

Avaliação da genotoxicidade e hemotoxicidade do extrato aquoso das folhas de *Gossypium hirsutum* L.

Ester Dias Ruas¹ (IC)* esterdiasbio@gmail.com, Camila Soares dos Santos¹ (IC), Liliane de Sousa Silva (PQ)¹, Carla Rosane Mendanha da Cunha¹ (PQ).

Universidade Estadual de Goiás – Câmpus Itapuranga. Avenida Rio Araguaia Esq. C/ Rio Paranaíba S/ N° Bairro: Setor Miltom Camilo de Faria Cidade: Itapuranga – GO.

Resumo: *Gossypium hirsutum* L. é uma planta popularmente conhecida como algodoeiro, e de acordo com o conhecimento empírico na terapêutica, é utilizada como anti-inflamatório, analgésico, antibacteriano, antifúngico, bem como contra hemorragias uterinas. Apesar do uso popular da planta ser frequente, ainda não foram definidos os parâmetros de segurança para o uso da mesma. Este trabalho visou estabelecer parâmetros de toxicidade da *Gossypium hirsutum* L. No que se refere ao teste hemotóxico foi observado a ocorrência de hemólise nas concentrações de 100 a 25% do extrato aquoso. Já análise do potencial mutagênico utilizando o teste de micronúcleo com concentrações de 100 a 3,125% do extrato aquoso. Nesse teste de potencial mutagênico foi observado morte celular total após exposição a concentração de 10%. Já na concentração de 5% foi verificado a prevalência de alterações nucleares, como núcleos binucleados e a presença de micronúcleo na frequência de 6%. Já utilizando a técnica do cometa observa-se danos no DNA apenas em altas concentrações do extrato nas concentrações de até 2mg observa-se baixa genotoxicidade, semelhante ao do controle. Nesse caso classificamos o extrato no score 1. Conclui-se então que o extrato aquoso de *G. hirsutum* L. é capaz de causar lise celular em hemácias em concentrações de até 25 % e morte celular de leucocitos em concentrações de até 10%, no entanto, no que tange a evidências de genotoxicidade a mesma não foi observada de forma significativa por nenhuma metodologia utilizada.

Palavras-chave: Mutagenicidade. Potencial hemolítico. Plantas medicinais

Introdução

O Cerrado apresenta um extenso número de plantas com potencial terapêutico e uma grande diversidade cultural que influencia na utilização a fins medicinais, Guarim Neto & Moraes (2003) compilaram que este bioma abriga mais de 600 espécies fitoterápicas, sendo que grande maioria são endêmica desta região e as outras em comum com outros biomas.

Muitos fatores vêm demonstrando a necessidade do estudo contínuo de plantas medicinais com finalidade terapêutica, dentre eles: resistência dos micro-organismos aos fármacos convencionais, tumores, toxicidade não seletiva dos medicamentos e efeitos colaterais gerados por espécies reativas de oxigênio produzidas durante a terapia medicamentosa. Segundo Bucker e colaboradores (2006) os testes toxicológicos são utilizados para caracterizar que tipo de efeito tóxico que uma substância ou conjunto de substâncias podem produzir.

Vários estudos realizados têm demonstrado que muitas substâncias extraídas de plantas medicinais podem causar danos ao material genético, caracterizando-se em mutação podendo ocorrer adição ou até mesmo substituição e deleção de base no DNA. A genética que estuda a toxicológica tem como principal objetivo, detectar e entender a ação de determinadas substâncias denominadas genotoxinas e compostos genotóxicos sobre o organismo, gerando alterações cromossômicas, com especificidade para ácidos nucleicos, especialmente DNA. (FONSECA; PEREIRA, 2004).

Sendo assim, esse artigo teve como objetivo analisar a citotoxicidade e a genotoxicidade do extrato aquoso de folhas de *G. hirsutum* L., uma planta usada popularmente com finalidade medicinal, com a finalidade de avaliar o potencial toxicológico e fornecer indícios que corroborem para estabelecer um parâmetro de segurança.

Material e Métodos

O material botânico das folhas de *G. hirsutum* foi coletado na cidade de Itapuranga – GO, situada na região centro-oeste do Brasil, no ano de 2016 nos meses de setembro e dezembro. A exsicata da planta em estudo foi caracterizada e depositada no Herbário de Botânica (HERBOT) da UEG campus Itapuranga.

O teste do Potencial Hemolítico para análise da toxicidade de compostos químicos em hemácias humanas foi realizado de acordo com Zohra e Fawzia (2014).

Para a realização do teste de avaliação do potencial hemolítico foi preparada uma solução de eritrócitos a 2% (SE 2%). Uma solução estoque de cada composto teste e da solução Trinton X a 5 mg/ mL capaz de lisar 100% das hemácias, soluções de salina com as respectivas concentrações dos extratos testados para controle de cor e soluções do extratos nas concentrações de 100%; 75%; 50%; 25%; 12,5%; 3,125%; 1,56%. Após, a solução com 2% de hemácias foram incubadas com o controle positivo, controle negativo e com cada concentração do extrato. Para interpretar o resultado é feita a análise do sobrenadante comparando a presença de hemólise com o controle positivo (hemólise total) e controle negativo (ausência de hemólise).

Já o potencial genotóxico dessa planta foi avaliado por duas metodologias o teste de micronúcleo e o ensaio cometa. O procedimento técnico e informações descritas para esse teste foram fornecidas pelo Núcleo de Pesquisa Replicon, Laboratório de Citogenética e Genética Molecular pelo Grupo de estudo em mutagênese animal e ambiental (GEMMA) da PUC-GO.

O ensaio de micronúcleo foi realizado com leucócitos humanos de voluntários. Esses leucócitos foram expostos à diferentes dosagens do extrato aquoso da planta estudada, sendo as concentrações de 10% a 5%, por 24h e posteriormente à preparação do esfregaço, coloração e análises das lâminas realizadas de acordo com Ribeiro e colaboradores (2003).

O Ensaio Cometa sob condições alcalinas é uma técnica eletroforética sensível, reprodutível, simples e rápida para a detecção da presença de quebras de fita única de DNA em células de mamífero *in vitro* e *in vivo*. Sendo assim, leucócitos humanos foram incubados com os extratos aquosos de *G. hirsutum* nas concentrações de 0,5mg/L; 1,0mg/L e 1,5mg/L. Em seguida lâminas contendo agarose 1,5% será adicionada agarose “*low melting*” contendo sangue heparinizado. Posteriormente, as lâminas serão incubadas a 4°C para solidificar. Após a solidificação as lâminas foram colocadas em cubeta de vidro vertical, já com a solução de lise gelada e protegida da luz (pelo menos 1 h em solução de lise). Realizada a lise, as lâminas foram colocadas em cuba horizontal de eletroforese, com solução tampão, deixando-as por 20 min; iniciará a eletroforese: 25V e 300mA por 25 min (corrente controlada com o

volume do tampão). As lâminas foram retiradas e neutralizadas com o tampão TRIS e fixadas com etanol. Para coloração foi adicionado 20ul de Brometo de etídeo na lâmina. Para a visualização dos danos do DNA, as lâminas serão observadas em aumento 400x ou 630x, usando-se microscópio de fluorescência equipado com filtro de excitação de 515 – 560 nm e um filtro de barreira de 590 nm. Foram analisadas 50 células de cada amostra, as quais foram visualmente classificadas e agrupadas em quatro **“score”**: **“score”** 0 - sem dano, cauda ausente; **“score”** 1 - dano pequeno, com cauda menor que o diâmetro da cabeça; **“score”** 2 - dano médio, com cauda maior que o diâmetro da cabeça; **“score”** 3 - dano máximo, com cauda duas vezes maior que o diâmetro da cabeça segundo Silva e Souza (2010).

Após a análise das imagens obtidas dos cometas calculou-se o índice de dano genômico individual (IDI) para cada **“score”**, para tanto, multiplica-se o número de núcleos observados em cada **“score”** pelo valor de dano genômico de cada **“score”**. Para calcular o índice de dano genômico total pela fórmula a seguir:

$$IDi = N^{\circ} \text{ Com } \times \text{ Score}$$

EQUAÇÃO : Cálculo do índice de danos genômicos. IDi representa o índice de danos genômicos.

Resultados e Discussão

A partir do teste de potencial hemolítico, constatou-se que o extrato aquoso de *G. hirsutum* L possui efeitos de toxicidade aguda sobre as células sanguíneas nas concentrações de 100% e 75%, onde observa-se hemólise parcial (++) e na concentração de 50% houve apenas hemólise em baixa intensidade (+). Já em concentrações inferiores a 25% não foi observado hemólise nos eritrócitos humanos os quais mantinham a integridade das células não observando lise. Sendo assim o composto foi considerado hemotóxico em concentrações de até 50% do extrato bruto.

TABELA 1: PERFIL DE HEMOTOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *G. hirsutum* L.

Potencial Hemolítico da *G. hirsutum* L.

Concentrações utilizadas	Presença de hemólis
100%	++
75%	++
50%	+
25%	-
12,5%	-
6,25%	-
3,125%	-
1,5625%	-

Capacidade hemolítica na qual: (+++) hemólise total, (++) hemólise parcial intensa, (+) hemólise parcial leve e (-) não houve hemólise.

Fonte: Autor, 2016.

Já na análise genotóxica do extrato da *G. hirsutum* L., pelo método do micronúcleo, observamos morte celular intensa das células sanguíneas na concentração de 10% do extrato, impossibilitando análise do efeito mutagênico e genotóxico. Já nas concentrações de 5% observamos baixo número de células viáveis demonstrando ainda morte celular. No entanto as células viáveis apresentaram baixa quantidade de alterações que sugerem citotoxicidade como: células binucleadas e micronúcleos. Em concentrações inferiores a 5% de extrato aquoso não observamos morte celular e nenhuma alteração morfológica sugestiva de genotoxicidade.

TABELA 2: ANÁLISE MICROSCÓPICA DE FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEO

Caso	Normal	Mn	Lb	Rn	Sg	Bn	Total	Frequência De Mn	Frequência De AENs
Controle negativo	100	0	0	0	0	0	100	0%	0%
Concentração 5%	94	2	0	0	0	4	60	2%	4%

Mn: Micronúcleo; Lb: Lobulado; Rn: Riniorme; Sg: Segmentado; Bn: Binucleado.

Fonte: Autor, 2016.

De acordo com os resultados obtidos nesse teste constatamos que apenas abaixo de 5% do extrato aquoso não observamos pelo teste de micronúcleo morte celular e indício de genotoxicidade.

Já quando avaliamos a genotoxicidade pelo ensaio cometa observa-se danos no DNA apenas em altas concentrações do extrato demonstrando nas concentrações de até 2mg, baixa genotoxicidade, semelhante ao do controle. Nesse caso classificamos o extrato no *score* 1.

TABELA 3: DANOS NO DNA DE LINFÓCITOS TRATADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO ALCOÓLICO DOS FRUTOS DE *G. HIRSUTUM* L.

		Número de células						
Grupos		Scores				Score s Total	SDG ¹ (%)	DG ² (%)
		0	1	2	3			
Controle	Negativo	45	5	0	0	5	90	10
<i>G. hirsutum</i> L.	0,5 mg	43	7	0	0	7	86	14
	1 mg	39	11	0	0	11	76	24
	2 mg	37	13	0	0	13	74	26

¹ SDG: número de células sem danos genômico; ² DG: número de células com danos genômico. n=50. Score 1: baixo dano genômico; Score 2: dano genômico moderado; Score 3: dano genômico elevado.

Considerações Finais

O teste de atividade hemolítica do extrato das folhas da espécie *Gossypium Hirsutum* demonstrou possuir nas concentrações de 100% e 75% efeitos de toxicidade aguda sobre eritrócitos humanos. Já na concentração de 50% houve hemólise em baixa intensidade. Nas concentrações de 25%, 12,5%, 3,125 e na 1,56 não foi observado hemólise das hemácias.

Já no teste de micronúcleo foi observado que a planta possui efeitos tóxicos pois em todas concentrações acima de 5% que foram utilizada no teste, houve intensa morte celular dos leucócitos, enquanto na concentração de 5% observou-se baixo número de células viáveis e abaixo de 5% não houve efeito genotóxico.

Através do teste de Ensaio do Cometa foi possível constatar que a planta em estudo apresenta genotoxicidade apenas quando em altas concentrações sendo classificada então como score 1.

Sendo assim, os resultados preliminares demonstraram efeitos genotóxicos do extrato aquoso de *G. hirsutum* L evidenciando a necessidade de ser realizado uma melhor investigação dos efeitos tóxicos dessa planta, inclusive em outras concentrações, assim como avaliar os efeitos sazonais, e utilizando técnicas que possibilitem complementar essa análise. Esses testes possibilitaram avaliar sinais e efeitos de toxicidade bem como estabelecer um perfil de segurança para a utilização desse extrato com finalidade medicinal.

Agradecimentos



PRP
Pró-Reitoria
de Pesquisa
e Pós Graduação

Referências

VIOLANTE, I. M. P. **Avaliação do potencial antimicrobiano e citotóxico de espécies vegetais do Cerrado da Região Centro-Oeste.** Campo Grande, MS: UFMS, 2008.

BUCKER, A.; CARVALHO, A.; GOMES, J. A. **Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmonia virescen* expostos ao benzeno.** Manaus, AM: ACTA Amazônica, 2006.

FONSECA, C. A. da; PEREIRA, D. G. **Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal.** Anápolis, GO: Infarma, 2004.

BARBOSA, V. F. de Sousa; LAURENO, S. P.; BRITO, A. S. **As plantas medicinais mais comercializadas no município de Trindade – Goiás.** Trindade: GO, Faculdade União de Goyazes, 2010.

ZOHRA, M.; FAWZIA, A. **Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria.** International Journal of Pharma Sciences and Research, 2104.