

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DOS EXTRATOS DE *STACHYS BYZANTINA* C. KOCH. (PULMONÁRIA) E *TROPAEOLUM MAJUS* L. (CAPUCHINHA), UTILIZANDO O SISTEMA TESTE *ALLIUM CEPA*

Karoline Louvatel*
Maria Ignez Marchioro Zaions**
Ana Rúbia Arenhart***

Resumo

Mundialmente, existe uma infinidade de plantas medicinais utilizadas para o tratamento de doenças. Porém, a ação das substâncias presentes nessas plantas ainda é pouco estudada e sabe-se que podem induzir alterações no material genético. As plantas *Stachys byzantina* C. Koch. (pulmonária) e *Tropeolum majus* L. (capuchinha) são utilizadas na medicina popular em função de suas propriedades anti-inflamatórias e diuréticas, respectivamente. Este trabalho objetivou avaliar o efeito citotóxico e genotóxico dos “chás”, utilizando o sistema teste *Allium cepa*. Foram coletadas folhas frescas das plantas para preparo dos extratos aquosos e alcoólicos nas concentrações 1,5% e 4,5%. Os bulbos foram enraizados em água destilada por 72 horas, em seguida, transferidos para o tratamento por 24 horas. As radículas foram coletadas, fixadas em solução Carnoy por 10 minutos, e coradas. Os bulbos foram colocados novamente em água destilada por 24 horas para análise da recuperação. Os resultados mostraram que os tratamentos com os extratos aquosos e alcoólicos de *S. byzantina* C. Koch. (pulmonária) e *T. majus* L. (capuchinha) apresentaram índices mitóticos médios significativamente inferiores ao controle. O tratamento de recuperação em água destilada apresentou variação dos índices mitóticos médios em relação ao controle. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que os extratos dessas plantas não apresentaram efeito genotóxico, mas apresentam efeito antiproliferativo para as concentrações estudadas. Palavras-chave: *Allium cepa*. Plantas medicinais. Citotoxicidade.

1 INTRODUÇÃO

A população utiliza chás medicinais para o tratamento de doenças desde os tempos remotos. Porém, esse consumo deve ser monitorado, com o objetivo de alertar sobre os possíveis efeitos nos organismos vivos, já que estes estão frequentemente expostos a substâncias mutagênicas, que podem causar danos celulares. Os danos podem afetar processos como a duplicação e a transcrição gênica, bem como alterações cromossômicas, levando a processos cancerosos e morte celular (COSTA; MENK, 2000).

O estudo do potencial mutagênico das plantas medicinais é muito importante como fonte de pesquisa de novas drogas terapêuticas e como medida de segurança para o uso popular, estabelecendo medidas de controle no uso indiscriminado. (PERON et al., 2008).

Vicentini et al. (2001) relataram, a partir de pesquisas, que os chás e infusões de plantas medicinais podem conter substâncias tóxicas com efeitos mutagênicos.

O sistema teste de *Allium cepa* destaca-se, entre os testes citogenéticos aplicados para o estudo dos efeitos de extratos vegetais, por ser uma alternativa barata e eficiente. O teste consiste em avaliar alterações na divisão celular por meio da avaliação de danos cromossômicos e distúrbios no ciclo e índice mitótico de células meristemáticas de cebola.

*Graduanda do Curso Ciências Biológicas da Universidade do Oeste de Santa Catarina de Joaçaba; karollovatel@hotmail.com

**Bióloga; Professora do Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Oeste de Santa Catarina de Joaçaba; Rua Getúlio Vargas, 2125, Bairro Flor da Serra, Joaçaba, SC, 89600-000; mariaignez.zaions@unoesc.edu.br

***Bióloga; aninha.arenhart@hotmail.com

O fato de que as plantas *Stachys byzantina* C. Koch. (pulmonária, família Lamiaceae) e *Tropaeolum majus* L. (capuchinha, família Tropaeolaceae) apresentam ampla utilização com fins terapêuticos motivou a realização dos estudos, para avaliar os possíveis efeitos citotóxico e genotóxico dos extratos dessas plantas por meio do teste *Allium cepa*.

Este trabalho objetivou avaliar os efeitos citotóxico e genotóxico de *Stachys byzantina* C. Koch. (pulmonária) e *Tropaeolum majus* L. (capuchinha), utilizando como organismo teste células meristemáticas de *Allium cepa*, avaliando o índice mitótico e anormalidades cromossômicas, após infusão nas diferentes concentrações dos extratos aquosos e alcoólicos dessas plantas e observando a recuperação do índice mitótico após exposição aos extratos das plantas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As mudas de *S. byzantina* C. Koch. (pulmonária) e *T. majus* L. (capuchinha) foram cultivadas em canteiro junto à casa de vegetação, localizada no campus II da Universidade do Oeste de Santa Catarina, com rega em dias alternados.

Para a preparação do extrato aquoso, as folhas frescas foram submetidas à infusão em água fervente. Foram pesados, em balança analítica, 3 e 9 g do material vegetal. Em um bquer, foram adicionados a cada uma dessas massas 150 ml de água destilada em ponto de ebulição, ele foi coberto com vidro de relógio e a solução foi mantida atingir a temperatura ambiente.

Após, a solução foi filtrada com papel filtro em dois balões volumétricos de 200 ml, completando-se o volume com água destilada.

Para a preparação do extrato alcoólico, as folhas frescas foram maceradas em etanol 80% por 10 dias. A proporção de folhas e álcool é de 4,5 e 13,5 g da planta para 300 ml de álcool, obtendo-se uma relação de 1,5 e 4,5% m/V.

Após o período de maceração, a solução foi filtrada em dois balões volumétricos de 250 ml, o excesso de etanol foi evaporado a 50 °C em rota evaporador, e o extrato bruto resultante foi ressuscendido em 35 ml de Tween 80 na concentração de 0,5%.

Para avaliação do potencial mutagênico de *S. byzantina* C. Koch. e *T. majus* L., foram utilizados bulbos de *A. cepa* de mesma procedência e tamanho padronizado (3 a 3,5 centímetros de diâmetro).

Os bulbos foram colocados em frascos com água destilada para enraizar à temperatura ambiente, até a obtenção de raízes com cerca de 1 a 1,5 cm de comprimento. Algumas raízes foram coletadas para servirem de controle do próprio bulbo (grupo controle/ CO). Os bulbos foram colocados em suas soluções de tratamento (grupo tratado/ TR) por 24 horas. Foram retiradas quatro raízes de cada bulbo e fixadas, para análise e quantificação de danos celulares. As raízes restantes foram lavadas e os bulbos novamente colocados em água, para recuperar (grupo de recuperação/RE), por 24h, sendo posteriormente retirados e fixados (PERON et al., 2008). Foram utilizados 32 bulbos distribuídos conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos bulbos e número de células analisadas nos tratamentos

Espécie (extrato aquoso)	Concentração extratos (m/V)	N. Bulbos	CO* (0h)	TR** (24h)	RE*** (24h)	Total de Células
S. byzantina (pulmonária)	1,5%	4	4.000	4.000	4.000	12.000
	4,5%	4	4.000	4.000	4.000	12.000
T. majus (capuchinha)	1,5%	4	4.000	4.000	4.000	12.000
	4,5%	4	4.000	4.000	4.000	12.000
Espécie (extrato alcoólico)						
S. byzantina (pulmonária)	1,5%	4	4.000	4.000	4.000	12.000
	4,5%	4	4.000	4.000	4.000	12.000
T. majus (capuchinha)	1,5%	4	4.000	4.000	4.000	12.000
	4,5%	4	4.000	4.000	4.000	12.000
TOTAL	-	32	-	-	-	96.000

Nota: *CO (0h) – controle do próprio bulbo em água destilada; **TR (24h) – tratamento com os extratos; ***RE (24 h) – recuperação em água destilada.

Fonte: os autores.

Para a preparação das lâminas, as radículas foram lavadas três vezes com água destilada, secas em papel absorvente e colocadas em solução fixadora de Carnoy por 10 minutos, sendo, posteriormente, lavadas duas vezes em água destilada, realizando a troca em intervalos de 15 minutos, e preparadas às lâminas para visualização em microscópio óptico na objetiva de aumento de 40x, em que foi avaliado o índice mitótico, a presença de micronúcleos e outras possíveis anormalidades cromossômicas.

Foi calculado o índice mitótico (IM) dividindo-se o número de células em mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo número total de células avaliadas (intérfase e mitose), multiplicando-se o resultado por 100 (IGANCI et al., 2006).

A análise dos dados foi realizada por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney ($p < 0,05$), pelo programa estatístico BioEstat 5.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta os índices médios de divisão mitótica \pm erro padrão obtidos para o controle (CO), o tratamento com o extrato aquoso (TR) e a recuperação em água destilada (RE), nas concentrações de 1,5% e 4,5% do extrato aquoso de *S. byzantina* C. Koch. (pulmonária). Como resultado da análise estatística por meio do Teste de Mann-Whitney ($U - p < 0,05$), as raízes expostas às concentrações de 1,5% de extrato apresentaram índices mitóticos médios significativamente inferiores ao controle ($U = 2,29$; $p < 0,05$). Após exposição às concentrações de 1,5%, as raízes foram colocadas para recuperação em água destilada, apresentando índices mitóticos médios inferiores ao controle ($U = 2,32$; $p < 0,05$), mostrando que, após a exposição, as células continuam a apresentar taxa mitótica inferior em relação àquelas que não foram expostas.

Comparando com os dados obtidos por Fachinetti e Tedesco (2009), a espécie *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle também apresentou redução dos valores de IM, já na concentração usual pela população (15 mg mL^{-1}) em relação ao controle.

Nas concentrações de 4,5% de extrato aquoso, as raízes expostas apresentaram índices mitóticos médios significativamente inferiores ao controle ($U = 2,32$; $p < 0,05$). As raízes expostas à concentração de 4,5% de extrato aquoso de pulmonária e recuperação em água destilada apresentaram índices mitóticos médios inferiores ao controle ($U = 2,16$; $p < 0,05$), mostrando que, após a exposição ao extrato aquoso (4,5%), as células permaneceram com taxas mitóticas inferiores àquelas que não foram expostas.

Os resultados demonstram que houve alterações no índice mitótico entre as concentrações das infusões, observando-se um decréscimo no índice mitótico com o aumento da concentração (1,5% e 4,5%). Mesmo após 24h em recuperação, o índice mitótico permaneceu inferior ao controle em ambas às concentrações.

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Peron et al. (2008) em pesquisa com as plantas *Camellia sinensis* (chá verde) e *Cassia angustifolia* (chá sene), em que após o tratamento com as amostras do chá verde, foi observado que houve diminuição do índice de divisão celular nos tratamentos. Essa diminuição aumentou com o tempo de 24h de recuperação.

Tabela 2 – Índice Mitótico (IM) de células meristemáticas de *Allium cepa* no tratamento com o extrato aquoso da *S. byzantina* (pulmonária), nas concentrações de 1,5% e 4,5%

CO (0h)*		TR (24h)**		RE (24h)***	
1,5%	4,5%	1,5%	4,5%	1,5%	4,5%
7,10	6,80	5,20	2,90	6,50	5,90
7,50	6,70	5,50	2,90	6,20	6,60
6,80	7,10	5,10	2,70	5,90	5,70
7,00	6,60	4,90	3,00	6,70	4,40
7,10 \pm 0,14	6,8 \pm 0,11	5,18 \pm 0,12	2,87 \pm 0,06	6,32 \pm 0,17	5,65 \pm 0,46

Nota: *Controle (CO) 0h; **Tratamento (TR) 24h; ***Recuperação (RE) 24h. Média \pm erro padrão.

Fonte: os autores.

Os resultados da Tabela 3 indicam que as concentrações de 1,5% de extrato aquoso de *T. majus* L. (capuchinha) apresentaram índices mitóticos médios significativamente inferiores ao controle (U = 2,31; p<0,05). As raízes que foram expostas às concentrações de 1,5% de extrato aquoso de capuchinha e recuperação em água destilada apresentaram índices mitóticos médios superiores ao controle (U = 2,02; p<0,05), demonstrando que, após a exposição, as células apresentam taxas mitóticas superiores àquelas que não foram expostas.

As raízes expostas às concentrações de 4,5% de extrato aquoso de *T. majus* L. (capuchinha) apresentaram índices mitóticos médios significativamente inferiores ao controle (U = 2,30; p<0,05). As raízes que foram expostas às concentrações de 4,5% de extrato aquoso de *T. majus* L. (capuchinha) e recuperação em água destilada apresentaram índices mitóticos médios inferiores ao controle (U = 2,12; p<0,05), mostrando que, após a exposição, as células continuaram a apresentar taxas mitóticas inferiores àquelas que não foram expostas.

Os resultados demonstram que houve alterações significativas no índice mitótico entre as concentrações das infusões, observando-se um decréscimo do índice mitótico com o aumento da concentração. As concentrações de 1,5% e 4,5% diferiram significativamente do controle. Após recuperação em água destilada, o tratamento em concentração 1,5% apresentou aumento do índice mitótico, enquanto na concentração 4,5%, os índices mitóticos foram inferiores ao controle. Sugere-se que para a concentração de 4,5% seja necessário um tempo maior de recuperação para atingir o índice mitótico do controle.

Fachinetto et al. (2007) realizaram testes com o extrato de *Achyrocline satuireioides* (marcela) e obtiveram como resultado uma diminuição significativa do índice mitótico das células de *Allium cepa* após 24 h de exposição em cada concentração do extrato, quando comparados ao grupo controle. Esses resultados indicam a presença de atividade anti-proliferativa e citotóxica dessa espécie, indicando seu potencial terapêutico para a inibição do ciclo celular.

Tabela 3 – Índice Mitótico (IM) de células meristemáticas de *Allium cepa* no tratamento com o extrato aquoso da *Tropaeolum majus* L. (capuchinha), nas concentrações de 1,5% e 4,5%

CO (0h)*		TR (24h)**		RE (24h)***	
1,5%	4,5%	1,5%	4,5%	1,5%	4,5%
5,70	6,10	5,40	3,60	7,20	5,80
6,70	6,20	5,20	3,20	6,90	4,30
5,90	7,00	5,40	3,80	7,00	5,50
6,40	6,80	5,60	3,70	6,50	4,30
6,17±0,23	6,52±0,22	5,4±0,08	3,57±0,13	6,90±0,15	4,97±0,39

Nota: *Controle (CO) 0h; **Tratamento (TR) 24h; ***Recuperação (RE) 24h. Média ± erro padrão.

Fonte: os autores.

Os resultados da Tabela 4 indicam que as raízes expostas ao extrato alcoólico de *S. byzantina* C. Koch. (pulmonária) na concentração de 1,5% apresentaram índices mitóticos significativamente inferiores ao controle (U=2,31; p<0,05). Raízes expostas à concentração de 1,5% e recuperação em água destilada apresentaram índices mitóticos médios não significativos em relação ao controle, demonstrando que, após a exposição, as células apresentaram índices mitóticos semelhantes as que não foram expostas.

As raízes expostas às concentrações de 4,5% de extrato alcoólico de *S. byzantina* C. Koch. (pulmonária) apresentaram índices mitóticos médios não significativos em relação ao controle (U = 1,59; p<0,05). As raízes que foram expostas às concentrações de 4,5% de extrato alcoólico de *S. byzantina* C. Koch. (pulmonária) e recuperação em água destilada apresentaram índices mitóticos médios não significativos em relação ao controle (U = 2,28; p<0,05), mostrando que, após a exposição, as células continuaram a apresentar taxas mitóticas semelhantes àquelas que não foram expostas.

Tabela 4 – Índice Mitótico (IM) de células meristemáticas de *Allium cepa* no tratamento com o extrato alcoólico da pulmonária *S. byzantina* C. Koch. (pulmonária), nas concentrações de 1,5% e 4,5%

CO (0h)*		TR (24h)**		RE (24h)***	
1,5%	4,5%	1,5%	4,5%	1,5%	4,5%
3,20	0,60	0	0	2,30	0,30
2,30	0,90	0	0,20	1,10	3,60
1,50	2,50	0,20	0,50	3,80	0,00
1,70	0,40	0,60	0,60	0,50	1,60
2,17±0,38	1,1±0,48	0,20±0,14	0,32±0,13	2,12±0,73	1,37±0,82

Nota: *Controle (CO) 0h; **Tratamento (TR) 24h; ***Recuperação (RE) 24h. Média ± erro padrão.

Fonte: os autores.

Os resultados da Tabela 5 indicam que as raízes expostas ao extrato alcoólico de *T. majus* L. (capuchinha) na concentração de 1,5% apresentaram índices mitóticos médios significativamente inferiores ao controle ($U=2,31$; $p<0,05$). As raízes que foram expostas às concentrações de 1,5% de extrato alcoólico de capuchinha e depois tiveram recuperação em água destilada apresentaram índices mitóticos médios superiores ao controle ($U=2,31$; $p<0,05$), mostrando que, após a exposição, as células apresentam taxa mitóticas superiores àquelas que não foram expostas.

As raízes expostas às concentrações de 4,5% de extrato alcoólico de *T. majus* L. (capuchinha) apresentaram índices mitóticos médios não significativos em relação ao controle ($U=1,15$; $p<0,05$). As raízes que foram expostas às concentrações de 4,5% de extrato alcoólico de capuchinha e depois tiveram recuperação em água destilada apresentaram índices mitóticos médios inferiores ao controle ($U=2,16$; $p<0,05$), mostrando que, após a exposição, as células continuaram a apresentar taxas mitóticas inferiores àquelas que não foram expostas.

Tabela 5 – Índice Mitótico (IM) de células meristemáticas de *Allium cepa* no tratamento com o extrato alcoólico *Tropaeolum majus* L. (capuchinha), nas concentrações de 1,5% e 4,5%

CO (0h)*		TR (24h)**		RE (24h)***	
1,5%	4,5%	1,5%	4,5%	1,5%	4,5%
3,80	2,10	0	0,60	0,20	1,40
4,70	1,40	0	0,40	1,10	1
8,10	1,70	0,90	0,50	0,20	0,80
2,70	4	0	5,10	2,30	0,30
4,82±1,17	2,30±0,58	0,22±0,22	1,65±1,15	0,95±0,50	0,87±0,23

Nota: *Controle (CO) 0h; **Tratamento (TR) 24h; ***Recuperação (RE) 24h. Média ± erro padrão.

Fonte: os autores.

4 CONCLUSÃO

No presente estudo com extratos aquosos e alcoólicos de *Stachys byzantina* C. Koch. (pulmonária) e *Tropaeolum majus* L. (capuchinha) não foram observadas alterações cromossômicas do tipo micronúcleos, com o sistema teste utilizado, em nenhuma das concentrações testadas.

Constatou-se que houve redução do índice mitótico em relação ao controle em todos os tratamentos com os extratos das plantas testadas.

Nos tratamentos de recuperação houve variação entre os extratos e as concentrações, sugerindo-se novas avaliações para esse tratamento, em um período de tempo maior.

Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of Stachys byzantina C. Koch. (lungwort) and Tropaeolum majus L. (nasturtium) extracts using the Allium cepa test system

Abstract

Globally, there is a multitude of medicinal plants used to treat diseases. However, the action of the substances present in these plants is still poorly studied and it is known that it can induce changes in the genetic material. The plants Stachys byzantina C. Koch. (lungwort) and Tropaeolum majus L. (nasturtium) are used in popular medicine as a function of its anti-inflammatory and diuretic properties, respectively. This study aimed to evaluate the cytotoxic and genotoxic effect of "teas", using the Allium cepa test system. We collected fresh leaves of the plants for preparation of aqueous and alcoholic extracts in concentrations 1.5% and 4.5%. The bulbs were embedded in distilled water for 72 hours, then, transferred to the treatment for 24 hours. The root tips were collected, fixed in Carnoy solution for 10 minutes, and stained. The bulbs were placed again in distilled water for 24 hours to examine the recovery. The results showed that the treatment with the aqueous and alcoholic extracts of S. byzantina C. Koch. (lungwort) and T. majus L. (nasturtium) had significantly lower average mitotic index of control. The recovery treatment in distilled water showed average variation of mitotic index compared to control. From the results obtained, it was found that extracts of these plants showed no genotoxic effect, but presented antiproliferative effect at the concentrations studied.

Keywords: Allium cepa. Medicinal plants. Cytotoxicity.

REFERÊNCIAS

COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. **Biomonitoramento de mutagênese ambiental**. Biotecnologia: ciência e desenvolvimento, 2000.

FACHINETTO, J. M. et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de Achyrocline satureioides DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de Allium cepa. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 49-54, jan./mar. 2007.

FACHINETTO, J. M.; TEDESCO, S. B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de Baccharis trimera (Less.) A. P. de Candolle e Baccharis articulata (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de Allium cepa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 360-367, 2009.

IGANCI, J. R. V. et al. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de Allium cepa. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 79-82, jan./mar. 2006.

PERON, A. P. et al. Avaliação do potencial citotóxico dos chás de Camellia sinensis L. e Cassia angustifolia vahl em sistema teste vegetal. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, v. 12, n. 1, p. 51-54, jan./abr. 2008.

VICENTINI, V. E. P. et al. Avertirhoa carambola L., Syzygium cumini (L.) Skeels and Cissus sicyoides L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, 2001.