

ATIVIDADE GENOTÓXICA DE *Cenostigma pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis (Fabaceae) sob *Allium cepa* (Amaryllidaceae)

*Anna Clara Paulino de Queiroz*¹; *Márcia Simone Araújo da Silva Sousa*²; *Marcos Antonio Nobrega de Sousa*³

Universidade Federal de Campina Grande UFCG Email: annclaraqueiroz@gmail.com

Universidade Federal de Campina Grande UFCG Email: simoneandrin@gmail.com

Universidade Federal de Campina Grande UFCG Email: marcosandesousa@gmail.com

Resumo: A *Cenostigma pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis (Fabaceae), conhecida popularmente como catingueira, é uma planta medicinal que possui um grande valor econômico e cultural, usada principalmente para tratar de infecções gastrointestinais e respiratórias. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato aquoso da casca do caule de *C. pyramidale* sobre a germinação de sementes de *Allium cepa* (Amaryllidaceae). As concentrações-teste utilizadas foram 0,6% (6g/1000 ml), 0,12% (12g/500 ml), 6% (6g/100ml), água destilada para o controle negativo, e paracetamol 0,5% como controle positivo. Além de uma solução de paracetamol 0,5% mais extrato aquoso 6%, em iguais proporções, para o teste de antimutagenicidade. A genotoxicidade foi possível de ser verificada através da presença de anomalias radiculares, a citotoxicidade foi estimada através do índice mitótico, havendo uma diminuição do índice na concentração de 0,6% e um aumento nas de 0,12% e 6%, todas apresentando diferenças estatísticas significativas em comparação ao controle negativo. No controle positivo não houve germinação das sementes testadas, provavelmente, o uso paracetamol pode ter causado efeito mutagênico letal sobre as células vegetais. Conclui-se que o extrato aquoso de *C. pyramidale* em todas as concentrações testadas, foi citotóxico, afetando o índice mitótico, e genotóxico devido a morfologia das radículas de *A. cepa*, mas não apresentando efeito alelopático sobre a germinação das sementes, exceto nos tratamentos do controle positivo e do antimutagênico. Com isso, não se recomenda a ingestão de infusões com o caule desta planta.

Palavras-chave: Planta medicinal, Germinação, Genotoxicidade.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são aquelas que possuem capacidade de curar doenças ou aliviar sintomas, e são utilizadas desde os primórdios da humanidade (LORENZI, 2009). Tais plantas são usadas para o tratamento de diversas enfermidades, pois muitas vezes são de fácil acesso, e seu uso é regulamentado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (FRANÇA et al., 2007).

A caatinga é o bioma predominante do Nordeste do Brasileiro e possui uma ampla biodiversidade vegetal, com 127 famílias de plantas angiospermas, distribuídas pelos seus domínios (FLORA DO BRASIL, 2018). *Cenostigma pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis (Fabaceae), é uma árvore endêmica do semiárido brasileiro com grande valor econômico e cultural. É uma planta que além de possuir propriedades medicinais é utilizada, sobretudo, nos tratamentos de infecções

respiratórias e gastrointestinais, geralmente consumidas pela população na forma de chás e também infusões de suas folhas, cascas e entrecasca (AGRA et al., 2008). Além disso, possui comprovada atividade biológica antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (SANTOS 2010; SANTANA et al., 2012; SARAIVA et al., 2012; SILVA et al., 2012).

O estudo da toxicidade está relacionado com a detecção, composição química e ação biológica de substâncias tóxicas, portanto há possibilidade de causar danos prejudiciais a saúde humana (MENEGUETI, 2012). Esses danos muitas vezes interferem no material genético da célula, causando toxicidade e mutações (ANCIA, 2016).

A mutagenicidade causa danos celulares que também podem ser induzidos por agentes químicos, físicos ou biológicos, afetando processos celulares vitais como duplicação, transcrição gênica e alterações cromossômicas levando a consequências, como o desenvolvimento de processos cancerosos, até mesmo morte celular (COSTA; MANK, 2000).

A citotoxicidade ocorre basicamente pela medida da taxa de crescimento celular, podendo ser observada macroscopicamente dependendo da forma de estudo (FIGUEREDO, 2014). Enquanto que a genotoxicidade e seu potencial são determinados pela presença de anomalias cromossômicas, estruturais ou mesmo numéricas (LEME; MARIN - MORALES, 2009).

Para ensaios citogenéticos o teste em *Allium cepa* (Amaryllidaceae) é um dos mais utilizados para verificar toxicidade seja a nível morfológico, ou citogenético. Além disso, o uso de *A. cepa* também é eficiente na determinação dos efeitos de extratos e infusões de plantas medicinais (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007).

METODOLOGIA

Coleta do material biológico

Foram utilizadas amostras de cascas do caule de *C. pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis coletadas no Sítio Exu, localizado nos domínios da cidade de São Mamede (6°55'37.0"S 37°05'45.0"W), Paraíba, Brasil. A coleta aconteceu em abril de 2017 e a identificação da espécie foi realizada inicialmente através de guias de campo e posteriormente, por especialistas do Herbário UFCG-CSTR. Sendo depositada exsicata, tombada sob número 6757 CSTR

As cascas foram colocadas para secar em temperatura ambiente por uma semana e após a secagem foram trituradas em moedor elétrico (Thomas Wiley Laboratoty Mill Model 4), e depois peneiradas até a obtenção de um pó mais fino e uniforme, armazenado até o momento de uso.

Preparação das substâncias testes

De acordo com a utilização pelas comunidades para uso medicinal é recomendado usar a proporção de 300g da entrecasca seca de *C. pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis para 500 mL de água (SILVA et al., 2015).

Com isso, essa concentração utilizada na medicina popular (300g/500mL=60%) foi tomada como ponto de referência para preparar as frações dos extratos aquosos (EA), utilizados no experimento realizado com: 6g/1000 mL (0,6%), 6g/500 mL (0,12%) e 6g/100 mL (6%). A nossa maior concentração foi 10 vezes menor que a concentração utilizada popularmente. Estas concentrações foram utilizadas para os experimentos com sementes de *Allium cepa*. Como controle negativo (CN) foi utilizado água destilada; tendo como referência (Rego et al. 2015) e como controle positivo (CP) foi utilizado uma solução de paracetamol com (500 µL/mL). Para o controle antimutagênico (AM) foi utilizado uma mistura da concentração de paracetamol do controle positivo mais o extrato aquoso de *C. pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis na concentração de 6g/100 mL (6%) em iguais proporções.

Processo de Germinação

A germinação de sementes é regida pelas condições ambientais, da quais dependem de fatores para o crescimento vegetativo das plantas: disponibilidade de água e oxigênio, condições de temperatura adequadas e a ausência de substâncias inibidoras (TAIZ; ZEIGUER, 2013).

As sementes de *A. cepa* foram adquiridas em um centro comercial especializado em produtos agrícolas, na cidade de Campina Grande, Paraíba. Para este estudo, foram utilizadas sementes de *A. cepa* da variedade Vale Ouro IPA-11. Para higienização das sementes foi utilizada uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 1%. As sementes foram imersas nessa solução e agitadas cuidadosamente durante 5 minutos. Logo após foram enxaguadas 3 vezes com água destilada, e secas com papel de filtro esterilizado (BRASIL, 2009).

O teste de germinação foi realizado segundo Sax e Sax (1968). A semeadura foi realizada em placas de Petri estéreis, sobre papel filtro umedecido com os controles negativo, positivo e as referidas concentrações do extrato aquoso de *C. pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis. Em cada placa foram colocados 5ml de cada solução e em seguida elas foram tampadas e lacradas com papel filme.

As placas permaneceram sob condições controladas de temperatura e luminosidade. A temperatura foi ajustada para $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, considerada uma das temperaturas ótimas para o

crescimento de sementes de cebola da variedade IPA-11 (PINHEIRO et al., 2014), e o foto período de 12 horas com luz artificial, em câmara de germinação.

O teste de germinação foi realizado com três placas de petri para cada tratamento, com 25 sementes de *A. cepa* em cada placa, sendo assim foram utilizadas 9 placas para os três referidos tratamentos, durante 6 dias (144 horas), no Laboratório de Germinação de Sementes da UFCG-CSTR.

Anomalias Radiculares

Os aspectos morfológicos foram registrados através do uso de uma câmera com 12 megapixels. Através da observação dos registros fotográficos das radículas foi realizada a avaliação da morfologia do crescimento das raízes através da contagem das sementes germinadas, sendo estas classificadas em 4 tipos de anomalias: raízes retorcidas, protuberâncias, bifurcação, ondulação e radícula curta (SILVA, 2017).

Observação do índice mitótico

Para análise do índice mitótico (IM) foi utilizada a técnica de esmagamento para observação das células em processo de divisão (GUERRA; SOUZA, 2002). Onde foram coletadas de (duas a três raízes por réplica) e colocadas em solução fixadora de Carnoy (etanol: ácido acético 3: 1) até o momento da preparação.

Preparação das Lâminas para análise do índice mitótico

Durante o processo de preparação de lâminas, as raízes foram retiradas do fixador e passadas por duas lavagens de cinco minutos cada (10 min total) na água destilada e logo depois ficaram mergulhadas durante mais 10 minutos no ácido clorídrico (HCl). Após passar por uma nova lavagem em água destilada por mais 5 minutos, ficavam submersas em ácido acético 45% durante mais 10 minutos. Obtendo assim um total de 35 minutos de preparação, para melhor observação celular.

Em seguida, foi realizada a troca do ácido acético. Depois com o auxílio de pinça e também agulha de seringa foi retirada a coifa (zona apical da raiz) e a zona de crescimento foi colocada sob uma lâmina de microscopia. Em cada lâmina foram colocadas de duas a três raízes adicionadas a uma gota de HCl mais uma de corante (orceína acética a 2%).

Com o uso de uma lupa e de seringas, foram feitos inicialmente um corte transversal nas raízes e depois cortes aleatórios. A lamínula foi então colocada sobre a lâmina e realizada o squash (esmagamento) com o dedo polegar e suave pressão (GUERRA; SOUZA, 2002).

Foram avaliadas 1.000 células por réplica, totalizando 3.000 células por tratamento. Contabilizadas com o auxílio de um microscópio óptico com aumento de 400x.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Germinação de sementes

Os testes realizados para o controle positivo e o antimutagênico na presença de paracetamol (500 µL/mL), mostraram ausência de germinação das sementes em todas as réplicas (Figura 1).

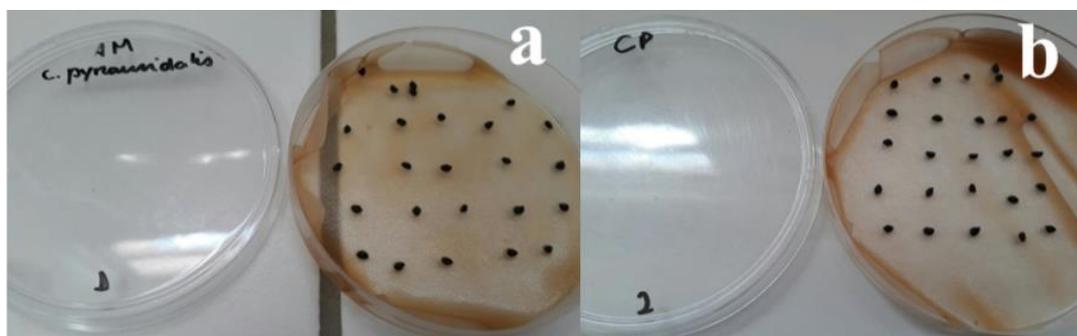


Figura 1- Representação das placas de Petri com Controle Antimutagênico (a), Controle Positivo (b), sem indícios de germinação.

Fonte: Os autores

Enquanto que, o extrato de *Cenostigma pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis nas concentrações de 6g/1000 mL (0,6%), 6g/500 mL (0,12%) e 6g/100 mL (6%) não apresentou efeito alelopático sobre a germinação das sementes de *Allium cepa*, não havendo diferença estatística significativa entre elas, em nenhuma das três concentrações em comparação com o controle negativo (Figura 2).

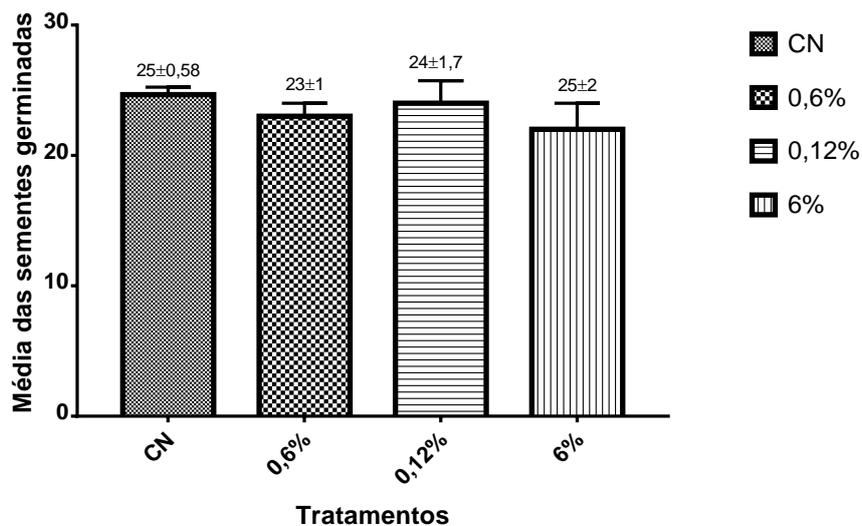


Figura 2 - Gráfico da média de sementes germinadas de *Allium cepa* em função da exposição aos extratos de *C. pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis; Controle Negativo (CN); (Média por concentração +/- Desvio padrão).- Teste de Tukey.

Fonte: Os autores

Anomalias Radiculares

Em referência as análises das anomalias após classificação morfológica feita nas raízes, não foi encontrada a anomalia do tipo bifurcação nas amostras estudadas e sim apenas os tipos de anomalias presentes na (Figura 4)

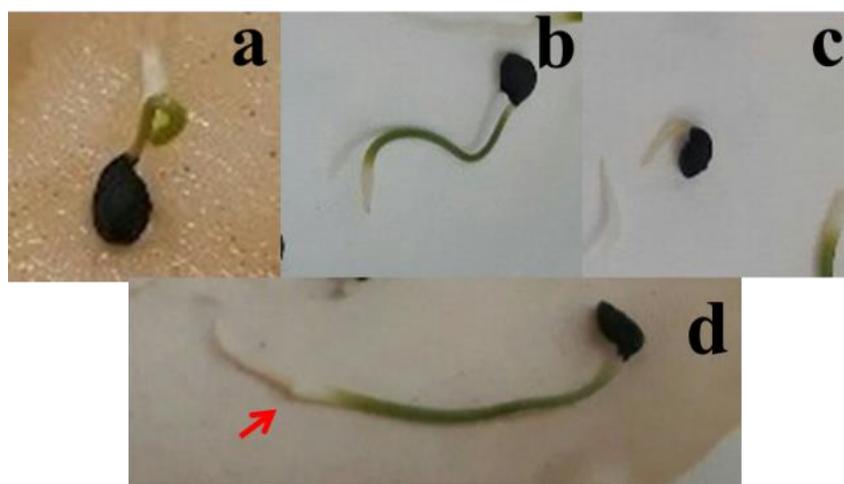


Figura 4- Tipos de anomalias observadas nas radículas de *Allium cepa* . retorcidas (a), ondulações (b) curtas (c) e protuberância (d).

Fonte: Os autores

Através da média e desvio padrão foi possível determinar diferença estatística significativa nas raízes com protuberância nas concentrações de (CP 0,6%), (CP 6%), com uma diferença estatística significativa maior para *C. pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis (6%), em relação ao controle negativo (Tabela 1).

No entanto, quando analisado o efeito total de todas as anomalias, foi observada diferença estatística significativa em todas as concentrações testadas.

Tabela 1. Análise das anomalias radiculares de *Allium cepa* expostas aos extratos aquosos de *C. pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis. Controle negativo (CN), Concentrações de *C. pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis (CP 0,6%, 0,12% e 6%). Média±Desvio-padrão (Média±DP).

* Diferença estatística significativa.

| | CN | CP (0,6%) | CP (0,12%) | CP (6%) |
|---------------|-----------|-----------|------------|--------------|
| | Média±DP | Média±DP | Média±DP | Média±DP |
| Curtas | 3,00±1,78 | 3,67±0,58 | 2,00±1,00 | 2,00±1,73 |
| Protuberância | 0,33±0,58 | *4±2,00 | 3,67±1,15 | ***6.33±0,58 |
| Ondulação | 0,33±0,58 | 0,33±0,58 | 1,67±1,50 | 2,00±1,73 |
| Bifurcação | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |

É importante ressaltar que as alterações no crescimento vistas macroscopicamente apenas refletem problemas nos processos de divisão celular (IGANCI et al., 2006). Assim, as anomalias encontradas no crescimento germinativo das sementes de *Allium cepa*, sob efeito do extrato aquoso de *C. pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis sugere um indicativo de processos genotóxicos.

Análise do índice mitótico

Foram identificadas todas as fases do ciclo celular nas amostras estudadas (Figura 6).

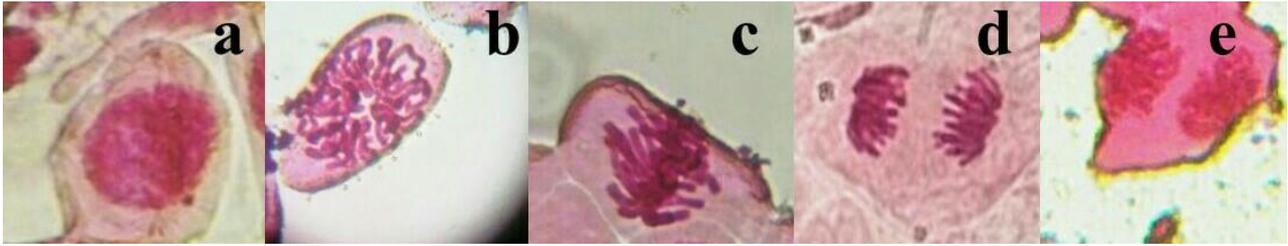


Figura 6 - Estágio de mitose em células meristemáticas de *Allium cepa* : Prófase (a) Pró-metáfase (b) Metáfase (c) Anáfase (d) Telófase (e).

Fonte: Os autores

Relacionando o controle negativo (CN) com as diferentes concentrações testes foram observadas diferenças importantes. Quando foram analisadas todas as fases em conjunto, todas as concentrações apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle negativo (CN).

Observamos que o número de células em divisão aumentou de acordo com o aumento da concentração para *C. pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis, tendo a concentração de (6%) o maior número de divisão celular para esta planta, mostrando diferença estatística significativa entre todas as diferentes concentrações, em comparação com o controle negativo (Figura7).

Também foi observado através de uma anova duas vias que as fases do ciclo celular tiveram um efeito extremamente significativo em comparação com as concentrações-teste analisadas.

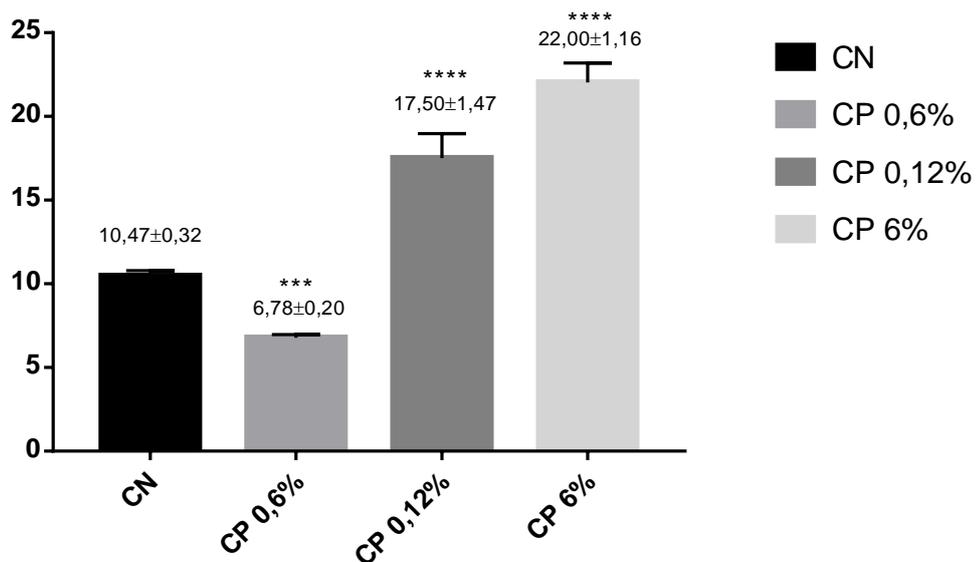


Figura 7- Gráfico referente ao índice mitótico. Controle Negativo (CN); *Cenostigma pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis (CP); Teste de Dunn;

Fonte: Os autores

Índices mitóticos maiores que o controle negativo ocorre devido ao aumento na divisão celular, podendo ser danoso para as células, acarretando uma proliferação de células, um crescimento desordenado e até a formação de tecidos tumorais (HOSHINA, 2002).

A diminuição do IM pode ser um indicativo de citotoxicidade (REGO et al., 2015). Logo, quando ocorre a redução do IM em relação ao controle negativo pode ser um indicativo de alterações, derivadas da ação tóxica de compostos. Estão a exemplo, compostos alopáticos em plantas tóxicas, sobre o crescimento e desenvolvimento do organismo exposto. (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Não foi possível realizar a análise do índice mitótico do controle positivo e dos tratamentos teste para antimutagênico, pois não ocorreu germinação das sementes. Sendo observado que o paracetamol possui efeito mutagênico, causando anomalia e diminuindo o número de células em divisão (STURBELLE et al., 2010).

CONCLUSÃO

O efeito do extrato da casca de *Cenostigma pyramidale* (Tul.) Gagnon & G.P. Lewis sobre as sementes vegetais não influenciou na germinação das sementes, mas resultou na presença de anomalias radiculares, que sugere genotoxicidade. Além de efeitos alelopáticos no controle positivo e no teste antimutagênico, provavelmente pelo uso do paracetamol ter efeito letal nas células das sementes de *Allium cepa*. Apresentou diferenças significativas no índice mitótico, o que sugere um indicativo de citotoxicidade. Portanto, o consumo para uso medicinal da casca dessa planta, deve ser evitado nas concentrações apresentadas nesse trabalho, devido ao seu efeito citotóxico e genotóxico, principalmente porque foi testada uma concentração 100x menor do que a utilizada na medicina popular.

REFERÊNCIAS

AGRA, M. de F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p.472-508, 2008.

ANCIA, Jefe Perez; ROMÃO, Natália Faria. Análise da atividade citotóxica e mutagênica do extrato aquoso das partes aéreas de *Uncaria tomentosa* em teste de *Allium cepa*. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 3, n. 2, 2016.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F. da; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p.444-447, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: Mapa/ACS, 2009b. 200 p.

COSTA, Renata Maria Augusto; MENK, Carlos Frederico Martins. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Projeto Genoma do Câncer**, p. 24, 2000.

FIGUEREDO, Climério Avelino de; GURGEL, Idê Gomes Dantas; GURGEL JUNIOR, Garibaldi Dantas. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, p. 381-400, 2014.

FRANÇA, I. S. X. de et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p.201-208, 2007.

GUERRA, Marcelo; SOUZA, MJ de. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. **Ribeirão Preto: FUNPEC**, p. 201, 2002.

HOSHINA, M. M. Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro, município de Rio Claro, pertencente à Bacia do Rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa*. 2002. 52 f. **Monografia (Bacharel e Licenciatura em Ciências Biológicas)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2002.**

IGANCI, J R V et al. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p.79-82, 2006.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/reviews In Mutation Research**, v.682, n. 1, p.71-81, 2009.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa - SP: Instituto Plantarum, 2009. 384 p.

MENEGUETTI, D. U. et al. Adaptation of the micronucleus technique in *Allium cepa*, for mutagenicity analysis of the Jamari river valley, western Amazon, Brazil. **J Environment Analytic Toxicol**, v. 2, n. 127, p. 2161-0525.1000127, 2012.

PINHEIRO, G. S. et al. Efeito da temperatura sobre a germinação de sementes de cebola. **Scientia Plena**, v. 10, n. 11, p.1-6, 2014.

REFLORA. **Lista de espécies da Flora do Brasil**. 2020. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar>. >. Acesso em: 17 abril. 2018.

REGO, Stefhânia Coelho et al. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade da dipirona e do paracetamol em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*. **Boletim Informativo Geum**, v. 6, n. 4, p. 7, 2015.

SANTANA, D. G. et al. Beneficial effects of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* on the inflammatory response and abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p.445-455, 2012.

SANTOS, C. A. dos. **Estudo farmacológico do extrato etanólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Leguminosae)**. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2010.

SARAIVA, A. M. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e perfil fitoquímico de *Caesalpinia pyramidalis* tull. (Fabaceae). **Biofar**, v. 7, n. 2, p.52-60, 2012.

SILVA, C. H. T. P. da et al. Phytochemical profile and antibacterial activity of bark and leaves of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. and *Sapium glandulosum* (L.) Morong. **Journal Of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 32, p.4766-4771, 2012.

SILVA, F. D. B. da et al. Potencial citotóxico, genotóxico e citoprotetor de extratos aquosos de *Caesalpinia pyramidalis* Tul., *Caesalpinia ferrea* Mart. e *Caesalpinia pulcherrima* Sw. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 2, p.101-109, 2015.

SILVA, Débora Oliveira da. **Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e de características fenológicas e físico-químicas da planta *Pereskia aculeata***. 2017. 91f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

SAX, K.; SAX, H. J. Possible mutagenic hazards of some food additives, beverages and insecticides. Japan. J. **Genetics**, v. 43, n. 2, p.89-94, 1968.

STURBELLE, Régis T. et al. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Rev. bras. farmacogn**, v. 20, n. 3, p. 409-415, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.