

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL CLASTOGÊNICO E ANEUGÊNICO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Croton tricolor* KLOTSCH EX BAILL

Sávio Benvindo Ferreira¹; Paula Benvindo Ferreira²; Tassiana Dantas Barbosa³; Hilzeth de Luna Freire Pessôa⁴

1-Universidade Federal da Paraíba. E-mail: saviobenvindo@gmail.com

2-Universidade Federal da Paraíba. E-mail: paulabenvindo92@hotmail.com

3-Universidade Federal da Paraíba. E-mail: tassianadantas@hotmail.com

4-Universidade Federal da Paraíba. E-mail: hilzeth@gmail.com

RESUMO: O uso de produtos de origem vegetal para o tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas da prática medicinal da humanidade. Apesar das plantas possuírem muitos usos terapêuticos que são conhecidos tradicionalmente, o ser humano desconhece o fato de que elas podem apresentar toxicidade tanto para o homem quanto para os animais. *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill, conhecido popularmente como marmeleiro prateado, é nativo da caatinga do Nordeste do Brasil. Alguns trabalhos recentes mostram resultados importantes sobre a atividade antioxidante e antibacteriana do seu óleo essencial mas não possui uma investigação dos seus efeitos toxicológicos e, em especial, do seu efeito genotóxico. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito genotóxico do óleo essencial das folhas de *C. tricolor* (Ct-OE). O teste de genotoxicidade foi realizado com o apoio do Biotério Prof. Thomas George (CCS/UFPB). Foram utilizados grupos de 3 machos e 3 fêmeas de camundongos *Mus musculus* albinos machos e fêmeas que receberam por via oral o Ct-OE na dosagem máxima de 2000 mg/kg do peso do animal. Vinte e quatro horas após o tratamento os animais foram anestesiados e em seguida foram retiradas amostras de sangue para o preparo das lâminas e a contagem de micronúcleos. Após leitura das lâminas, foi observado que o Ct-OE não promoveu dano cromossômico estrutural e/ou numérico em eritrócitos de camundongos *in vivo*.

Palavras-chave: *Croton tricolor*, toxicidade, efeitos mutagênicos, micronúcleo.

INTRODUÇÃO

O uso de produtos de origem vegetal para o tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas da prática medicinal da humanidade e, embora grandes avanços sejam observados na medicina moderna, os produtos naturais continuam contribuindo de maneira considerável nos cuidados com a saúde (CRAGG et al., 1997; SHU, 1998; VEIGA et

al., 2005). O Brasil, possuindo uma grande biodiversidade de espécies vegetais, se destaca como fonte para obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica (KORDALI et al., 2008).

Em meio à diversidade de espécies, podemos destacar a *Croton tricolor* Klotzsch ex Baill. Conhecido tradicionalmente como marmeleiro prateado é um arbusto de ramos delgados, cilíndricos, cinerescentes e

escabros. É nativo da caatinga do Nordeste do Brasil, sendo as cascas do caule utilizadas para tratar cólicas intestinais (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; CATUNDA JR., 2003). Estudos químicos mostraram a presença de ácido carboxílico diterpênico e seu éter metílico, além de α -pineno e α -guaieno (CRAVEIRO, 1976; CATUNDA JR., 2003). Estudos realizados com esta espécie mostram que seu óleo essencial possui atividade antioxidante e antibacteriana contra *Streptococcus* spp., *Serratia* spp., *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (CANUTO, 2005), mas não possui uma investigação dos seus efeitos toxicológicos e, em especial, do seu efeito genotóxico.

Apesar das plantas possuírem muitos usos terapêuticos que são conhecidos popularmente, o ser humano desconhece o fato de que elas podem apresentar toxicidade tanto para o homem quanto para os animais (RODRIGUES; ALMEIDA; PIRES, 2010; MARTINS et al., 2012). De acordo com dados do Sistema Nacional de Informações Toxicológicas (SINITOX), no ano de 2010, no Brasil foram registrados 1132 casos de intoxicação humana por uso de plantas sendo que desses, 5 foram a óbito (SINITOX, 2010). Diante disso, a realização de estudos que investiguem as atividades citotóxicas e genotóxicas de compostos naturais mostra-se

importante a fim de se garantir uma maior segurança do uso desses produtos pela população.

Atualmente, a maior parte dos fitoterápicos que são utilizados por automedicação ou por prescrição médica não tem o seu perfil tóxico bem conhecido (CAPASSO et al., 2000; VEIGA-JUNIOR; MELLO, 2008). A detecção de atividade citotóxica de um fitoterápico constitui uma medida prioritária, uma vez que vários compostos químicos podem ser capazes de causar efeitos tóxicos. Portanto, experimentos capazes de fornecer, com razoável margem de segurança, indicações sobre os riscos envolvidos na sua utilização são fundamentais (BENIGNI, 2005). Neste contexto, o presente trabalho objetivou investigar a atividade genotóxica do óleo essencial das folhas de *Croton tricolor* Klotsch ex Bail através do teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo, onde será verificado seu potencial clastogênico e aneugênico em células eucarióticas.

METODOLOGIA

As folhas da *C. tricolor* Klotsch ex Bail (Euphorbiaceae) foram coletadas na cidade de Jequié (13° 51' 28" S, 40° 5' 2" W) no Sudoeste da Bahia – Brasil, e encaminhadas para o Laboratório de Fitoterapia e Óleos Essenciais da

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. A identificação taxonômica foi realizada pela Dr^a Guadalupe E. L. de Macedo da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. A excisata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – HUESB com o seguinte número de referência HUESB 6494.

O óleo essencial das folhas de *C. tricolor* (Ct-OE) foi gentilmente cedido pelo Professor Dr. Baraquízio Braga do Nascimento Junior e pelo MsC. Fabrício Mendes Miranda da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. O composto foi solubilizado em DMSO (SIGMA) na concentração de 10 mg/mL.

O teste de genotoxicidade foi realizado com o apoio do Biotério Prof. Thomas George (CCS/UFPB). Foram utilizados camundongos *Mus musculus* albinos machos e fêmeas, linhagem Swiss pesando entre 25-35 g, todos provenientes do Biotério Prof. Thomas George da UFPB. Os animais foram aclimatados às condições do biotério local, por cerca de sete dias antes dos ensaios experimentais, sob temperatura (21 ± 2 C) e ciclos claro-escuro controlado de 12 horas. Os animais foram alimentados com

ração e água ad libitum, sendo distribuídos nos diferentes grupos experimentais, ao acaso. O uso dos animais foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais - UFPB (CEUA/UFPB, N° 0206/11).

Os procedimentos experimentais para realização do teste de micronúcleo foram realizados de acordo com Schmid (1975). Grupos de três machos e três fêmeas de camundongos Swiss receberam por via oral o Ct-OE na dosagem máxima de 2000 mg/kg do peso do animal. O grupo controle negativo recebeu apenas o dispersante da amostra (água) e controle positivo recebeu ciclofosfamida a 50 mg/Kg de peso do animal (SIGMA). Vinte e quatro horas após o tratamento os animais foram anestesiados com xilazina (20mg/kg) e quetamina (150mg/kg), via intramuscular, e em seguida foram retiradas amostras de sangue da veia caudal para o preparo das lâminas e a contagem de micronúcleos.

Após a coleta, os animais sofreram eutanásia de acordo com a Resolução N° 1.000/2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, com as recomendações da Associação Americana de Medicina Veterinária (AVMA, 2012).

As lâminas foram coradas com corante panótico e observadas ao microscópio óptico (ZEISS) no aumento de 1000x para a contagem dos micronúcleos. Foram avaliados pelo menos 2000 eritrócitos por animal (HAYASHI et al., 1994).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.m). As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste t pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

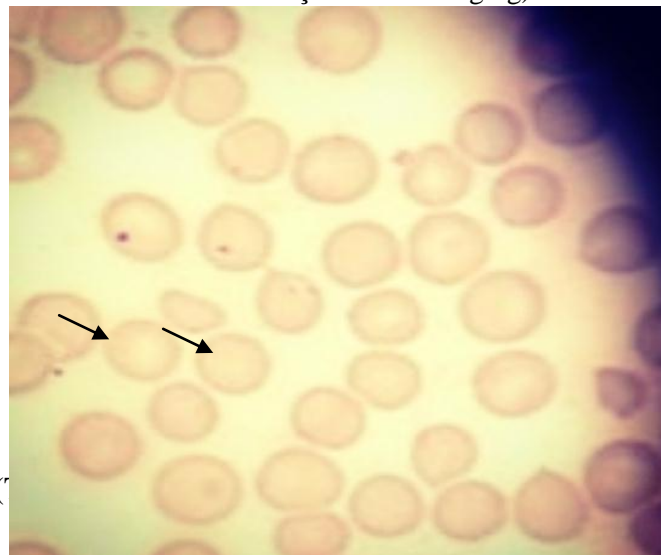
RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de micronúcleos em eritrócitos de camundongos no controle positivo não foi influenciada pelo sexo, então os dados foram agrupados para determinar a média de micronúcleos, para calcular o erro padrão da média e para avaliar as diferenças entre os grupos.

Os resultados obtidos mostraram que o Ct-OE na concentração de 2000 mg/kg não induziu um aumento significativo no número de micronúcleos em relação ao controle negativo e que apenas a ciclofosfamida

(controle positivo) induziu um significativo aumento na quantidade de micronúcleos

Figura 1: Teste de micronúcleo (óleo essencial de *C. tricolor* na concentração de 2000 mg/kg)



Para alertar sobre riscos potenciais como o câncer e desordens genéticas existem diversos testes que avaliam a genotoxicidade de medicamentos, assim como de plantas utilizadas na medicina popular. Entretanto, as informações, se disponíveis, são dispersas e escassas (RUIZ et al., 1996). Uma maneira de se estudar os efeitos genotóxicos em uma população, é conduzir estudos de

Tabela 1 - Frequência de eritrócitos micronucleados em eritrócitos de sangue periférico de camundongos Swiss machos e fêmeas.

Tratamento	Eritrócitos micronucleados (%)
Controle Negativo	12 \pm 5,67
Ct-OE 2000 mg/kg	2,28 \pm 0,23
Ciclofosfamida (50mg/Kg)*	43,5 \pm 5,89

(83) 3322 3222
Valores expressos como média \pm e.p.m. *Controle positivo = Ciclofosfamida
contato@conbracis.com.br

monitoramento, utilizando parâmetros biológicos pertinentes, com manifestação à curto prazo, com os ensaios de micronúcleos, que podem identificar danos no DNA e/ou nos cromossomos resultantes da exposição. A informação obtida pode ser usada como um aviso precoce do risco potencial para desenvolver à longo prazo, problemas de saúde (AU, 1991).

As alterações no material genético podem ser identificadas através de testes de mutagenicidade. Atualmente existe um grande número de testes, com modelos tanto *in vivo* como *in vitro*, sendo que o organismo de prova varia desde vírus, bactérias, fungos, plantas e insetos a mamíferos, incluindo o homem (OBE et al., 2004). Dentre os testes que analisam mutações cromossômicas em mamíferos, destaca-se o teste de micronúcleos, que é um teste rápido e simples, e detecta quebras e perdas cromossômicas (HAYASHI et al., 1994).

O micronúcleo é um tipo de cromatina que pode surgir tanto da disjunção anômala dos cromossomos, devido a anormalidades do fuso, quanto pela quebra de cromossomos. Ele é formado pelo desenvolvimento de um novo envoltório de sistema de membrana ao redor da cromatina que não se moveu para os pólos durante a anáfase (GROVER; SATWINDERJEET, 1999).

A sensibilidade do teste do micronúcleo é comparável à da análise de quebras e trocas cromatídicas (KLIESCH; ADLER, 1980). Sendo que o ensaio do micronúcleo apresenta uma grande vantagem sobre as demais técnicas, a de não requerer cultivo celular, bem como preparações metafásicas (TITENKO-HOLLAND et al., 1998).

Neste estudo, o CT-OE não aumentou a frequência de eritrócitos micronucleados de sangue periféricos de camundongos, sugerindo que o mesmo não possui efeito genotóxico (clastogênico e/ou aneugênico) *in vivo*, característica importante para sua aplicabilidade na terapia popular.

Efeito semelhante foi encontrado por Rodrigues et. al. (2010), onde utilizou o teste do micronúcleo da medula óssea de ratos wistar para avaliar a atividade genotóxica do extrato *Croton cajucara* Benth. Esse trabalho demonstrou que o tratamento com o extrato vegetal não provocou efeito genotóxicos nos eritrócitos.

Dessa forma, pode-se sugerir que o Ct-OE não interfere na divisão nuclear dos eritroblastos da medula, quebrando cromossomos ou interferindo no fuso, não se apresentando genotóxico.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos na investigação do efeito genotóxico *in vivo* do

óleo essencial das folhas de *Croton tricolor* Klotsch ex Bail (Ct-OE), pode-se concluir que o Ct-OE na concentração de 2000mg/kg não induziu danos cromossômico estrutural e/ou numérico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C., Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciência**, v. 27, n. 007, p. 336-346, 2002.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION. **AWMA guidelines on euthanasia**. 2007. Disponível em: <http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf>. Acesso em: 5 nov. 2012.

AU, W.W. Cytogenetic assays in monitoring human exposure and prediction of risk. **Environ Mutagen Carcinogen Teratogen**, p. 236-245, 1991.

BENIGNI, R. Structure activity relationship studies of chemical mutagens and carcinogens mechanistic investigations and prediction approaches. **Chemical Reviews**, v.105, p.1767-1800, 2005.

CAPASSO, R; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of

herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71p.58-65, 2000.

CATUNDA JÚNIOR, F. E. A. Estudo químico dos óleos essenciais de espécies do gênero *Croton*. **Monografia** (Lic. Plena em Química). Universidade Estadual do Ceará, 2003.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural Products in Drug Discovery and Development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A. Estudo de óleos essenciais de plantas do Nordeste brasileiro. **Ciência Cultural**, v. 28, p. 180, 1976.

GROVER, I. S.; SATWINDERJEET, K. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, p. 183-188, 1999.

HAYASHI, M.; TICE, R. R.; MACGREGIR, J. T. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 312, p. 293-304, 1994.

KLIESCH, U., ADLER, I. D. Sensitivity comparison of chromosome analysis and micronucleus test in mouse bone marrow. **Mutation Research**, v. 74, p. 160, 1980.

KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, cavacrol, thymol and ρ -cymene. **Bioresource Technology**, doi: 10.1016/j.biortech.2008.04.048, 2008.

MARTINS, R. T. Receptores opioides até o contexto atual. **Revista Dor**, v. 13, n. 1, p. 75-79, 2012.

OBE, G. et al. Chromosomal Aberrations: Formation, Identification and Distribution. **Mutation Research**, Orlando, v. 504, n.5, p. 17-36, Oct. 2004.

RODRIGUES, G.R. Efeito da administração do extrato aquoso do *Croton cajucara* benth sobre parâmetros oxidativos e a Expressão do NF- κ B em fígado de ratos diabéticos. **Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas**.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Porto Alegre, BR-RS, 2010.

RODRIGUES, E.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 981-991, dez. 2010.

RUIZ, A. R.; DE LA TORRE R.A.; ALONSO, N.; VILLAESCUSA, A.; BETANCOURT, J.; VIZOSO, A. Screening of medicinal plants for induction of somatic segregation activity in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 52, p. 123-127, 1996.

SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31: 9-15, 1975.

SHU, Y. Z. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. **Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SINITOX, Casos, Óbitos e Letalidade de Intoxicação Humana por Agente e por Região. Brasil, 2009. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/b3.pdf>. Acesso em: 24 out. 2012.

TITENKO-HOLAND, N.; JACOB, R. A.; SHANG, N.; BALARAMAN, A.; SMITH, M. T. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. **Mutation Research**, v. 417, p. 101-114, 1998.

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

VEIGA-JUNIOR, V.F.; MELLO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais.

Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, p. 464-471, 2008.