

# ***A influência da origem geográfica de amostras de acerola (Malpighia glabra L.) em relação ao seu potencial genotóxico e antígeno-tóxico***

VIVIAN FRANCÍLIA SILVA KAHL<sup>1,6</sup>  
MERIELEN DA SILVA SARMENTO<sup>2,6</sup>  
ROBERTA DA SILVA NUNES<sup>3,6</sup>  
MARC FRANÇOIS RICHTER<sup>4,6</sup>  
ALEXANDRE DE BARROS FALCÃO FERRAZ<sup>4,6</sup>  
JULIANA DA SILVA<sup>5,6</sup>

## **RESUMO**

*A acerola (Malpighia glabra L.) é uma planta usada popularmente para vários fins, e com alto teor de vitamina C. Para avaliar a atividade genotóxica e antígeno-tóxica da acerola, foi realizado o Ensaio Cometa in vitro em amostras de sangue de Mus musculus. As amostras de acerola eram provenientes do Rio Grande do Sul (RS) e São Paulo (SP), sendo utilizadas em três concentrações: C1 (2mg/ml), C2 (1mg/ml) e C3 (0,5mg/ml). A C1/RS apresentou efeito genotóxico. As demais concentrações da amostra do RS, e todas as concentrações de SP, não apresentaram indução a genotoxicidade. Quanto à antígeno-toxicidade em relação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a amostra do RS não apresentou efeito protetor, ao contrário da amostra de SP, que apresentou em*

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Biologia/ULBRA, Bolsista PIBIC/CNPq

<sup>2</sup> Acadêmica do curso de Biologia/ULBRA, Bolsista PROICT/ULBRA

<sup>3</sup> Doutoranda do PPG em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA

<sup>4</sup> Professor do Curso de Farmácia e do PPG em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA

<sup>5</sup> Professora-Orientadora do Curso de Biologia e do PPG em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA (juliana.silva@ulbra.br)

<sup>6</sup> Laboratório de Genética Toxicológica

todas as concentrações. Análises quanto à constituição de cada amostra estão sendo realizadas para elucidar estes resultados.

**Palavras-chave:** *Malpighia glabra L., acerola, genotoxicidade, antigenotoxicidade, vitamina C.*

## ABSTRACT

*Acerola (Malpighia glabra L.) is a popularly used plant for various purposes, which has a high content of vitamin C. The aim of this study was to evaluate the genotoxicity and antigenotoxicity of acerola, through of comet assay in vitro on blood samples of Mus musculus. The samples of acerola were from Rio Grande do Sul (RS) and São Paulo (SP), and were studied on three concentrations: C1 (2mg/ml), C2 (1mg/ml) e C3 (0.5mg/ml). The concentration C1/RS showed genotoxic effect. The others concentrations of RS samples and all concentrations of SP, did not showed induction to genotoxicity. As to antigenotoxicity, the RS sample hasn't showed protector effect, unlike SP sample, which showed it in all concentrations. Analysis as to constitution from every sample is being taken to elucidate these results.*

**Key words:** *Malpighia glabra L., acerola, genotoxicity, antigenotoxicity, vitamin C.*

## INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JR. et al., 2005).

Apesar do uso indiscriminado das mesmas, até hoje são escassos os estudos sobre as suas constituições químicas e atividades biológicas. A literatura descreve inúmeras atividades biológicas relacionadas com os compostos encontrados, principalmente os fenólicos (MONTOURO et al., 2005). O estudo da constituição química das plantas tem contribuído para que alguns fármacos potentes tenham sido descobertos (SANNOMIYA et al., 2004). Extra-

tos vegetais e seus constituintes isolados podem ser usados na fabricação de produtos terapêuticos industrializados (MARQUES, 2002). Relatos revelam que cerca de 80% da população mundial utiliza plantas com finalidade terapêutica (FETROW e AVILA, 2000).

Em grande parte, os efeitos gerados pelos constituintes de uma planta no organismo vivo são verificados baseando-se nos conhecimentos populares de uso repetitivo e tradicional. Sabe-se que os vegetais e frutas possuem classes de agentes fitoquímicos com diversas ações terapêuticas, como efeitos antioxidante, antimutagênico e até anticarcinogênico (KUSAMRAN et al., 1998; NAKAMURA et al., 1998; NOGUEIRA et al., 2005). Enfim, os extratos de muitas plantas podem ser usados no tratamento de várias doenças humanas (YEN et al., 2001).

Apesar de muitas ações benéficas das plantas, é importante considerar que alguns de seus

constituintes podem ser tóxicos ao organismo, e o metabolismo vegetal pode gerar metabólitos com esta mesma atividade. Segundo Ames (1983) e Franke et al. (2003), elementos da dieta humana presentes em vegetais, podem ter uso tanto medicinal como podem apresentar substâncias nocivas para o organismo.

*Malpighia glabra* L., popularmente chamada de “acerola” ou “cereja-das-antilhas”, é uma espécie nativa encontrada na América Tropical. É muito utilizada popularmente pela sua ação adstringente, vitamínica, antianêmica, nutritiva e antifúngica. A acerola, pelo seu inegável potencial como fonte natural de vitamina C, flavonóides, carotenóides e antocianinas e sua grande capacidade de aproveitamento industrial, tem atraído o interesse dos fruticultores e passou a ter importância econômica em várias regiões do Brasil (NOGUEIRA et al., 2005).

A composição química, inclusive a distribuição de componentes do aroma da fruta, é dependente das espécies, condições ambientais e, também, do estágio de maturação da fruta (VENDRAMINI e TRUGO, 2000). Segundo Araújo (1994), a acerola sofre alterações na cor, aroma, sabor e textura logo após a colheita. Este fato pode ser explicado por condições de armazenamento, temperatura, entre outros, podendo levar a uma possível degradação dos compostos ativos.

A composição nutricional de acerolas *in natura* e do suco de acerola não processado conforme USDA (2004) demonstra ser estes excelentes fontes de vitamina C, carotenóides precursores da vitamina A, licopeno, além de conter quantidades consideráveis de tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, cálcio, ferro e magnésio. Uma porção de 100 gramas da fruta *in natura* fornece 2796% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitamina C e 28,76% da IDR de vitamina A

necessária para um adulto. O alto teor de ácido ascórbico e a presença de antocianinas destacam este fruto no campo dos funcionais pela habilidade desses compostos em capturar radicais livres no organismo humano. A vitamina C, o  $\beta$ -caroteno e outros carotenóides agem como antioxidantes no organismo humano (SIZER e WHITNEY, 2003; MESQUITA e VIGOA, 2000).

O teor de vitamina C e outras características atribuídas à qualidade da acerola, tais como coloração, peso e tamanho dos frutos, teor de sólidos solúveis e pH do suco, além de serem afetadas pela desuniformidade genética dos pomares, sofrem influência de vários outros fatores, como precipitações pluviais, temperatura, altitude, adubação, irrigação e a ocorrência de pragas e doenças (NOGUEIRA et al., 2005). O alto teor de vitamina C e a fragilidade apresentada por este fruto têm motivado diversos pesquisadores, em diferentes partes do mundo, a trabalhar com sua caracterização química e seus possíveis efeitos benéficos ao organismo humano.

Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas, indubitavelmente, os flavonóides constituem o grupo mais representativo (RICE-EVANS et al., 1995). Secundando os flavonóides, a variedade de quase mil tipos diferentes de carotenóides descritos em plantas também chama a atenção (HARBORNE, 1988). O termo flavonóide engloba um grupo de compostos polifenólicos complexos que apresenta uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos e um heterociclo oxigenado. A família dos flavonóides inclui os subgrupos flavanóis (catequina, epicatequina, etc.), flavanonas (naringina, taxifolina), antocianidinas (malvidina, cianidina), flavonas e flavonóis (quercitina, luteolina, rutina, etc.) (HARBORNE, 1988), estando presente em uma grande variedade de alimentos de origem vegetal como frutas, vegetais, sementes, flores e folhas, e fazem parte integral

da dieta humana (HERMMAN, 1976; Hertog et al., 1992, HERTOG et al 1993<sup>a</sup>).

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido realizados sobre o papel das espécies reativas de oxigênio na etiologia de várias doenças (HALLIWELL, 1987). As propriedades antioxidantes dos flavonóides têm, assim, atraído a atenção para a nutrição preventiva, pois constituintes alimentares protegem contra o dano oxidativo, podendo também contribuir para a prevenção de importantes patologias, como doenças cardiovasculares, envelhecimento e câncer.

Considerando a importância do uso popular e a cultura pronunciada de acerola no Brasil, este trabalho se propôs a avaliar as atividades genotóxica e antígenotóxica do extrato liofilizado de acerola proveniente de duas diferentes regiões do Brasil: São Paulo e Rio Grande do Sul. Para isso, foi utilizado o Ensaio Cometa (EC) na sua versão *in vitro* em sangue de camundongos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção das concentrações de acerola utilizadas, o extrato da polpa do fruto maduro da acerola foi liofilizado em água. A partir do liofilizado, foram obtidas três concentrações: C1 (2mg/ml), C2 (1mg/ml) e C3 (0,5mg/ml).

Quatro camundongos *Mus musculus* - CF-1 - machos foram sacrificados por guilhotinamento e o sangue foi coletado em microtubos com 30 $\mu$ l de heparina. Foram preparadas quatro alíquotas de 100 $\mu$ l de sangue de cada animal, sendo cada uma exposta a uma das três concentrações por duas horas, a 37 $^{\circ}$ C, em estufa, protegidas da luz.

A C2 foi exposta também por quatro horas, a fim de se avaliar se a diferença de tempo de exposição poderia apresentar influência. Uma das amostras de sangue de cada animal foi utilizado como controle negativo (CN) não sendo exposto a nenhuma concentração. O Ensaio Cometa (EC) *in vitro* foi realizado conforme descrito por SZETO (2002), com algumas modificações.

As lâminas (quatro por dose e indivíduo) foram preparadas com 7,5 $\mu$ l de sangue de cada amostra diluídos em 95 $\mu$ l de agarose e posteriormente submersas em solução de lise durante 48 horas, a 4 $^{\circ}$ C. Para avaliação de antígenotoxicidade, lâminas em duplicata foram mergulhadas em solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante cinco minutos antes de serem expostas à solução de lise. Foi realizado o EC de versão alcalina para detecção de quebras de fita única e dupla, danos álcali-lábeis e *crosslinks*, através da incubação das lâminas em tampão pH > 13 por vinte minutos. Em seguida realizou-se uma eletroforese a 300mA e 25V durante quinze minutos. Esta corrente, havendo danos no DNA, faz com que os fragmentos do mesmo migrem, fazendo com que se tenha uma imagem de célula “cometa” (célula com cauda). As lâminas foram então neutralizadas, fixadas e coradas com nitrato de prata.

A análise das lâminas foi feita com microscópio óptico 100x e foram analisadas 100 células/ indivíduo/tratamento (50/lâmina). Os núcleos contendo o DNA intacto são redondos (sem danos – classe 0), enquanto as células lesadas são classificadas de acordo com a cauda (de pouco dano-1 até danos máximos– classe 4) (Figura 1). Os resultados foram expressos em índices de danos (ID), conforme a classificação visual das classes de danos. Ou seja, para cada grupo, o ID pode ir do

zero (100X0; 100 células observadas sem danos) a 400 (100X4; 100 células observadas com dano máximo). Ainda expressaram-se os resultados em frequência de dano (FD; %), cujo cálculo é a porcentagem de células com danos, e que pode variar de zero a 100. Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via e, em seguida, ao teste de Tukey.

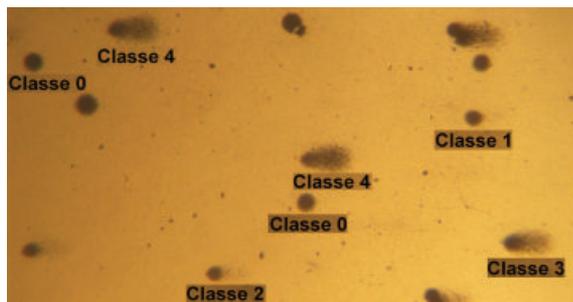


Figura 1 - Classes de danos no Ensaio Cometa.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação da atividade genotóxica, a C1, concentração mais alta, da amostra de acerola proveniente do RS apresentou efeito genotóxico ( $P < 0,05$ ). As demais concentrações dessa mesma amostra não apresentaram efeito genotóxico, não induzindo danos, quando comparadas ao CN (Figura 2), tanto para ID quanto para FD. O controle negativo, amostra de sangue não exposta a acerola, quando em exposição ao peróxido de hidrogênio (controle positivo) demonstra aumento significativo de lesões.

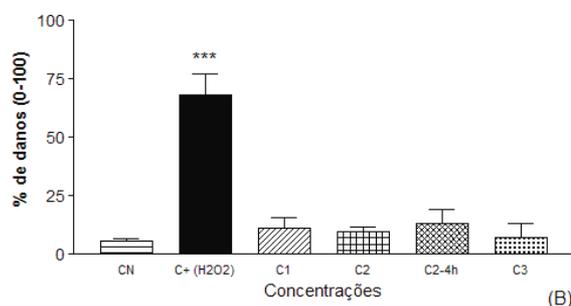
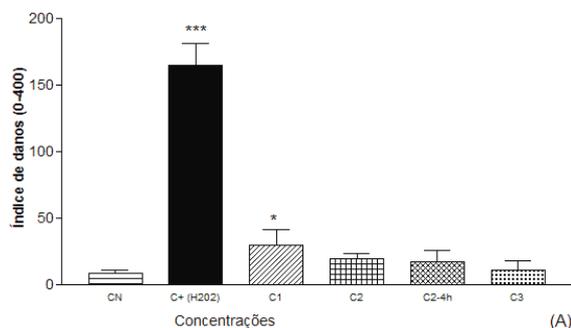
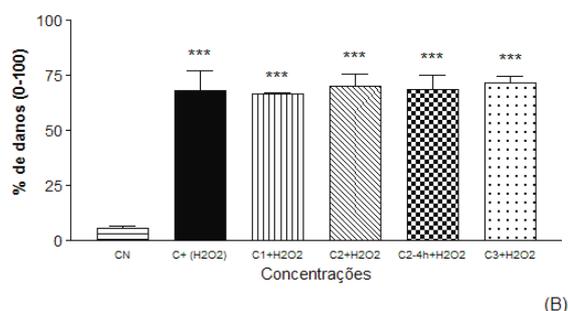
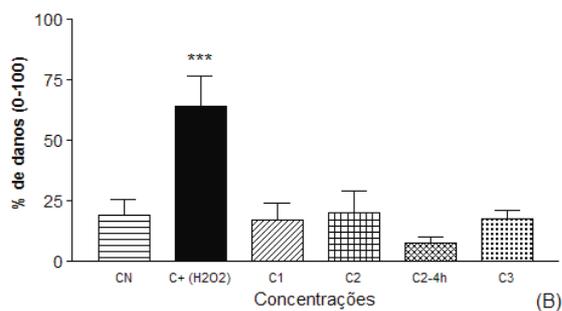
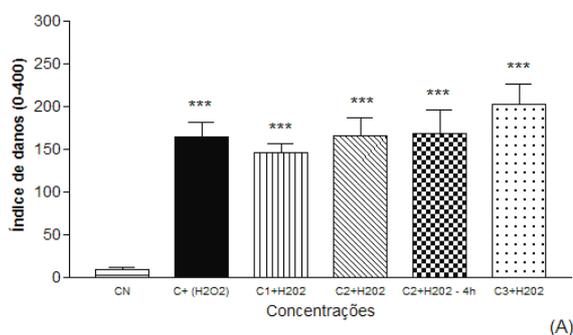
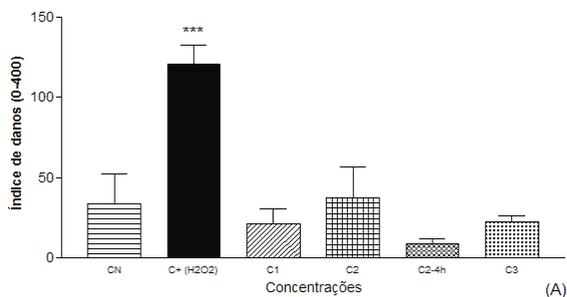


Figura 2 - Índice (A) e frequência (B) de danos da avaliação da atividade genotóxica em camundongos tratados com acerola proveniente do estado do Rio Grande do Sul. CN= controle negativo; C+= controle positivo; C1= 2mg/ml; C2= 1mg/ml; C3= 0,5mg/ml; C2-4h= amostra exposta por 4h (demais 2h). \*\*\*  $P < 0,001$  em relação ao CN.

Na mesma avaliação, tanto no ID quanto na FD, a amostra de SP não apresentou efeito genotóxico em nenhuma das concentrações utilizadas, em relação ao CN ( $P > 0,05$ ) (Figura 3).

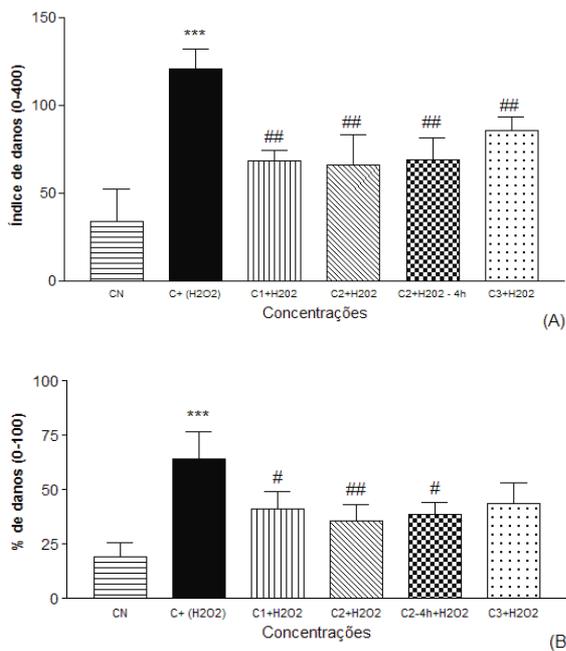


**Figura 3 -** Índice (A) e freqüência (B) de danos da avaliação da atividade genotóxica de camundongos tratados com acerola proveniente do estado de São Paulo. CN= controle negativo; C+= controle positivo; C1= 2mg/ml; C2= 1mg/ml; C3= 0,5mg/ml; C2-4h= amostra exposta por 4h (demais 2h). \*\*\* P<0,001 em relação ao CN.

**Figura 4 -** Índice (A) e freqüência (B) de danos da atividade antigenotóxica da acerola proveniente do Estado do Rio Grande do Sul. CN= controle negativo; C+= controle positivo; C1= 2mg/ml; C2= 1mg/ml; C3= 0,5mg/ml; C2-4h= amostra exposta por 4h (demais 2h). \*\*\* P<0,001 em relação ao CN.

Na avaliação da atividade antigenotóxica, a amostra de acerola proveniente do RS não apresentou efeito antigenotóxico em nenhuma das concentrações tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (P>0,05), quando comparadas com o grupo de controle positivo, que recebeu apenas H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 4).

A amostra de SP apresentou redução significativa de danos (P<0,001) para ID e FD quando avaliou-se a atividade antigenotóxica da mesma. Ou seja, todos os tratamentos aliados ao peróxido de hidrogênio diminuíram o ID quando comparados com o controle positivo (Figura 5).



**Figura 5 -** Índice (A) e freqüência (B) de danos da atividade antigenotóxica da acerola proveniente do Estado de São Paulo. CN= controle negativo; C+= controle positivo; C1= 2mg/ml; C2= 1mg/ml; C3= 0,5mg/ml; C2-4h= amostra exposta por 4h (demais 2h). \*\*\* P<0,001 em relação ao CN; #P<0,05 e ##P<0,01 em relação ao C+.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ambas as amostras são da mesma espécie de acerola (*Malpighia glabra* L.) do mesmo período de maturação, ou seja, tanto a amostra de São Paulo quanto a do Rio Grande do Sul são de frutos maduros. Mesmo assim, apresentaram diferenças significativas quanto ao seu potencial genotóxico e antigenotóxico, as quais devem estar vinculadas às diferenças de constituição dessas amostras.

Os resultados analisados mostram que a amostra de SP não causou dano genotóxico ao sangue dos camundongos tratados *in vitro* com extrato de acerola. Ao contrário, em todas as concentrações, essa amostra protegeu o DNA dos danos causados pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A amostra proveniente do RS demonstrou um resultado oposto: tanto não protegeu o DNA dos danos causados pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quanto induziu genotoxicidade de forma significativa na concentração mais alta, a C1 (2mg/kg).

Dessa forma algumas possibilidades são inferidas. Dentro da mesma espécie, podem existir diferentes variedades da planta, sendo que cada variedade pode apresentar constituição diferente da outra. Assim, a quantidade de vitamina C presente em cada variedade também pode ser diferente, alterando, portanto, seu efeito no organismo: como pró-oxidante, sendo prejudicial; ou como antioxidante, sendo benéfico.

Além disso, a diferença geográfica da origem das amostras pode influenciar na composição da planta em função das diferenças de solo, clima, altura e radiação solar. Em relação à radiação solar, alguns constituintes, como carotenóides e flavonóides, tendem a sofrer modificações dependendo da radiação solar recebida. Carotenóides e flavonóides são pigmentos de fotoproteção que os vegetais produzem quando expostos a radiação. Em ambientes diferentes, a produção deles pode variar, aumentando ou diminuindo, o que demonstra que a diferença geográfica pode, portanto, variar a produção de pigmentação. Esses constituintes apresentam forte relação com a saúde humana, a partir do momento em que, dependendo da quantidade à qual o organismo está exposto, eles podem agir de forma benéfica ou prejudicial.

Para a elucidação desses resultados, análises quanto à constituição dessas amostras estão sendo realizadas.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Universidade Luterana do Brasil – ULBRA, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Brasil.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.I.L.; LOPES, J.G.V.; OLIVEIRA, F.M.M. **Produtor de acerola**. Fortaleza: Edições Demócrito Rocha, Instituto Centro de Ensino Tecnológico, 2002.

ALVES, R.E.; MENEZES, J.B. Botânica da Aceroleira. In: SÃO JOSÉ, A.R.; ALVES, A.E. (Eds.) **Cultura da acerola no Brasil**: produção e mercado. Vitória da Conquista: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Fitotecnia e Zootecnia, 1995. p.7-14,

AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. **Science**, v.221, p.1256-1263, 1983.

ARAÚJO, P.S.R. **Acerola**. Campinas: Fundação Cargill, 1994.

FETROW, C.; AVILA, J.R. **Manual de medicina alternativa para o profissional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

HARBORNE, J.B. **The flavonoids**: advances in research since 1980. New York: Chapman & Hall, 1988.

HERRMANN, K. Flavonols and flavones in food plants: a review. **Journal of Food Technology**, v.11, p. 433-448, 1976.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.40, p.2379, 1992.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VAN DE PUTTE, B. Flavonol and flavone content of beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.41, p.1242-1246, 1993.

KUSAMRAN, W.R.; TEPWAN, A.; KUPRADINUN, P. Antimutagenic and anticarcinogenic potentials of some Thai Vegetables. **Mutation Research**, v.402, p.247-258, 1998.

MARQUES, M.F. **Molécula de Óxido Nítrico e sua inter-relação com fator de necrose tumoral-alfa na resposta imunológica induzida por *Styrax comporum* Pohl**. 99f. 2002. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 2002.

MESQUITA, P.C.; VIGOA, Y.G. La acerola. Fruta marginada de America con alto contenido de ácido ascórbico. **Alimentaria**, Madrid, v.37, n.309, p.113-126, 2000.

MONTOURO, P. et al. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.19, n.16, p.2244-2250, 2005.

NAKAMURA, Y.K. et al. Comparative bio-antimutagenicity of common vegetables and traditional vegetables in Kyoto. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.62, p.1161-1165, 1998.

NOGUEIRA, M.E.I. et al. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. **Toxicology in vitro**, v.20, n.3, p.361-366, apr. 2006.

SANNOMIYA, M. et al. Quercetina-3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo das folhas de *Byrsonima intermédia*. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BOTÂNICA, 15., 2004, Ubatuba. **Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Botânica, 2004. [n.p.]

SIMÃO, S. Cereja das Antilhas. In: SIMÃO, S. (Ed.) **Manual de fruticultura**. São Paulo: Agronomia Ceres, 1971.

SIZER, F.S.; WHITNEY, E.N. **Nutrition: concepts and controversies**. 9.ed. Belmont, CA: Brooks Cole, 2003.

SZETO, Y.T.; COLLINS, A.R.; BENZIE, I.F.F. Effects of dietary antioxidants on DNA damage on lysed cells using a modified comet assay procedure. **Mutation Research**, v.500, p.31-38, 2002.

TICE, R.R. et al. Single cell gel/comet assay : guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, p.206-221, 2000.

USDA (National Nutrient Database for Standard). Release 16, July 2003. Disponível em: <[http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut\\_search.pl?acerola](http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut_search.pl?acerola)>. Acesso em: 20 janeiro 2004.

VEIGA JR., V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. **Plantas medicinais: cura segura? Química Nova**, v.28, p.519-528, 2005.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y.; PENG, H.H.; Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emergency edible plants. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, p.1045-1053, 2001.