

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DO LÁTEX DE *Croton urucurana* (EUPHORBIACEAE)

***Danilo Dutra Mesquita¹, Angelina Luzia Ciappina², Luciane Madureira de Almeida³**

¹Estudante(IC), ²Estudante (IC), ³Pesquisadora (PQ)

danilomesquita.ddm@gmail.com

Universidade Estadual de Goiás - Câmpus Ipameri

Resumo:

A pesquisa tem por objetivo avaliar o potencial tóxico, citotóxico e genotóxico do látex de *Croton urucurana* (sangra d'água) através de ensaios com *A. cepa*. O teste *Allium cepa* (cebola) que tem apresentado bons resultados, mostrando-se como bioindicador dos efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de plantas medicinais (TEIXEIRA et al., 2003). O teste *A. cepa* utiliza como parâmetro o crescimento das raízes, para avaliar a toxicidade; o índice mitótico, para avaliar a citotoxicidade; e as anomalias mitóticas e aberrações cromossômicas, para avaliar a genotoxicidade (TKALEC et al., 2009). As principais vantagens desse ensaio são o baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade (BAGATINI et al., 2007; FISKESJO, 1985). As análises laboratoriais foram realizadas por meio de amostras do látex que foram coletadas na região de Cerrado da cidade de Ipameri. Por meio deste estudo e tendo por base os resultados aqui apresentados pode-se concluir que o látex de sangra d'água possui atividade citotóxica e genotóxica para as células de *Allium cepa*.

Palavras -Chaves: látex, *Croton urucurana*, toxidade, citotoxicidade, genotoxicidade.

Introdução

Desde primórdios da civilização o homem utiliza diferentes espécies de plantas com finalidades medicinais (TOSCANO RICO, 2011). Atualmente, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de dois bilhões de pessoas no mundo utilizam a medicina popular baseada na extração de princípios ativos das plantas, para o tratamento de doenças (SMITH-HALLE et al., 2012). Dessa forma, extratos de plantas medicinais são um recurso fitoterápico alternativo aos alopáticos por serem relativamente mais acessíveis (BEVILACQUA, 2010; CARNEIRO et al., 2014).

Como há uma vasta gama de plantas com possível potencial farmacológico, identificá-las torna-se uma tarefa difícil. Uma maneira de fazê-lo é a utilização do método etnofarmacológico, que consiste na seleção de plantas consideradas como medicinais em uso por algum grupo étnico (MACIEL et al., 2002).

Algumas plantas lactíferas, principalmente as pertencentes à família Euphorbiaceae, têm sido testadas com relação às suas propriedades neoangiogênicas, isto é, a capacidade de promover a adesão celular e estimular a formação de matriz celular, regenerando assim os tecidos. Como exemplos de

plantas com esse potencial regenerativo comprovado temos: *Hevea brasiliensis* (BALABANIAN et al., 2006; CARVALHO et al., 2008; SAMPAIO et al., 2010); *Hancornia speciosa* (ALMEIDA et al., 2014) e *Synadenium umbellatum* (MELO-REIS, 2010).

Outra lactífera pouco estudada cientificamente, mas a qual é frequentemente utilizada na medicina popular pelo seu potencial medicinal é a sangra d'água, sangue de dragão ou capixingui (*Croton urucurana*). O gênero *Croton* é um dos maiores membros da família Euphorbiaceae, e a espécie *Croton urucurana* é utilizada na medicina popular para estancar hemorragias e sangramentos, evitando infecções e acelerando o processo de cicatrização (LORENZI, 2008). De acordo com NILSSON (1989), a seiva dessa planta apresenta princípios antibacterianos e cicatrizantes. Morfologicamente, a espécie apresenta porte arbóreo e é encontrada em terrenos úmidos e alagadiços. A árvore é capaz de atingir de 6 a 8 metros de altura, com tronco de tonalidades claras podendo alcançar 20 centímetros de diâmetro. Sua copa é aberta e com folhas em formato de coração que, quando em senescência, adquirem coloração vermelho-amarelada (LORENZI e MATOS, 2008; SOLDERA et al., 2010).

Estudos que avaliem o potencial tóxico de plantas medicinais são extremamente importantes, pois servem para orientar a população sobre o uso indiscriminado de extratos biológicos que podem eventualmente causar danos à saúde (TEDESCO et al., 2015). Entre as várias metodologias existentes para se avaliar o efeito tóxico, pode-se citar os bioensaios com plantas superiores, as quais avaliam a capacidade de uma substância em promover danos à viabilidade celular ou material genético de outros organismos eucariontes (FERNANDES et al., 2007).

Um desses bioensaios é o teste *Allium cepa* (cebola) que tem apresentado bons resultados, mostrando-se como bioindicador dos efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de plantas medicinais (TEIXEIRA et al., 2003). O teste *A. cepa* utiliza como parâmetro o crescimento das raízes, para avaliar a toxicidade; o índice mitótico, para avaliar a citotoxicidade; e as anomalias mitóticas e aberrações cromossômicas, para avaliar a genotoxicidade (TKALEC et al., 2009). As principais vantagens desse ensaio são o baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade (BAGATINI et al., 2007; FISKESJO, 198

Material e Métodos

A. Obtenção do Material Biológico

As amostras do látex foram coletadas na região de Cerrado da cidade de Ipameri.

B. Identificação da espécie e depósito em herbário

Fragmentos da planta foram coletados contendo ramos de aproximadamente 30 centímetros com folhas e parte reprodutiva. Fez-se a classificação e posteriormente a dessecação do material em estufa, com prensas de madeira, papelão e jornal. Estando o material vegetal seco, foram feitas exsiccatas e estas depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Goiás localizado em Anápolis

C. Obtenção de *A. cepa*

Para a execução do teste foram utilizadas cebolas de mesma origem e tamanho médio, com catáfilos externos brancos não germinados e saudáveis. As cebolas foram adquiridas comercialmente e foram mantidas em local livre de umidade e ao abrigo da luz.

D. Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram compostos de 3 diferentes concentrações da seiva de sangra d'água: soluções de látex a 1%; 0,5% e 0,1%. Além do controle negativo (água destilada) e o controle positivo (ázida sódica 0,02 g/L).

E. Procedimentos

Foram distribuídos 10 bulbos para cada concentração a ser testada, tendo-se o cuidado de retirar com auxílio de bisturi as raízes secas e camadas externas secas ou com mofo. Em seguida, o parênquima central da coroa de brotamento foi retirado para aumentar a absorção das soluções, a uniformidade de brotamento e o crescimento das raízes. Os bulbos foram lavados em água corrente, por cerca de 20 minutos. A seguir os bulbos foram colocados em recipientes de vidro (Becker), previamente esterilizados, com capacidade de 50 mL, deixando a área radicular diretamente em contato com água. Após 48 horas de exposição à água, os bulbos foram medidos com régua, e posteriormente transferidos para recipientes contendo as soluções testes. As raízes foram cultivadas em cada tratamento por mais 72 h e em seguida as pontas dessas raízes foram medidas, cortadas e utilizadas para análise citogenética. As raízes foram fixadas em solução de Carnoy (etanol 99%;

ácido acético glacial - 3:1) por 24h, e refrigeradas até o momento da preparação das lâminas.

F. Análises do comprimento da raiz

Foi avaliado o potencial tóxico pela análise do comprimento da raiz medida em centímetros. Foi realizada a análise estatística descritiva básica dos resultados obtidos e as médias foram comparadas pelo teste de comparação de médias (ANOVA).

G. Preparo das lâminas:

Foram utilizadas 2 a 3 raízes de cada bulbo, colocando-as em uma placa de Petri e lavando-as 3 vezes em água para a retirada do fixador. A seguir foi feito a hidrólise com HCl 5M de 1 a 2 minutos, seguido de dois novos banhos em água destilada à temperatura ambiente. Com o auxílio de uma pinça de ponta fina, as raízes foram secas em papel filtro, retirando posteriormente a região meristemática e colocando-a nas lâminas com uma gota de ácido acético (45%), em seguida fez-se o esfregão e colocou-se a lamínula, as lâminas foram então mergulhadas no nitrogênio líquido por 30 segundos retirando a lamínula no final do procedimento. Por fim foram coradas com Giemsa a 10%.

H. Análises das lâminas:

Os seguintes parâmetros foram avaliados: 1. índice mitótico (IM); 2. frequência de anomalias de ciclo mitótico (ACM) e 3. incidência de micronúcleos (M). Determinou-se o IM utilizando a equação: $IM = NCM/NTC \times 100$, em que NCM corresponde ao número de células em divisão mitótica e NTC ao número total de células analisadas (PEREIRA, 2015). Como anomalias no ciclo mitótico foram considerados os cromossomos perdidos e fragmentos cromossômicos em anáfase, pontes anafásicas e atrasos metafásicos (SILVA et al., 2009). Também foi observado a incidência de micronúcleos, que são fragmentos acêntricos de cromossomos que não conseguem incorporar ao núcleo das células durante a telófase. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística.

Resultados e Discussão

A. Teste de toxicidade

Como resultado, foi possível observar o potencial tóxico do látex de sangra d'água, uma vez que os bulbos expostos a essas soluções não apresentaram crescimento significativo da radícula nas concentrações superiores a 0,1%. Em água o crescimento observado foi o mais elevado atingindo média de 1,2 cm. Já em azida sódica o crescimento médio foi de 0,2 cm. Entre as concentrações o crescimento observado foi inferior ao do controle positivo (azida sódica), comprovando assim sua toxicidade no sistema *A. cepa*. Nas demais, não houve diferenciação estatística significativa, assim como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Comparação das médias obtidas com o crescimento radicular de *Allium cepa* sob diferentes tratamentos utilizando teste de Tukey ($p < 0,05\%$).

Tratamentos	Média Crescimento (cm)	Desvio padrão	Classificação
Água	1,2	0,54	A
Azida	0,2	0,291	B
0,1%	0,1	0,185	BC
0,5%	0	0,07	C
1,0%	0	0,032	C

Tratamentos com letras iguais não diferenciam-se pelo teste de Tukey a 5%.

B. Teste de citotoxicidade e genotoxicidade

A avaliação citotóxica é baseada na alteração do índice mitótico dos diferentes tratamentos, sendo considerada, na literatura, interferência citotóxica a substância capaz de inibir 22% do índice mitótico em relação ao controle negativo (ANTONSIE-WIEZ, 1990) e em maior quantidade de inibição, acima de 50%, a substância é interpretada como fator potencial de efeito letal ao organismo teste (PANDA e SAHU, 1985), sendo considerada citotóxica por comprometer o crescimento e desenvolvimento dos organismos expostos (PEREIRA, 2015).

Analisando os dados apresentados na Tabela 2, pode-se perceber que todas as soluções contendo *C. urucurana* ocasionaram uma diminuição do índice mitótico maior que 50% quando comparadas ao controle negativo (água), sendo estatisticamente equivalentes ao controle positivo (azida sódica). Dessa forma, observa-se que a substância analisada causa morte celular das raízes de *A. cepa*

devido à inibição da duplicação celular, comprovando o efeito citotóxico de *C. urucurana*.

Tabela 2: Análise das lâminas do teste de *Allium cepa* quanto à citotoxicidade e genotoxicidade.

Tratamentos	Total de células	Células em Divisão	Citotoxicidade	Genotoxicidade	
			Índice Mitótico (%)	Número de Anomalias	Número de Micronúcleos
Água	5839	1634	27,98 B	0 A	0 A
Azida	6042	457	7,56 A	244 C	81 B
0,1%	5304	198	3,73 A	97 C	62 B
0,5%	5444	61	1,12 A	13 B	1 A
1,0%	5971	34	0,56 A	4 B	2 A

Tratamentos com letras iguais não diferenciam-se pelo teste de Tukey a 5%.

O teste de genotoxicidade visa identificar se a substância analisada afeta processos vitais para a célula, como a duplicação e a transcrição gênica, tornando processos corriqueiros em complexos e cancerosos (COSTA E MENK, 2000). Este teste consiste em verificar a frequência de micronúcleos, aberrações cromossômicas e alterações no índice mitótico nas células do meristema radicular (FISKESJÖ, 1985).

Para as soluções de *C. urucurana*, principalmente para as duas maiores concentrações (1,0 e 0,5%) foi observado uma baixa incidência de anomalias e micronúcleos quando comparadas ao controle positivo (azida sódica), porém em quantidade superior ao controle negativo (água). Isto pode ser explicado pelo efeito citotóxico, onde com a possível morte celular das raízes de *A. cepa*, o número de células em divisão é praticamente nulo, não sendo possível a observação de aberrações cromossômicas. Por conseguinte, na menor concentração do látex de *C. urucurana* (0,1%), existem algumas células em processo de duplicação, elevando o índice mitótico, e permitindo a observação de aberrações cromossômicas e micronúcleos (Figura 1). A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre o controle positivo (azida sódica) e o látex a 0.1% classificando esta substância como genotóxica. A Figura 1 exemplifica os diferentes tipos de anomalias cromossômicas observadas.

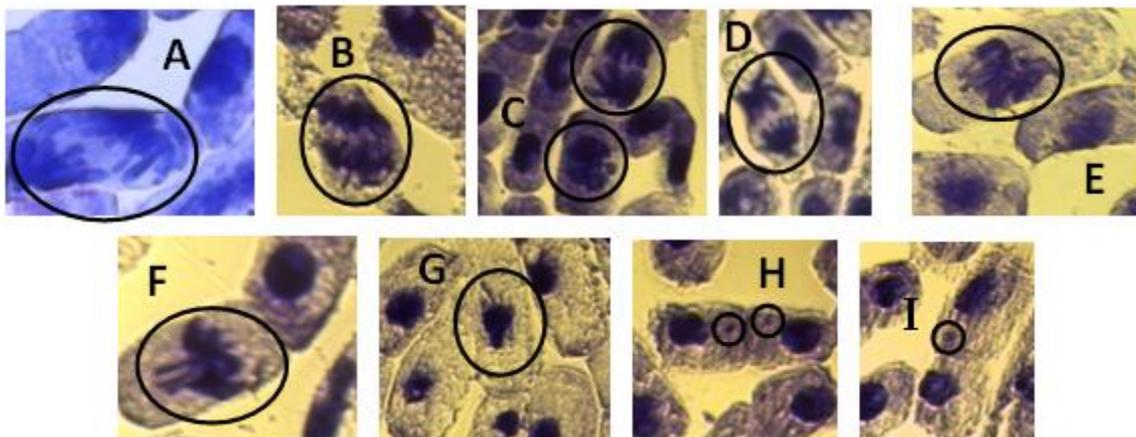


Figura 1: Fotografias de células das raízes de cebola em diferentes concentrações de látex de *Croton urucurana* com aumento de 40x e 100x. **A:** células na concentração de 0,1% com anomalia de cromossomos pegajosos; **B:** células na concentração de 0,1% com anomalia de cromossomos retardatários; **C:** células na concentração de 0,1% apresentando brotamento celular e cromossomos pegajosos; **D:** células na concentração de 0,5% com anomalia de cromossomos retardatários; **E:** células na concentração de 1% com anomalia de cromossomos pegajosos e **F e G:** células na concentração de 0,1% com anomalia de cromossomos perdidos; **H:** células na concentração de 0,1% com presença de micronúcleo; **I:** células na concentração de 1% com presença de micronúcleo.

Tais resultados corroboram com os de DUTRA et al. (2011) afirmando efeito citotóxico dos extratos de *C. urucurana* em *Artemia salina*. Também é possível encontrar relatos de toxicidade em outras plantas do mesmo gênero de *Croton urucurana* como: *Croton mummularius* (BASTOS, 2014) e *Croton zehntneri* (COSTA et al. 2008).

De forma geral pode-se concluir que ainda há a necessidade de mais estudos sobre o potencial medicinal de *C. urucurana* e o uso empírico e indiscriminado do látex desta planta pode trazer efeitos negativos a população.

Considerações Finais

Tendo por base os resultados aqui apresentados pode-se concluir que o látex de sangra d'água possui atividade citotóxica e genotóxica para as células de *Allium cepa*.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Goiás e Pró-Reitoria de Pesquisa pela bolsa de estudo e pelo estímulo e a Dr^a Luciane Madureira de Almeida pela oportunidade e confiança.

Referências

ALMEIDA, L. M.; FLORIANO, J. F.; RIBEIRO, T. P.; MAGNO, L. N.; MOTA, L. S.; PEIXOTO, N.; MRUÉ, F.; MELO-REIS, P.; LINO JUNIOR, R. D. E. S.; GRAEFF, C. F.; GONÇALVES, P. J. *Hancorniaspeciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. **Journal of Materials Science**. Materials in Medicine, v. 25, p. 2153-2162, 2014.

ANTONSIE-WIEZ, D. Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of *Leda krin*. **Folia Histochemica et Cytobiologica**. vol. 26, p. 79-96, 1990.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; 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. 444-7, 2007.

BALABANIAN, C. A.; COUTINHO-NETTO, J.; LAMANO-CARVALHO, T. L.; LACERDA, S. A.; BRENTGANI, L. G. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. **Journal of Oral Science**, v. 48, p. 201-205, 2006.

BASTO, S. R. L. *Croton nummularius* Baill. (Euphorbiaceae): composição química, atividade biológica, antioxidante e toxicidade preliminar dos óleos essenciais. 2014. 46f. **Tese (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia)**. Universidade Federal do Pernambuco. Recife/PE. 2014.

BEVILACQUA, H. G. C. R. Planejamento de horta medicinal e comunitária. **Divisão Tec. Esc. Municipal de Jardinagem / Curso de Plantas medicinais**. 2010.

CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**. v.3, n. 2, p.44-75. 2014.

CARVALHO, B.R.; REIS, R. M.; COUTINHO NETTO, J.; MOURA, M. D.; NOGUEIRA, A. A.; FERRIANI, R. A. Natural latex (*Hevea brasiliensis*) mold for neovaginoplasty. **Rev. Bras.GinecolObstet**,v.30, n.1, p.31-35, 2008.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; PEREIRA, C. K. B.; SOUZA, E. O.; CALDAS, G. F. R.; SILVA, M. R.; SANTOS, N. K. A.; MOTA, M. L.; SANTOS, P. F. Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacologia**. V. 18, n. 1, p. 583-586. 2008.

COSTA, R. M. A.; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Projeto Genoma do Câncer**, p. 24, 2000.

DUTRA, L. M.; SILVA, K. A.; RAMOS, L. M.; COSTA, M. B. Fitoquímica de *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae): Identificação, isolamento e avaliação citotóxica de metabólitos secundários. **Anais do IX Seminário de Iniciação Científica, VI Jornada de Pesquisa e Pós-Graduação e Semana Nacional de Ciência e Tecnologia** Universidade Estadual de Goiás. 2011.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **PesticBiochem Physiology**, n.88, p.252–259, 2007.

FISKESJO, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Plantarum**.p. 114. 2008.

LORENZI, H.; MATOS, J. A. de. Plantas medicinais no Brasil. **Instituto Plantarum**.2. ed. p. 243-244. 2008.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, Vol. 25, N. 3, 429-438. Rio de Janeiro, 2002.

MELO-REIS, P.R. Angiogenic activity of *Symadeniumumbellatum*Pax latex. **Braz. J. Bio.**,v. 70, p. 189-194, 2010.

NILSSON, T. T. Levantamento do potencial econômico da mata ciliar e sugestões quanto ao seu aproveitamento racional. **SIMPÓSIO SOBRE MATA CILIAR**. p.144. 1989.

PANDA, B. B.; SAHU, U. K. Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide fensulfothion. **Cytobios**, 1985.

PEREIRA, A. S. Avaliação do potencial mutagênico da água de retorno das lavouras de arroz de Capivari do Sul (Rio Capivari, RS), através do sistema teste *Allium cepa*. 2015. 41f. **Dissertação (Bacharel em Ciências Biológicas)** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Imbé/RS. 2015.

SAMPAIO, R.B.; MENDONÇA, R. J.; SIMIONI, A. R.; COSTA, R. A.; SIQUEIRA, R. C.; CORREA, V. M.; TEDESCO, A. C.; HADDAD, A.; COUTINHO NETTO, J.; JORGE, R. Rabbit retinal neovascularization induced by latex angiogênica derived fraction: an experimental model. **Curr. Eye. Res.**, v.35, p.56-62, 2010.

SILVA, S. A.; RIBEIRO, S. G.; BENDER, A. E. N.; TIMM, F. C.; GARCAS, G. L.; MARTINO-ROTH, M. G. Estudo da atividade mutagênica das plantas, *Euphorbiamilii* Des Moulins e *Ricinuscommunis* L através do teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 19, p. 418-422, 2009.

SOLDERA, C. C.; ZANELLA, G. N.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da atividade antibacteriana de *Crotonurucurana*. **Revista Contexto & Saúde**. V.10, n. 19, p. 25-31. 2010.

SMITH-HALL, C.; LARSEN, H. O.; POULIOT, M. People, plants and health: a conceptual framework for plant consumption. **J EthnobiolEthnomed**.V.8, p.43, 2012.

TEIXEIRA, R.O; CAMPAROTO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Assessment of two medicinal plants, *Psidiumguajava* L. and *Achilleamillefolium* L., in vitro and invivo assays. **Genet. Mol. Bio**.v.5. p.551-555, 2003.

TEDESCO, M.; KUHN, A.W.; BOLIGON, A.A.; LAUGHINGHOUSE IV, H.D.; ATHAYDE, M.L.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Chromatographic analysis, antiproliferative effect andgenotoxicity of aqueous extracts of *Citrus sinensis*(L.) osbeckon the *Allium cepa* L. test system. **Biosc. J.**,Uberlândia, vol. 31, n. 4, p.1213-1221, 2015.

TKALEC, M.; MALARIC, K.; PAVLICA, M.; PEVALEK-KOZLINA, B.; VIDAKOVIC-CIFREK, Z. Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination, root meristematic cells of *Allium cepa* L. **Mutation Research**. V. 672, n. 2, p. 76–81, 2009.

TOSCANO RICO, J. M. Plantas Medicinais. **Academia das Ciências de Lisboa, Instituto de Estudos Acadêmicos para Seniores**. 2011.