 0,71	1,33 ± 0,49	1,33 ± 0,49
<i>P. fasciculata</i> 1000 mg	2,00 ± 0,85	1,67 ± 0,49	1,67 ± 0,49	1,67 ± 0,65
<i>P. fasciculata</i> 2000 mg	2,75 ± 1,06	1,67 ± 0,49	1,67 ± 0,49	1,33 ± 0,65
DRX				24,8 ± 0,86*

Dois mil EPCs foram analisados por animal, para o total de 12000 células por grupo;
^aValores de média ± desvio padrão;
^{*}Diferença estatisticamente significativa quando comparado com o controle (P < 0,05);
 DXR, Doxorubicina;
 DMSO, Dimetilfulfóxido.

Tabela 2 – Frequência de Eritrócito Policromáticos Micronucleados (EPCMN) em sangue periférico de camundongos Swiss machos tratados com as diferentes concentrações *Parahancornia fasciculata* e seus respectivos controles após 24, 48 horas dos tratamentos.

Tratamento (mg.kg'p.c.)	EPCsMN/1000 EPCs ^{a,b}			
			REDUÇÃO 100%	
	24h	48h	24h	48h
Controle	1,1 ± 0,80	1,8 ± 0,72	-	-
DMSO + DXR	22,8 ± 0,70 ^c	24,2 ± 1,03 ^c	-	-
DXR	23,2 ± 1,19 ^c	24,5 ± 0,90 ^c	-	-
<i>P. fasciculata</i> 250mg + DXR	13,5 ± 1,24 ^{c,d}	12,5 ± 1,24 ^{c,d}	43,76%	51,50%
<i>P. fasciculata</i> 500mg + DXR	13,1 ± 0,90 ^{c,d}	12,1 ± 1,16 ^{c,d}	45,70%	53,22%
<i>P. fasciculata</i> 1000mg + DXR	13,0 ± 1,04 ^{c,d}	11,7 ± 1,83 ^{c,d}	46,15%	54,94%
<i>P. fasciculata</i> 2000mg + DXR	12,4 ± 1,04 ^{c,d}	9,67 ± 0,98 ^{c,d}	50,68%	63,52%

^aValores de média ± desvio padrão;
^bDois mil EPCs quando analisado por animal, para o total de 12000 células por grupo;
^cDiferença estatisticamente significativa frente ao grupo Controle (p value);
^dDiferença estatisticamente significativa frente ao grupo DXR.

Tabela 3 – Frequência de Índice de Divisão Celular – IDN em sangue periférico de camundongos Swiss machos tratados com as diferentes concentrações *Parahancornia fasciculata* e seus respectivos controles após 24, 48 h, 7 e 15 dias dos tratamentos.

CONCENTRAÇÃO mg/kg p.c	24 horas ^{a,b}	48 horas ^{a,b}	7 dias ^{a,b}	15 dias ^{a,b}
Controle	0.11 ± 0.05	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.02
DMSO	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.02
DRX				0,09 ± 0,02
<i>P. fasciculata</i> 250 mg	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.02
<i>P. fasciculata</i> 500 mg	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.01
<i>P. fasciculata</i> 1000 mg	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.01
<i>P. fasciculata</i> 2000 mg	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.01

Controle Positivo (DXR);
 Veículo (DMSO) Dimetilsulfóxido.
^a400 eritrócitos foram analisados por animal, para um total de 2400 células por tratamento (EPC/EPC + ENC);
^bValores de média ± desvio padrão.

Tabela 4 – Frequência de Índice de Divisão Celular – IDN em sangue periférico de camundongos Swiss machos tratados com as diferentes concentrações *Parahancornia fasciculata* associado a DXR e seus respectivos controles após 24, 48 h dos tratamentos.

CONCENTRAÇÃO mg/kg p.c	24 horas ^{a,b}	48 horas ^{a,b}
Controle Negativo	0.11 ± 0.05	0.09 ± 0.01
DXR	0,08 ± 0.02	0,08 ± 0.02
DMSO + DXR	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01
<i>P. fasciculata</i> 250 mg + DXR	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01
<i>P. fasciculata</i> 500 mg + DXR	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.01
<i>P. fasciculata</i> 1000 mg + DXR	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.02
<i>P. fasciculata</i> 2000 mg + DXR	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.01

Controle Positivo (DXR);

Veículo (DMSO) Dimetilsulfóxido;

^a400 eritrócitos foram analisados por animal, para um total de 2400 células por tratamento (EPC/EPC + ENC);

^bValores de média ± desvio padrão.

DISCUSSÃO

Os testes pré-clínicos são de fundamental importância na triagem de estudos de plantas medicinais¹². Dentre os ensaios toxicológicos estão os citogenéticos como o teste de micronúcleo. A metodologia por indução do micronúcleo em eritrócitos do sangue periférico tem sido utilizada para a avaliação das atividades genotóxicas e antigenotóxicas por ser eficaz para a identificação de agentes capazes de induzir ou prevenir danos cromossômicos¹³.

O teste do micronúcleo tem como característica avaliar efeitos de determinadas substâncias, as quais são observados em EPCs, que por sua vez apresentam um tempo de vida curto indicando dessa forma danos induzidos recentemente¹⁴.

A presença de micronúcleo caracteriza como resultado gerado danos induzidos nos cromossomos, sendo estes capazes de quebrar

cromossomos ou afetar a formação da placa metafásica e ainda comprometer os fusos mitóticos responsáveis na distribuição desigual de cromossomos durante o processo de divisão celular¹⁵.

Os resultados também mostram que o extrato da *Parahancornia fasciculata* provoca uma redução significativa na frequência de EPCMNs induzidos por DXR, embora os mecanismos subjacentes aos efeitos protetores (antigenotóxicos) da *Parahancornia fasciculata* não sejam completamente entendidos, sendo as propriedades dos compostos desta planta provavelmente responsáveis pelos efeitos observados no presente estudo. A atividade genotóxica do agente quimioterápico DXR foi atribuída à sua capacidade de produzir radicais livres¹⁶, que causam diferentes danos celulares, incluindo a clivagem do DNA. A Estrutura química da DXR favorece a geração de radicais livres e o composto pode ligar-se ao ferro e formar complexos com DNA, induzindo quebra da dupla fita¹⁷. Alguns estudos têm demonstrado que o dano oxidativo está provavelmente relacionado à formação de radicais livres, acompanhado de redução da capacidade de antioxidantes¹⁸. Eis alguns mecanismos considerados: (1) intercalação em DNA, levando a inibição síntese de macromoléculas; (2) geração de radicais livres, levando a danos no DNA ou peroxidação lipídica; (3) ligação do DNA e alquilação; (4) reticulação de DNA; (5) interferência com DNA desenrolamento ou separação de cadeia de DNA e atividade da helicase; (6) efeitos diretos da membrana; (7) iniciação de dano ao DNA via inibição da topoisomerase II; e (8) indução de apoptose em resposta à inibição da topoisomerase II^{19,20}.

Compreende-se então que à formação de radicais livres, que o anel da antraciclina da DXR sofre, é uma diminuição de um elétron, que podem reagir com macromoléculas teciduais²¹. Desta forma, a DXR é utilizada como indutor de micronúcleos, frequentemente usada em testes de mutagenicidade como controle positivo

sendo este o composto utilizado no referido estudo²².

Os resultados mostram que o extrato metanólico da *Parahancornia fasciculata* provocou uma redução significativa na frequência de EPCMNs induzidos por DXR. Embora muitos mecanismos subjacentes aos efeitos antigenotóxicos de *Parahancornia fasciculata* ainda não são completamente entendidos, as propriedades antioxidantes dos compostos desta planta são provavelmente responsáveis pelos efeitos observados no presente estudo.

As concentrações administradas do extrato de *Parahancornia fasciculata* não apresentaram aumentos proporcionais na redução da atividade genotóxica no período de 24h e 48h inferindo desta forma ausência em relação à dose-resposta, levando a uma biodisponibilidade inconstante do composto na célula. Por outro lado, a avaliação dos efeitos da dose é complicada pelo fato de que muitos compostos quimioprotetores atuam simultaneamente em diferentes níveis de proteção²³. Nesta base, sugere-se que a falta de dose repostada observada pode ser atribuída à ativação de diferentes mecanismos dependendo dos níveis de dose do extrato da *Parahancornia fasciculata*.

É importante considerar que a proporção de absorção de drogas diminui com aumento da superfície corporal e a relação entre a superfície corporal e o peso não é linear. Assim sendo, a conversão deve ser feita usando cálculos

alométricos para determinar a dose esperada para os seres humanos²⁴.

Os resultados do IDN obtidos neste estudo demonstraram que não houve uma redução na porcentagem de EPCs em relação ao total de eritrócitos em todos os grupos de tratamento, quando comparados aos animais do controle negativo, evidenciando ausência de potencial citotóxico dos diferentes tratamentos nas condições experimentais utilizadas.

Compostos com índice elevado de citotoxicidade são capazes de inibir totalmente células em divisão. O efeito citotóxico em ensaio é avaliado necessariamente na capacidade das células ao se dividirem²⁵, de modo que, sua citotoxicidade tem como proporção direta quanto à concentração da amostra e ao tempo de exposição²⁶.

De acordo com estudo de Silva *et al.*²⁷, foi realizado bioensaio para verificar a toxicidade preliminar do extrato da espécie *Parahancornia fasciculata* com *Artemia salina*, neste estudo demonstrou-se que através do ensaio toxicológico pré-clínico agudo na concentração de até 2000 mg/kg não apresentou efeito tóxico. Assim sendo, o presente estudo corrobora com o descrito por Silva *et al.* (2016) por ter sido realizado com concentrações menores de (250, 500, 1000 e 2000 mg/kg p.c) do extrato da espécie de *Parahancornia fasciculata* para a investigação dos ensaios toxicológicos complementares.

CONCLUSÃO

Com efeito, o presente estudo demonstrou que os extratos da *Parahancornia fasciculata*, não apresentaram efeitos genotóxicos, mas demonstraram eficácia na redução dos danos nos cromossomos induzidos por DXR no ensaio de micronúcleos em sangue periférico de camundongos Swiss. Embora o mecanismo exato subjacente ao efeito protetor

(antigenotóxica) do *Parahancornia fasciculata* não é completamente entendido, sua atividade antioxidante pode explicar seu efeito sobre a genotoxicidade da DXR. Portanto, a capacidade do extrato da *Parahancornia fasciculata* de reduzir a frequência de EPCMNs induzidos por DXR é uma indicação de sua promissora e potencial quimioprotetora. Mais estudos

devem ser realizados para melhor caracterizar o mecanismo de ação da *Parahancornia fasciculata* bem como quantificar seus diferentes constituintes nos níveis plasmáticos para uma implementação racional de estratégias quimiopreventivas.

REFERÊNCIAS

1. Da Silva GA, Ishikawa T, Da Silva MA. Projeto de implantação do horto de plantas medicinais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Alfenas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Alimentos e Medicamentos. Alfenas/MG, 2011.
2. Rios M, Martins-da-Silva RCV, Sabogal C, Martins J, Da Silva RN, De Brito RR, et al. Benefícios das plantas de capoeira para a comunidade Benjamin Constant, Pará, Amazônia Brasileira. Belém: CIFOR, 2001. 54p.
3. Galuppo S, Plowden C. Amapá: o fortificante da Amazônia. In: Shanley P, Medina G (Org.). Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. Belém, CIFOR, 2005. p. 92-96.
4. Matta A. Flora Médica Brasileira. 3 ed. Vol 1. Manaus: Editora Valer, 2003. p. 356.
5. Shanley P, Medina G (Ed.). Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. Cifor, 2005.
6. Carvalho MG, Velloso CRX, Braz-Filho R, Costa WF. Acyl-Hupeol esters from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). J Braz Chem Soc. 2001;12(1):556-9.
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Guia para Condução De Estudos Não Clínicos De Toxicologia E Segurança Farmacológica Necessários Ao Desenvolvimento De Medicamentos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2013.
8. Venkatesh P, Shantala B, Jagetia GC, Rao KK, Baliga MS. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by *Aegle marmelos* in mouse bone marrow: a micronucleus study. Integr Cancer Ther. 2007;6(1):42-53.
9. MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, Margolin BH, Ramel C, Salamone MF, et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. Mutation Research [revista em internet]. 1987 [acesso em 26 de novembro de 2019];189(2):103-12. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0165121887900164>.
10. Mersch-Sundermann V, Kassie F, Bohmer S, Lu WQ, Wohlfahrth R, Sobel R, et al. Extract of *Toxicodendron quercifolium* caused genotoxicity and antigenotoxicity in bone marrow cells of CD1 mice. Food Chem Toxicol [revista em internet]. 2004 [acesso em 29 de outubro de 2019];42(10):1611-7.
11. Waters MD, Brady AL, Stack HF, Brockman HE. Antimutagenicity profiles for some model compounds. Mutat Res Genet Toxicol. 1990;238(1):57-85.
12. Maciel MAM, Pinto CA, Veiga Junior VF. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Quim nova [revista em internet]. 2002 [acesso em 01 de dezembro de 2019];25(3):429-38. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422002000300016&script=sci_abstract&tlng=pt.
13. Grawe J. Flow cytometric analysis of micronuclei in erythrocytes. Methods Mol Biol [revista em internet]. 2005 [acesso em 02 de dezembro de 2019];291(1): 69-83. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15502213>.
14. Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. Mutagênese ambiental. 1 ed. Vol 1. Canoas: ULBRA; 2003.
15. Flores M, Yamaguchi UM. Micronucleus test: an evaluation for genotoxic screening. J Health [revista em internet]. 2008 [acesso em 27 de novembro de 2019]; 1(3):337 - 40.
16. Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H. Doxorubicin (Adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. Pharmacol Ther [revista em internet]. 1990 [acesso em 24 de novembro de 2019]; 47(2): 219-31. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2203071>.
17. Eliot H, Giann L, Myres C. Oxidative destruction of DNA by the adriamycin-iron. Biochemistry [revista em internet]. 1984 [acesso em 23 de novembro de 2019];28(5):928-36. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6324858>.
18. Myers CE, McGuire WP, Liss RH, Ifrim I, Grotzinger K, Young RC. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. Science [revista em internet]. 1977 [acesso em 26 de novembro de 2019]; 8;197(4299):165-7. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/877547>.
19. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. Biochem Pharmacol [revista em internet]. 1999 [acesso em 27 de novembro de 2019]; 57(7):727-41. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075079>.
20. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. Pharmacol Rev [revista em internet]. 2004 [acesso em 26 de novembro de 2019];56(2):185-229. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15169927>.
21. Bruton LL, Chebner BA, Knolmann BC. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. 13 ed. Vol 1. Porto Alegre: AMGH Editora, 2012.
22. Tavares DC, Cecchi AO, Antunes LMG, Takahashi CS. Protective effects of the amino acid glutamine and of ascorbic acid against chromosomal damage induced by doxorubicin in mammalian cells. Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis [revista em internet]. 1998 [acesso em 23 de novembro de 2019]; 18(4):153-161. Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/\(SICI\)1520-6866\(1998\)18:4%3C153::AID-TCM1%3E3.O.CO;2-P](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/(SICI)1520-6866(1998)18:4%3C153::AID-TCM1%3E3.O.CO;2-P).
23. Knasmüller S, Steinkellner H, Majer BJ, Nobis EC, Scharf G, Kassie F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens:

- methodological aspect and extrapolation aspect and extrapolation problems. *Food Chem Toxicol* [revista em internet]. 2002 [acesso em 26 de novembro de 2019]; 40(8):1051-62. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12067564>.
24. Reigner BG, Blesch KS. Estimating the starting dose for entry into humans: principles and practice. *Eur J Clin Pharmacol* [revista em internet]. 2002 [acesso em 23 de novembro de 2019]; 57(12): 835-45. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11936701>.
25. Galloway SM. Chromosome aberrations induced in vitro: mechanisms, delayed expression, and intriguing questions. *Environ Mol Mutagen* [revista em internet]. 1994 [acesso em 23 de novembro de 2019]; 23(1):44-53. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/em.2850230612>.
26. Kumar MR, Aithal K, Rao BN, Udupa N, Rao BS. Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. *Toxicol In Vitro* [revista em internet]. 2009 [acesso em 23 de novembro de 2019]; 23(2):242-50. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19121382>.
27. Silva SL, Nascimento AZ, Ribeiro EFB, Ribeiro RB, Alves CM, Santos AM, Burmann APR, Mira Nero RA. Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). *Acta Amazônica* [revista em internet]. 2016 [acesso em 16 de dezembro de 2019]; 46(1): 73 - 80. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672016000100073.

Recebido em janeiro de 2019.
Aceito em agosto de 2020.