

# Avaliação do efeito carcinogênico e/ou anticarcinogênico do látex de *Himatanthus obovatus* em células somáticas de *Drosophila melanogaster* e o teor de sua atividade antioxidante, flavonoides totais e taninos totais

*Evaluation of the carcinogenic and/or anticarcinogenic effect of Himatanthus obovatus latex on somatic cells of Drosophila melanogaster and the content of its antioxidant activity, total flavonoids, and total tannins*

RAYANE APARECIDA DE QUEIROZ CHAVES

Discente do curso de Engenharia Química (UNIPAM)

E-mail: rayanequeiroz@unipam.edu.br

MARIA PERPÉTUA OLIVEIRA RAMOS

Professora orientadora (UNIPAM)

E-mail: perpetor@unipam.edu.br

---

**Resumo:** *Himatanthus obovatus*, nativa do cerrado, conhecida como “tiborna”, é produtora de látex, o qual é utilizado na medicina popular. Este trabalho objetivou investigar, pelo Teste de Tumor Epitelial em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, o efeito carcinogênico e/ou anticarcinogênico do látex e determinar teores de flavonoides, taninos e atividade antioxidante. O ETT foi realizado nas concentrações isoladas de 1,25; 2,5; 5 e 10 mg/mL e 1,25; 2,5; 5 mg/mL, associadas à doxorubicina, com larvas do cruzamento de fêmeas *wts/TM3* com machos *mwh/mwh*. Para quantificar flavonoides, utilizou-se a curva de quercetina; taninos pela metodologia de Wissing (1995); atividade antioxidante pelo sequestro do reagente DPPH e o IC<sub>50</sub> pelas equações de reta obtidas pelo DPPH em função das concentrações. Os resultados mostraram diferenças significativas na frequência de tumores nas concentrações do látex associadas com DXR, quando comparado ao controle positivo. O teor de flavonoides foi de 12,65%, para taninos, 3,05%; atividade antioxidante, 87,33%, com IC<sub>50</sub> de 2,05 mg/L. Foi possível concluir que o látex de *H. obovatus* exerceu efeito modulador sob ação da DXR, sendo justificada por meio dos resultados obtidos pela atividade antioxidante.

**Palavras-chave:** atividade antioxidante; gene *WTS*; quimioprevenção.

**Abstract:** *Himatanthus obovatus*, native to the cerrado biome, known as “tiborna”, produces latex, which is used in folk medicine. This study aimed to investigate, through the Epithelial Tumor Test in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, the carcinogenic and/or anticarcinogenic effect of the latex and to determine levels of flavonoids, tannins, and antioxidant activity. The ETT was performed at isolated concentrations of 1.25, 2.5, 5, and 10 mg/mL and 1.25, 2.5, 5 mg/mL, associated with doxorubicin, with larvae from the cross of *wts/TM3* females with *mwh/mwh* males. To quantify flavonoids, the quercetin curve was used; tannins by the methodology of Wissing (1995); antioxidant activity by the DPPH reagent sequestration and IC<sub>50</sub> by the straight

line equations obtained by DPPH as a function of the concentrations. The results showed significant differences in tumor frequency at the concentrations of latex associated with DXR when compared to the positive control. The flavonoid content was 12.65%, for tannins, 3.05%; antioxidant activity, 87.33%, with an IC<sub>50</sub> of 2.05 mg/L. It was possible to conclude that the latex of *H. obovatus* exerted a modulating effect under the action of DXR, justified by the results obtained by the antioxidant activity.

**Keywords:** antioxidant activity; WTS gene; chemoprevention.

---

## 1 INTRODUÇÃO

O cerrado ocupa cerca de uma área de milhões de km<sup>2</sup>, aproximadamente 22% do território nacional. É considerado o segundo maior bioma brasileiro e se localiza em uma grande área central do Brasil, fazendo fronteira com outros importantes biomas, como Amazônia, Caatinga, Pantanal e Mata Atlântica (MEDEIROS, 2011).

Com a expansão da fronteira agrícola, a região dos cerrados brasileiros passou a ser ocupada pela produção agropecuária em larga escala, em destaque para a produção de soja. Desse modo, esse bioma vem cada vez mais perdendo o seu espaço no país, abrigando uma diversidade muito grande de plantas medicinais com potencial farmacológico.

A planta medicinal, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é toda planta ou de suas partes que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica (BRASIL, 2021). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial faz uso de algum tipo de planta medicinal.

O emprego de plantas medicinais na recuperação tem evoluído ao longo dos tempos. No Brasil, a utilização dessas plantas para o tratamento de enfermidades vem sendo realizada por séculos pelas culturas africanas, chinesas, egípcias, gregas, indianas e indígenas. As plantas medicinais são consideradas, por significativa parcela da população, um produto natural. São importantes para a pesquisa farmacológica e para o desenvolvimento de drogas, quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos e como matérias-primas para a síntese ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (FONSECA; GIOTTO, 2021).

Cerca de 82% da população brasileira utilizam produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde, seja pelo conhecimento tradicional e popular que é transmitido entre gerações, seja pelos sistemas oficiais de saúde, como prática de cunho científico, orientada pelos princípios e diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS) (MOARES; KARSTEN; CASALI, 2016).

Como consequência dessa exploração, há exportação de um volume considerado de várias espécies medicinais na forma bruta ou de seus subprodutos. No entanto, poucas dessas espécies chegam ao nível de ser cultivadas, mesmo em pequena escala. Esses fatos tornam-se mais intrigantes quando voltados para as espécies nativas, cujas pesquisas básicas ainda são incipientes.

Entre essas plantas está a espécie arbórea *Himatanthus obovatus*, pertencente à família Apocynaceae, nativa do cerrado na região Centro-oeste e nas savanas

amazônicas. Tem como nome popular “leiteira”, “tiborna” ou “pau de leite” (CARMO *et al.*, 2005).

As plantas possuem compostos bioativos, como vitaminas, compostos fenólicos e pigmentos, que, são em sua maioria, metabólitos especiais, geralmente estão relacionados com os sistemas de defesa contra a radiação ultravioleta, agressões de insetos ou patógenos, mas nos seres humanos, em baixas concentrações, desempenham um importante papel de proteção como agentes antioxidantes, capazes de retardar ou inibir a oxidação de diversos substratos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

No cenário atual, verificam-se poucos estudos que comprovam a presença de alguns metabólitos especiais na espécie *Himatanthus obovatus*. No entanto, a referida espécie, pertencente à família Apocynaceae, já apresenta estudos farmacológicos que demonstram evidências das atividades (i) antimicrobiana, (ii) anti-inflamatória, (iii) cicatrizante e (iv) analgésica, associadas à presença de substâncias químicas importantes, como alcaloides, cumarinas, compostos fenólicos, flavonoides, taninos, iridoides e triterpenoides (SANTOS *et al.*, 2021).

Tendo em vista que os compostos fenólicos podem apresentar atividade antioxidante, tratamentos efetivos contra alguns tipos de câncer são realizados com essas fontes fitoquímicas pois os radicais livres, que podem ser sequestrados por compostos antioxidantes, são considerados potentes agentes carcinogênicos.

O presente estudo é importante para a sociedade porque, além de conscientizar sobre o aumento dos casos de câncer, estabelece uma forma natural de tratamento e prevenção, ampliando o conhecimento científico sobre vegetação do cerrado, a fim de aproveitar de forma eficiente os benefícios naturais e de apoiar estudos relacionados à etnobotânica. Aliado a essas informações e à expressiva utilização dessa planta pela população local para restabelecimento da saúde, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o seu efeito carcinogênico e/ou anticarcinogênico *in vivo*, investigar a atividade antioxidante, flavonoides e taninos totais do látex de *Himatanthus obovatus*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A coleta do látex de *Himatanthus obovatus* foi realizada em Tabocas, distrito de Presidente Olegário (MG), com as coordenadas geográficas 18°2'57"S e 46°29'26"W. A identificação da planta foi realizada pela professora Dra. Lorryne de Barros Bosquetti e tombada com n. 356.13.2 no Herbário *Mandevilla sp.*, situado no segundo piso do bloco M do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM). Foi feita manualmente, retirando folhas do caule e coletando o látex liberado pelo corte em frascos de vidro previamente pesados e higienizados. Após a coleta, o material vegetal foi mantido ao abrigo da luz à temperatura de 10°C para evitar o processo de oxidação.

## 2.2 ESTUDO GENÉTICO

### 2.2.1 Agentes químicos

A Cloridrato de Doxorrubicina (DXR) (CAS 25316-40-9; lote 2110359), conhecida comercialmente como Fauldoxo®, foi fabricada e embalada pela LIBBS FARMACÊUTICA, São Paulo, Brasil. O Glicerol (CAS 56-81-5) foi obtido na Sigma-Aldrich®, Brasil Ltda.

### 2.2.2 Teste de Tumor Epitelial (ETT) em *Drosophila melanogaster*

#### 2.2.2.1 Cruzamentos e tratamentos

Inicialmente, realizou-se um cruzamento para obter a progênie larval experimental; machos *mwh/mwh* foram cruzados com fêmeas virgens *wts*, TM3, *Sb1* (EEKEN *et al.*, 2002). A linhagem WTS foi adquirida pelo Bloomington *Drosophila* Stock Center da Universidade de Indiana (EUA), registrado sob o número Bloomington/7052.

A oviposição ocorreu durante 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (ágar a 4% em água) e uma camada de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) suplementada com sacarose. Após 72±4h, larvas de terceiro estágio foram lavadas com água ultrapura e coletadas em uma peneira de malha fina.

Realizou-se um ensaio para averiguar a toxicidade do látex de *Himatanthus obovatus*. Para calcular a taxa de sobrevivência, as larvas foram contadas antes da distribuição em tubos de vidro contendo meio de cultura alternativo, preparado com purê de batata instantâneo Yoki® Alimentos S. A. (SPANÓ *et al.*, 2001) e diferentes concentrações do referido látex. Tendo em vista o coeficiente de solubilidade, a maior concentração utilizada foi de 10mg/ml, e as demais tiveram diluição fracionada e isolada em água ultrapura ou em associação com DXR (0,4 mM).

Para o ETT, as concentrações do extrato de *Himatanthus obovatus* foram baseadas no ensaio de sobrevivência. Os tratamentos foram realizados em um experimento com duas repetições, envolvendo quatro concentrações do látex isoladas 1,25; 2,5; 5 e 10mg/L e três concentrações do látex em associação 1,25; 2,5; 5mg/L com DXR (0,4 mM) (para cotratamentos). Dois controles foram incluídos: (1) controle negativo (água ultrapura) e (2) controle positivo (DXR 0,4 mM). A DXR foi diluída em água.

#### 2.2.2.2 Análise das moscas

Apenas as moscas emergentes com pelos longos e finos foram analisadas por serem portadoras do gene *WTS* e não possuírem o balanceador cromossômico (TM3, *Sb1*). Os indivíduos foram armazenados em etanol e, posteriormente, analisados em lâminas côncavas contendo glicerol, mediante visualização com microscópio estereoscópico (Bel® Photonics) para contagem de tumores. A presença de tumores foi avaliada e registrada em uma planilha padrão.

As frequências de tumores epiteliais observados nos indivíduos tratados com as diferentes concentrações do extrato de *Himatanthus obovatus* isoladas ou associadas

com DXR foram comparadas estatisticamente com as frequências de tumores epiteliais observados nos indivíduos tratados com o controle negativo e com o controle positivo, respectivamente. Utilizou-se o Teste *U* não paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância  $p \leq 0,05$ .

### 2.2.3 Viabilidade técnica

O Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), Patos de Minas (MG), dispõe de todos os equipamentos (estufas, autoclaves, banho-maria, microscópios ópticos de luz, lupas estereoscópicas, chapas aquecedoras, entre outros) e de linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*, necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

## 2.3 ESTUDO QUÍMICO

### 2.3.1 Preparo do látex para análises qualitativas

Para o preparado do látex diluído, o material foi submetido à pesagem de 16g e solubilizado em água destilada e transferido para um balão de 100 mL aferido até o menisco, constituindo uma amostra na concentração de 160 mg/L.

Para estudo químico, foram utilizados balança marca AD200 - Marte Científico e instrumentação industrial Ltda.; estufa Icamo, modelo 5 - qualidade Famo; - Fisatom; câmara UV SL 204; espalhador de sílica; estufa para esterilização e secagem EL 1.6.

Os reagentes utilizados foram hidróxido de sódio - Vetec; anidrido acético - Vetec; ácido sulfúrico - Êxodo; ácido clorídrico - Moderna; solução alcoólica de cloreto de ferro; difenilboriloxietilamina (NP) - Sigma aldrich; solução de polietilenoglicol; etanol - Dinâmica; solução alcoólica de cloreto de ferro; acetona P. A. - Êxodo; diclorometano - Dinâmica; metanol - Êxodo; peróxido de hidrogênio - Vetec; sílica gel 60 (0,2 - 0,5 mm) - Vetec; sílica gel 60 para cromatografia em camada fina - marca Vetec.

O estudo foi realizado no laboratório de Química Orgânica, no 2º piso do bloco M do UNIPAM.

### 2.3.2 Ensaios químicos qualitativos

Os ensaios químicos para avaliar a presença dos metabólitos especiais foram realizados por meio de métodos convencionais de identificação desses compostos através de mudança de cor e/ou formação de precipitados, sendo a avaliação para flavonoides (reação de ácido clorídrico com fita de magnésio), taninos totais (reação com cloreto férrico), cumarinas (extração com éter etílico, observação sob UV) (RAMOS *et al.*, 2016).

Para se caracterizarem os flavonoides totais, utilizou-se da reação de Shinoda, foram transferidos para um tubo de ensaio 2 mL do extrato, e de duas fitas de magnésio (Mg metálico) de 1 cm e 1 mL de HCl concentrado. O aparecimento de coloração rósea-avermelhada indica resultado positivo para flavonoides. Para teste de confirmação,

utilizou-se do método reagente NP/PEG; o resultado foi observado sob luz ultravioleta (= 365nm).

Para realizar a identificação dos taninos, 3 mL do extrato foram adicionadas ao tubo de ensaio, com 3 gotas de  $\text{FeCl}_3$  0,5 mol/L em agitação por 1 minuto. A mudança de coloração da mistura para azul escuro indica a presença de taninos hidrolisados, e verde indica presença de taninos condensados.

Para identificar a presença de cumarinas, utilizou-se de 2 mL do extrato com três alíquotas de 10 ml de éter etílico. Deixou-se concentrar em banho-maria até reduzir o extrato etílico a cerca de 5 mL. Adicionou 0,5 ml de metanol no extrato obtido, foi colocado em gotas em um papel filtro; em um dos lados do papel filtro foi adicionado 1 mL de NaOH a 0,1 mol/L. O papel foi levado a uma câmara UV no comprimento de onda de 365 nm e foi observado. A presença de cor azul-esverdeada ultravioleta na mancha que continha a fase etérea e o NaOH indica resultado positivo.

#### 2.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

Para realizar a determinação de flavonoides totais, de acordo com Savi *et al.* (2017), foi utilizada uma solução na concentração de 160 mg/L dos extratos em uma solução extratora de diclorometano e metanol (3:1).

Foram misturados 2 mL de cloreto de alumínio a 5% (m/v) em 2 mL das soluções do extrato, determinando-se assim a absorbância em 425 nm contra um branco (2 mL diclorometano:metanol (3:1) e 2 mL cloreto de alumínio 5% em metanol). Adotou-se o padrão de quercetina nas concentrações de 3 mg/L; 5 mg/L; 10 mg/L; 15 mg/L; 20 mg/L; 25 mg/L; 30 mg/L; 50 mg/L; 60 mg/L e 100 mg/L, para se construir a curva de calibração no espectrofotômetro UV-Vis.

#### 2.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TANINOS TOTAIS

Para determinação dos taninos totais, a metodologia seguida foi a de Wissing (1955). Uma solução foi preparada a partir de 10 mL da solução do látex com diclorometano e metanol (3:1) para um balão de 50mL. Foram adicionados à solução em fervura a 100°C em agitador magnético, 2mL de formaldeído a 37% e 1 mL de HCl concentrado, mantendo-se a agitação por 30 minutos. Após isso, a solução obtida foi sujeita a uma filtração simples e posteriormente a secagem do precipitado visando obter a massa constante. Para obter o teor de taninos total, utilizou-se da Equação 1.

$$\text{TSS}\% = \frac{\text{Mapx}}{\text{Mae}} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

Em que TTS% é teor de taninos condensados (%); Mapx: massa anidra do precipitado extrapolado para o volume total de extrato (g); Mae: massa anidra da amostra utilizada na extração (g).

## 2.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para avaliar a atividade antioxidante do extrato aquoso do látex de *Himatanthus obovatus*, realizou-se o estudo de consumo do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilil hidrazila) a 0,004%, fazendo a medição das absorvâncias, seguindo a metodologia adaptada de Silva *et al.* (2013) e Nascimento *et al.* (2011).

Foi preparado um extrato aquoso do látex nas concentrações, 1,25; 2,5; 5 e 10mg/L em balões volumétricos de 10 mL contendo 2 mL da solução de DPPH 0,004%. Após 30 minutos em uma câmara escura, os extratos foram levados para leitura no espectrofotômetro UV-vis a 517 nm. Para a análise associada à DXR, utilizou-se de uma solução mãe de 10mg do látex, em que foi feita uma diluição para 1,25; 2,5; 5mg/L e acrescentou de DXR a 0,4mM. Uma vez que o látex apresenta coloração branca, quando diluído em água observa-se o extrato turvo. Uma vez que o espectrofotômetro é sensível a cores e à luz, a coloração turva daria um falso positivo, dessa forma foi realizada a leitura da interferência do látex que seria a solução do látex em água sem reagentes.

Para o controle positivo do procedimento, foram utilizadas soluções padrão de quercetina nas mesmas concentrações dos extratos da planta, importante para se comparar o percentual de inibição com o branco, sendo a água destilada mais o reagente DPPH para análises isoladas e para as associadas DXR a 0,4 mM e o reagente DPPH (0,004%).

O cálculo do percentual do sequestro de radical livre foi calculado seguindo a equação 2:

$$\% AA \left( \frac{A_0 - A}{A_0} \right) = \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

Em que %AA: percentual da atividade antioxidante (%); A<sub>0</sub>: absorvância do DPPH de controle; A: absorvância da amostra juntamente com DPPH. O %AA corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que essa quantidade necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é chamada de concentração inibitória (IC<sub>50</sub>). Quanto maior o consumo de DPPH pela amostra, maior sua atividade antioxidante (AA) (SOUSA *et al.*, 2007).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

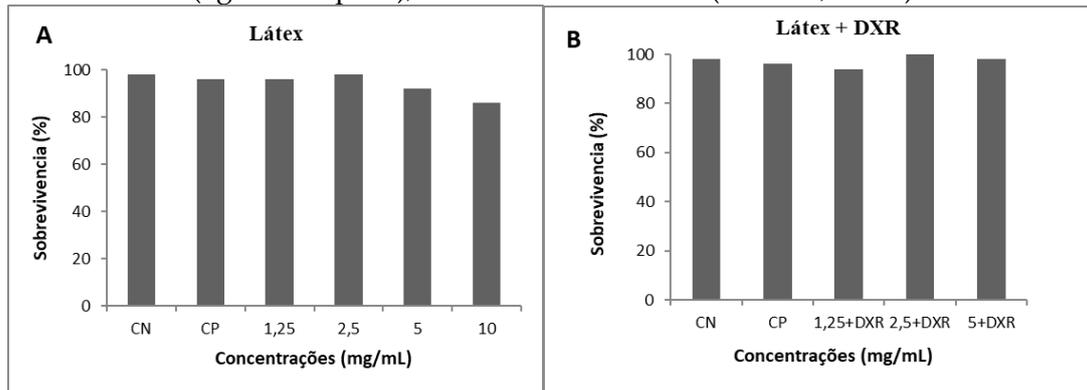
### 3.1 ESTUDO GENÉTICO: TOXICIDADE

Em *D. melanogaster*, primeiramente, foi avaliado o teste de toxicidade das diferentes concentrações do extrato aquoso isoladas (1,25; 2,5; 5 e 10 mg/mL) e associadas a DXR (1,25; 2,5; 5 mg/mL) para detecção da viabilidade dessas concentrações. A avaliação foi considerada a partir das 50 larvas por frascos que foram expostas ao composto até atingirem a fase adulta, sendo este o percentual de sobrevivência.

Demir *et al.* (2013) e Vasconcelos (2016) relatam que a sobrevivência acima de 75% de moscas adultas assegura um grande número de indivíduos para análise, podendo ser utilizada para análise do ETT. O Gráfico 1 mostra a elevada taxa de sobrevivência de moscas que atingiram a fase adulta e menor taxa de mortalidade; acima

de 86 % para os dois controles (negativo e positivo) e das quatro concentrações isoladas e em associação com DXR. Os dados ressaltados a seguir não afetaram o desenvolvimento das larvas, podendo assim ser utilizadas na realização do ETT.

**Gráfico 1:** Taxas de sobrevivência (%) de indivíduos resultantes do teste de tumor epitelial após exposição a diferentes concentrações de látex (mg/mL) isoladamente (A) e látex em combinação com DXR (doxorubicina - 0,4 mM)(B). CN: Controle Negativo (água ultrapura); CP: Controle Positivo (DXR - 0,4 Mm)



Fonte: dados da pesquisa, 2022.

### 3.1.1 Teste de Tumor Epitelial (ETT)

A Tabela 1 mostra o percentual de redução dos tumores encontrados nas diferentes partes do corpo da *D. melanogaster*, tratadas com as concentrações do látex de *H. obovatus* (1,25; 2,5; 5 e 10 mg/mL) isoladas e (1,25; 2,5; 5 mg/mL) associadas, e os respectivos controles negativo e positivo.

AVALIAÇÃO DO EFEITO CARCINOGENICO E/OU ANTICARCINOGENICO DO LÁTEX DE *HIMANTHUS OBOVATUS* EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* E O TEOR DE SUA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, FLAVONOIDES TOTAIS E TANINOS TOTAIS

**Tabela 1:** Resumo dos resultados obtidos com o Teste de Tumores Epiteliais (ETT) em *Drosophila melanogaster* após tratamento crônico das larvas com diferentes concentrações do látex de *Himatanthus obovatus*, água ultrapura (controle negativo) e Doxorubicina 0,4 mM (DXR - controle positivo)

Tratamentos mg/mL	DXR mM	Número de moscas	Frequência de tumores analisados (total de tumores)						Frequência de tumores	Redução (%)
			Olhos	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Halteres		
Controle negativo		200	0,010 (02)	0,000 (00)	0,015 (03)	0,050 (10)	0,000 (00)	0,010 (02)	0,085 (17)	
Látex 1,25		200	0,000 (00)	0,005 (01)	0,015 (03)	0,025 (05)	0,005 (01)	0,025 (05)	0,075 (15)	
Látex 2,5		200	0,000 (00)	0,010 (02)	0,025 (05)	0,030 (06)	0,005 (01)	0,005 (01)	0,025 (15) *	
Látex 5,0		200	0,000 (00)	0,010 (02)	0,010 (02)	0,055 (11)	0,005 (01)	0,000 (00)	0,080 (16)	
Látex 10,0		200	0,015 (03)	0,010 (02)	0,010 (02)	0,085 (17)	0,005 (01)	0,000 (00)	0,125 (25)	
Controle positivo	0,4	200	0,010 (02)	0,025 (05)	0,035 (07)	0,525(105)	0,030 (06)	0,005 (01)	0,630(126)*	85
Látex 1,25	0,4	200	0,030 (06)	0,000 (00)	0,030 (06)	0,035 (07)	0,000 (00)	0,000 (00)	0,095 (19)**	87
Látex 2,5	0,4	200	0,030 (06)	0,015 (03)	0,015 (03)	0,020 (04)	0,000 (00)	0,005 (01)	0,085 (17) **	89
Látex 5,0	0,4	200	0,000 (00)	0,000 (00)	0,015 (03)	0,035(07)	0,000 (00)	0,020 (04)	0,070 (14)**	

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste de Mann Whitney.

\* Diferente do controle negativo. Nível de significância  $p \leq 0,05$ .

\*\* Diferente do controle positivo. Nível de significância  $p \leq 0,05$ .

Fonte: dados da pesquisa, 2022.

No controle negativo, foi observada frequência de 0,085 tumores nas moscas. Esse baixo valor de frequência na *Drosophila melanogaster* descreve que essa reduzida indução do controle negativo se dá pela predisposição genética que as moscas têm de desenvolver tumor. Já nos indivíduos tratados isoladamente com o látex, não houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ), se comparadas ao controle negativo, nos indivíduos tratados com DXR isolada, na concentração de 0,4mM (controle positivo) foi obtida frequência de 0,630 de tumores, estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo ( $p \leq 0,05$ ).

Pesquisas de Pereira *et al.* (2019) e Oliveira *et al.* (2019) evidenciaram aumentos significativos nas frequências de tumores ao utilizarem a Doxorrubicina comparados com o do controle positivo. O mecanismo de ação da doxorrubicina pode causar citotoxicidade nos organismos, pois há alteração do DNA, inibição de enzimas e indução ao estresse oxidativo. Além disso, o ciclo redox desse composto pode gerar complexos Doxferro que provocam alterações mitocondriais e o dano causado pelos radicais livres gerados.

Para os indivíduos tratados com o látex em associação à DXR, foram observadas frequências totais de 0,095, 0,085 e 0,070 para as concentrações de 1,25; 2,5 e 5,0 mg/mL, respectivamente. Foi observada redução da dose resposta estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) da frequência de tumores quando comparados ao controle positivo. De acordo com ROHENKOHL *et al.* (2011), a atividade anticarcinogênica pode ser justificada pela atividade antioxidante, pois consegue controlar o crescimento tumoral sem a produção de toxicidade.

Sousa (2009) atestou a atividade anticancerígena *in vivo*, pelo teste de Carcinoma de Ehrlich; apenas os animais tratados com a maior dose do látex apresentaram redução significativa dos tumores. Para o Sarcoma 180, apesar de ter apresentado uma redução dos pesos médios dos tumores, o látex não apresentou resultado estatisticamente significativo. Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos (*Mus musculus*).

Fonseca (2018) comprovou citotoxicidade pelo método de MTT *in vitro* dos extratos obtidos das folhas da *H. drasticus*, HDFH e HDFE. Aresentou resultados promissores de inibição das células cancerígenas das linhagens HCT-116 (câncer de Colo), SF-295 (câncer de cérebro) e PC-3 (câncer de próstata).

Sendo assim, a atividade moduladora e possível atividade anticarcinogênica evidenciada na Tabela 1 podem ser devido à presença de compostos antioxidantes, como flavonoidese taninos, presentes no látex de *Himatanthus obovatus*. Nessa perspectiva, verificou-se a necessidade do estudo químico, através de análise qualitativa e quantitativa de flavonoides e taninos no látex, para comprovar a sua influência da atividade moduladora, e possível anticarcinogenicidade verificada anteriormente.

Observa-se que os resultados evidenciam que o látex associado a DXR nas concentrações testadas apresentou efeito modulador dos danos induzidos pelo mutágeno Doxorrubicina em células somáticas de *D. melanogaster*.

### 3.2 ESTUDO QUÍMICO

#### 3.2.1 Identificação de metabólitos especiais: análise qualitativa

Os resultados para prospecção química de metabólitos especiais presentes no látex de *Himatanthus obovatus* mostram-se positivos para flavonoides, cumarinas e taninos condensados. As evidências e os testes realizados podem ser observados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Resultados da prospecção química de metabólitos especiais presentes no látex de *Himatanthus obovatus*

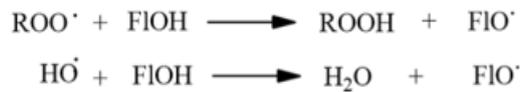
Metabólito	Teste	Evidência	Resultado	Foto
Flavonoides	Shinoda	coloração avermelhada	++	
	NP/PEG	fluorescência em luz UV ( $\lambda \sim 365$ nm)	++	
Cumarinas	KeellerKilliani	anel castanho avermelhado	++	
		solução verde azulada	++	
	NaOH e Metanol	fluorescência em luz UV ( $\lambda \sim 365$ nm)	--	
Taninos	Reação com FeCl <sub>3</sub>	Coloração Azul-Taninos Hidrolisados	++	
		Coloração Verde - Taninos Condensados		

Fonte: dados da pesquisa, 2022.

A presença de flavonoides e taninos também foi relatada por Santos *et al.*, (2021), o que corrobora os resultados obtidos neste estudo. Já a presença de cumarinas não foi relatada na literatura para a espécie em estudo, todavia, Coutinho (2013) evidenciou presença moderada de taninos para *Himatanthus drasticus*.

A presença ou a ausência de determinado grupo de metabólitos especiais e outros constituintes específicos nas plantas podem sinalizar preliminarmente as funções terapêuticas atribuídas a elas e ainda para um possível marcador químico. Lima e Bezerra (2012) relataram importantes atividades biológicas atribuídas aos compostos fenólicos, como flavonoides e taninos, como ações antialérgicas, antivirais, anti-inflamatórias e vasodilatadoras. O maior interesse tem sido na atividade antioxidante dos flavonoides, devido à sua capacidade de inibir e/ou reduzir a formação de radicais livres.

Os efeitos antioxidantes dos flavonoides podem ser explicados por sua prevenção à peroxidação lipídica através do aprisionamento de radicais de iniciação lipídica, como superóxido, hidroxil e hidroperóxil, conforme mostrado na Figura 2 (DENISOV; AFANAS'EV, 2005).

**Figura 2:** Reação dos flavonoides com os radicais livres peroxil (ROO•) e hidroxil (HO•)

Fonte: Denisov; Afanas'ev, 2005 *apud* Lima; Bezerra, 2012.

### 3.2.2 Análise Quantitativa de metabólitos secundários

Após análise das amostras por espectrofotometria, foi criada a curva de calibração para determinação de flavonoides totais e obteve-se a equação da reta expressa por  $Y = 0,0451x + 0,2239$ , quercetina em mg/mL, com  $R^2 = 0,9762$ . Para a análise, foi utilizado o padrão de quercetina e cloreto de alumínio 5%.

O teor de flavonoides totais obtidos pelo látex de *H. obovatus* avaliados por Ramada *et al.* (2021) apresentou teor de 7,88%. Comparado com os resultados obtidos neste estudo, que foram de 12,65%, observa-se uma variação de aproximadamente 60% maior que os dados obtidos por Ramada e outros. Essa diferença pode ser explicada pelo clima, temperatura e/ ou região da coleta.

Vauzour *et al.* (2010) afirma que o flavonoide está entre os agentes quimiopreventivos devido à sua capacidade de induzir a apoptose das células tumorais, de impedir a invasão de angiogênese e tumor de células e de inibir a proliferação dessas células.

A referida planta em estudo, por apresentar esses metabólitos, é capaz de atuar na quimioprevenção como visto no ETT, pois, de acordo com Degáspari e Waszczyński (2004), as atuações dos flavonoides como antioxidantes ajudam a inibir a oxidação de moléculas como o DNA, bem como as divisões celulares rápidas e desorganizadas que geram os tumores. Para melhorar a atividade antioxidante, portanto, os flavonoides devem atuar juntamente com outros metabólitos especiais antioxidantes, por isso se fez necessário analisar o teor de taninos totais, bem como a sua atividade antioxidante total.

A quantificação de taninos foi obtida pela secagem do extrato até a massa constante. As amostras foram pesadas, e os cálculos para encontrar o teor total de taninos foram feitos. O teor de taninos totais no látex de *H. obovatus* apresentou valor de 3,05%. Isso significa que a planta, além de ter flavonoides, possui taninos em sua composição, metabólitos esses que auxiliam na atividade antioxidante do extrato no organismo modelo.

Ramada *et al.* (2021) evidenciou a quantidade de taninos presentes no látex de *H. obovatus*, (2021), apresentando teores de taninos de (14,81 mg/mL), que representam 1,481% em percentual de taninos. Portanto, observa-se que os resultados encontrados neste trabalho são plausíveis e representam uma quantidade superior a esse grupo quando comparados ao trabalho de Ramada *et al.* (2021).

Após o preparo das soluções em diferentes concentrações do extrato para a análise da atividade antioxidante, foi possível observar, depois do período de reação de 30 minutos, a mudança de coloração de substância de púrpura para amarelo, elevando a remoção à medida que a concentração de extrato aumentava de 1,25 mg/mL a 10 mg/L. Foi feita a leitura da absorbância no espectrofotômetro na curva de 517nm de uma mistura de DPPH (0,004%) com água destilada e utilizada com o branco para realizar os

cálculos da atividade antioxidante do padrão de quercetina e dos extratos do látex. Os valores obtidos estão representados na Tabela 3 e 4.

**Tabela 3:** Atividade antioxidante obtida no padrão de quercetina

Concentração da quercetina(mg/mL)	Abs 517nm	Atividade Antioxidante (%)
1,25	0,013	91,33
2,5	0,017	88,66
5	0,024	84,00
10	0,039	74,00

Fonte: dados da pesquisa, 2022.

**Tabela 4:** Atividade antioxidante obtida na análise isolada do látex de *Himathantus obovatus* associada à Doxorubicina

Concentração da amostra (mg/mL)	Abs do látex 517nm	Abs da Interferência	Resultado Isolado	Atividade antioxidante (%)
1,25	0,307	0,227	0,08	46,67
2,5	0,521	0,484	0,037	75,33
5	0,936	0,917	0,019	87,33
10	1,717	1,694	0,023	84,67
Associado látex + DXR	Abs Associado	Abs interferência	Resultado Associado	Atividade antioxidante (%)
1,25	2,215	0,402	1,813	10,65
2,5	2,378	0,664	1,714	15,52
5	2,459	0,936	1,523	24,94

Fonte: dados da pesquisa, 2022.

O referido extrato apresentou atividade antioxidante a partir da concentração de 1,25 mg/mL, com valores correspondentes a 46,67%, atingindo maior atividade antioxidante de 87,33% na concentração de 5 mg/mL. O decaimento do percentual oxidativo do extrato na concentração de 10 mg/mL pode ser explicado por um possível efeito platô, em que ocorre a paralisação ou a diminuição da atividade antioxidante. Para a justificativa desse efeito, a concentração do látex deveria ser maior do que 10mg/mL.

As substâncias existentes no látex possuem a capacidade de reagir com o radical livre instável do DPPH e convertê-lo no 2,2-difenil-1-picrilhidrazina. Além disso, em relação ao controle positivo de quercetina, considerando-se como 100% a remoção total média de 84,49%, o látex isolado apresentou valor médio de 73,50%, o que representa 78,99 % do potencial antioxidante da quercetina. Observa-se, na Tabela 4, o látex associado a DXR, quanto maior a concentração do látex, maior a redução dos radicais livres, obtendo maior atividade antioxidante e consequentemente ação anticarcinogênica.

Por meio dos valores de concentração do extrato e %AA, foi realizada regressão linear, a qual gerou a equação  $y = 16,487x + 16,268$  com  $R^2$  0,8213, pela qual o  $IC_{50}$  calculado foi de 2,05 mg/L. Os Ramada *et al.* (2021) encontraram o  $IC_{50}$  de (178.88 ug/mL), que representa 0,178 mg/mL.

De acordo com Sousa *et al.* (2007), quanto menor o IC<sub>50</sub>, maior é a atividade antioxidante, então, a partir dessa afirmação, dos dados obtidos na literatura e dos resultados desta pesquisa, pode-se afirmar que a atividade antioxidante do látex de *H. obovatus* é extremamente satisfatória.

#### 4 CONCLUSÃO

A partir do estudo do látex de *Himathantus obovatus*, pôde-se concluir: (i) o látex possui atividade anticarcinogênica, uma vez que ocorreu diminuição significativa ( $p \leq 0,05$ ) na frequência de tumores, comparadas ao controle positivo, DXR; (ii) estão presentes no látex os metabólitos flavonoides, taninos e cumarinas; (iii) a quantidade de teores de flavonoides totais foi de 12,65% e para taninos de 3,05%. A atividade antioxidante máxima do látex foi de 87,33%, com concentração de 5 mg/mL do potencial antioxidante com IC<sub>50</sub> de 2,05 mg/L.

Em função dos resultados no presente trabalho, pode-se dizer que o látex de *Himatanthus obovatus* apresentou atividade anticarcinogênica nas concentrações 1,25; 2,5 e 5 mg/mL devido à presença de flavonoides e taninos que exerceram efeito antioxidante.

#### REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Lista consolidada das DCB Plantas Medicinais atualizada em agosto de 2021**. Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/dcb>.

BARBOSA, F. H. **Avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *Psidium myrtoides* O. Berg em linhagem transgênica de *Drosophila melanogaster***. 2019. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/30907>.

CARMO, S. J. E. *et al.* Caracterização Anatômica de Folhas Adultas de *Himatanthus obovatus* (M. Arg.) Wood. (Apocynaceae). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 56., 2005, Curitiba. **Anais [...]**. Curitiba: SIC-UEG, 2005. 1 p.

COUTINHO, G. S. L. **Bioprospecting leaves, barks and latex vegetable king *Himatanthus drasticus* (Frangipani)**. 2013. 129 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente), Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2013.

REZENDE, A. A. A. de *et al.* A comparative study of the modulatory effects of (-)-cubebin on the mutagenicity/recombinogenicity induced by different chemical agents. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 55, p. 645-652, maio 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.050>.

DEMIR, E. *et al.* Mutagenic/recombine genetic effects of four lipid peroxidation products in *Drosophila*. **Food And Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 53, p. 221-227, mar. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.053>.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, jun. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v5i1.540>.

EEKEN, J. C. *et al.* Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene *wts*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. 277-82, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/em.10119>.

FONSECA, R.; GIOTTO, A. C. Utilização e conhecimentos de discentes sobre plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista de Iniciação Científica e Extensão**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 613-23, 2021. Disponível em: <https://revistasfasesa.senaaires.com.br/index.php/iniciacao-cientifica/article/view/322>.

FONSÊCA, T. R. **Estudo fitoquímico e antitumoral in vitro da fração ativa metanólica do extrato etanólico das folhas de himatanthus drasticus (HDFE-M2)**. 2018. 8 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Exatas e Naturais), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2018.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. Nova Iorque: Claredon Press, Oxford, 2000.

LIMA, F. O.; BEZERRA, A. S. Flavonoides e radicais livres. **Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas, Santa Maria, v. 13, n. 1, p. 111-124, 2012.

MEDEIROS, J. de D. **Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies**. Brasília: MMA/SBF, 2011.

MOARES, I. B.; KARSTEN, J.; CASALI, M. P. M. Uso de plantas medicinais em regiões de cerrado. **Revista das Ciências da Saúde do Oeste Baiano**, [S. l.], v. 1, n. 2, p. 34-57, 2016.

NASCIMENTO, J. C. *et al.* Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 4, p. 327-332, jan. 2011.

NEPOMUCENO, J. C. Using the *Drosophila melanogaster* to assessment carcinogenic agents thought the test for detection of epithelial tumor clones (warts). **Advanced Techniques in Biology & Medicine**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 2-8, 2015. Disponível em: <https://www.longdom.org/open-access/using-the-emdrosophila-melanogasterem-to-assessment-carcinogenic-agents-through-the-test-for-detection-of-epithelial-tum-42338.html>.

OLIVEIRA, A. S. *et al.* Flavonoides totais e atividade antioxidante total do extrato etanólico de *Hedychium coronarium* (j. koenig) e avaliação anticarcinogênica em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, Patos de Minas, v. 16, n. 1, 2019.

PEREIRA, R. C. R. *et al.* Efeito modulador do extrato etanólico das folhas de *Antoniaovata Pohl* (Loganiaceae) sob a ação da doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster* e seu teor de flavonoides totais, taninos totais e atividade antioxidante. **Comine**, Patos de Minas, v. 16, n. 1, 2019.

RAMADA, J. V. S. *et al.* Phytochemical and biological activities evaluation of latex from *Himatanthus obovatus* (Muell. Arg.) Woodson (Apocynaceae). **Scientific Electronic Archives**, [S. l.], v. 15, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.36560/15120221498>.

ROHENKOHL, C. C. *et al.* Consumo de antioxidantes durante tratamento quimioterápico. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 107-112, jun. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-67202011000200004>.

SANTOS, B. N. G. *et al.* *Physalis peruviana* L.: applicability perspective in cancer treatment. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 10, e129101018700, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i10.18700>.

SAVI, P. R. S. *et al.* Análise de flavonoides totais presentes em algumas frutas e hortaliças convencionais e orgânicas mais consumidas na região sul do Brasil. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 275-287, mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.12957/demetra.2017.22391>.

SILVA, C. E. L. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos em extrato metanólico obtido de folhas da *Commiphora myrrha*. **Semana: Ciências Exatas e Tecnológicas**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 117-124, jun. 2013. Disponível em: <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semexatas/article/view/10840/13257>.

SPANÓ, M. A. *et al.* Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. **Mutagenesis**, [S. l.], v. 16, p. 385-394, set. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mutage/16.5.385>.

SOUSA, M. A. M. **Avaliação das atividades angiogênica / antiangiogênica e mutagênica / antimutagênica do látex do *Himatanthus obovatus* (Tiborna)**. 2017. 56 f. Dissertação (Mestrado em Curso de Ciências Ambientais e Saúde), Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2017. Disponível em: <http://tede2.pucgoias.edu.br:8080/handle/tede/3678>.

SOUSA, C. M. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, abr. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>.

SOUSA, E. L. **Avaliação da atividade antitumoral de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel Apocynaceae (Janaguba)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/3261>

VASCONCELOS, M. A. **Avaliação do efeito carcinogênico de edulcorantes por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (warts) em *Drosophila melanogaster***. 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17979>.

VAUZOUR, D. *et al.* Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. **Nutrients**, [S. l.], v. 2, n. 11, p. 1106-1131, nov. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu2111106>.

XIA, H. *et al.* LATS1 tumor suppressor regulates G2/M transition and apoptosis. **Oncogene**, [S. l.], v. 21, n. 8, p. 1233-1241, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205174>.

WISSING, A. The utilization of bark II: investigation of the stiasny-reaction for the precipitation of polyphenols in pine bark extractives. **Svensk Papperstidning**, Estocolmo, v. 58, n. 20, p. 745-750, 1955.