



**I CONGRESSO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO DA UEG**
14 a 16 de outubro de 2014
Local: Câmpus – Pirenópolis



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO LÁTEX DE PINHÃO MANSO

Angelina Luzia Ciappina¹, Fabrício Alves Ferreira², Fábio Matos Santos³, Alcione da Silva Arruda⁴, Luciane Madureira de Almeida⁵

¹ Graduanda em Agronomia, PIBIC-UEG, Universidade Estadual de Goiás, Ipameri (GO),
angelinaciappina@gmail.com

² Mestrando Universidade Estadual de Goiás, Ipameri (GO)

³ Docente, Universidade Estadual de Goiás, Ipameri (GO)

⁴ Docente, Universidade Estadual de Goiás, Ipameri (GO)

⁵ Docente, Universidade Estadual de Goiás, Ipameri (GO)

1. INTRODUÇÃO

A *Jatropha curcas* é uma espécie nativa do Brasil (ARRUDA et. al., 2004) pertencente à família Euphorbiaceae e conhecida popularmente como pinhão manso. Seu cultivo no Brasil tem aumentado nos últimos anos por causa da utilização de sua semente na produção de biodiesel (SLUSZZ e MACHADO, 2006). Além da produção de combustível, existem relatos da utilização de diferentes partes dessa planta na medicina popular (SANTOS et al., 2008). Contudo, poucos estudos científicos estão sendo realizados para verificar a eficácia medicinal dos diferentes extratos de pinhão manso. Pode-se citar, por exemplo, o uso das folhas e sementes como antibacteriana (IGBINOSA et al., 2009; OSKOUUEIAN et al., 2011); o uso do látex como anti-coagulante (OSONLYI E ANAJOBI, 2003); o uso das raízes como anti-inflamatório (NAYAK E PATEL, 2010); e o uso de diferentes extratos da planta com atividade anti-angiogênica (RIBEIRO et al., 2012).

Essa última biofuncionalidade, a angiogênese, é importante para a formulação de novos medicamentos. A angiogênese compreende uma série de eventos celulares que levam a

Pirenópolis – Goiás – Brasil

14 a 16 de outubro de 2014

neovascularização a partir da formação de novos vasos sanguíneos (FOLKMAN, 1995). Esse processo está associado à inflamação, cicatrização de feridas, crescimento tumoral e metástases (NANGIA MAKKER et al., 2000).

Biomateriais de interesse medicinal não devem apresentar apenas uma biofuncionalidade, mas também sua presença não pode gerar efeito tóxico para a célula ou DNA. Agentes que causam morte celular são chamados de citotóxicos, já os que mudam a sequência do DNA recebem o nome de genotóxico (COMBES, 1992). A genotoxicidade ocorre quando a capacidade de replicação e de levar informação do DNA é alterada, esses danos ao DNA podem resultar em efeitos mutagênicos e carcinogênicos. Os principais tipos de genotoxicidade se dão por danos no DNA, mutações pontuais e aberrações cromossômicas (COMBES, 1992).

Uma forma simples e barata de avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de um composto é utilizando o teste da raiz da cebola (*Allium cepa*). O teste consiste basicamente em colocar o *Allium cepa* em um recipiente com água deixando as raízes do bulbo se desenvolver em mais ou menos 3 dias. Após esse período os tratamentos são colocados e deixados por 72h, às pontas das raízes são cortadas, posteriormente são preparadas as lâminas e as mesmas avaliadas por meio de microscópio ótico, no qual serão analisadas as alterações cromossômicas (TEIXEIRA et al., 2003).

Ótimos resultados estão sendo obtidos com o teste *Allium cepa*, onde este tem demonstrado ser bom bioindicador para o primeiro prognóstico da citotoxicidade e genotoxicidade em infusões de plantas medicinais, caracterizando-se por baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade, ajudando nos estudos preventivos de danos à saúde humana (BAGATINI et al., 2007; FISKESJO, 1985). Este teste tem por base a avaliação de potenciais efeitos citotóxicos e genotóxicos, sendo medido pelo crescimento das raízes, anormalidades mitóticas e aberrações cromossômicas em células meristemáticas da ponta da raiz (TKALEC et al., 2009).

Estudos de toxicidade e mutagenicidade são necessários por contribuírem com a utilização segura e eficaz de novas drogas ou de novos tratamentos. O látex de algumas plantas tem sido comumente empregado no tratamento de inúmeras enfermidades, despertando um grande interesse para a ciência, (CHOI et al., 2002; WANG et al., 2004; MELO- REIS et al., 2010; FLORIANO et al., 2013), por essa razão, foi analisado nesse trabalho o potencial citotóxico e genotóxico do pinhão manso, planta lactífera já utilizada na medicina popular.

2. OBJETIVO

Este trabalho teve o objetivo de avaliar o potencial genotóxico e citotóxico do látex de *Jatropha curcas* (pinhão manso) através de ensaios com *Allium cepa* (cebola comum).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A. Obtenção do Material Biológico:

O látex foi coletado na própria Unidade Universitária de Ipameri, onde existe o cultivo de *Jatropha curcas*, a extração foi realizada a partir do caule da planta, com tubos esterilizados.

B. Obtenção de *Allium cepa*:

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

C. Grupos experimentais:

Os grupos experimentais apresentaram quatro diferentes concentrações de látex de pinhão manso: 1. Solução de látex a 5%; 2. Solução de látex a 1%; 3. Solução de látex a 0,5% e 4. Solução de látex a 0,1%. Além do controle negativo e positivo, utilizando água destilada e ázida sódica 0,2 g/L, respectivamente.

D. Procedimentos:

A princípio foram distribuídos 10 bulbos para cada concentração a ser testada, retirando, com auxílio de bisturi, as raízes e camadas externas secas ou com mofo, sem que a área radicular fosse danificada. Em seguida, o parênquima central da coroa de brotamento foi retirado (fazendo-se uma pequena incisão circular) 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, os que já haviam sido descascados foram colocados em água fresca durante o continuado procedimento de limpeza, a fim de que se reduzissem os efeitos de possíveis inibidores do brotamento.

Os bulbos destes grupos foram colocados em recipientes de vidro, previamente esterilizados, com capacidade de 80 mL, deixando a área radicular diretamente em contato com os líquidos testes.

As raízes foram cultivadas por 72h e em seguida medidas com o auxílio de régua, desprezando aquelas que cresceram acima de 2,0 cm. As pontas de raízes foram então encaminhadas para análise citogenética, fixando-as em solução de Carnoy (etanol 99%: ácido acético glacial - 3:1) por 24 h. A seguir foram colocadas em álcool 70% e refrigeradas até o momento da preparação das lâminas. O teste teve condução em temperatura controlada, sobre bancada sem vibrações e sem iluminação direta.

E. 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 esfregaço 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%.

F. 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). O IM foi calculado para cada tratamento utilizando o número de células em divisão/1000 células (SETH et al., 2008). 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.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os níveis de citotoxicidade de um agente podem ser determinados pelo aumento ou diminuição do índice mitótico (IM). O IM mede a proporção das células na fase de mitose do ciclo celular e a sua inibição pode ser interpretada como a morte celular ou um atraso na cinética de proliferação de células (PANDA et al., 2005). Panda et al. (2005) descrevem que para uma substância ser considerada citotóxica ela deve causar um decréscimo no IM superior a 50%, sendo esse o chamado limite citotóxico. Os resultados obtidos para as diferentes concentrações de látex de pinhão manso estão apresentados na Tabela 1. Pode-se observar uma diminuição do índice mitótico nas células submetidas ao látex de pinhão manso em todas as concentrações comparadas ao controle negativo (água destilada). Essa diminuição é superior a 50%, sendo sugerido que nessas concentrações o látex de *Jatropha curcas* é citotóxico para células da raiz de *Allium cepa*. A análise estatística realizada a partir da comparação das médias pelo teste Tukey confirma esses resultados, mostrando que existe diferença significativa entre os grupos tratados com látex 1%, 0.5% e 0.1% e água destilada (A) e água destilada (B).

Tabela 1: Análise das lâminas do teste de *Allium cepa*, quanto à citotoxicidade e genotoxicidade.

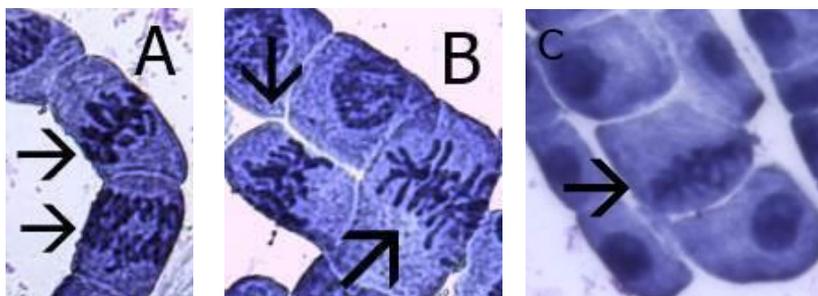
Tratamentos	Total de células	Total de células em Interfase	Total de células em divisão	Citotoxicidade	Genotoxicidade	
				Índice Mitótico (%)	Número de Anomalias	Número de Micronúcleos
Látex 1%	6.749	6.679	70	1,03 A	3 A	0 A
Látex 0,5%	5.237	5.153	84	1,60 A	23 A	0 A
Látex 0,1%	5.641	5.237	404	7,16 A	253 B	2 A
Água	5.060	4.998	1.325	26,1 B	0 A	1 A
Ázida sódica	6079	5.565	514	8,46 A	254 C	98 B

* Letras iguais representam tratamentos onde não houve diferença significativa.

A genotoxicidade é caracterizada pela presença de aberrações na divisão celular e micronúcleos. Os resultados obtidos nesse trabalho estão mostrados na Tabela 1 e Figura 1. As análises mostraram a presença de poucas anomalias e micronúcleos nas células submetidas ao tratamento com látex a 1% e 0.5%, os mesmos tratamentos que apresentaram maior taxa de

mortalidade (menores IM). Por outro lado, na concentração de 0,1% obteve-se o maior índice de aberrações cromossômicas e micronúcleos. Uma possível explicação para esses resultados é que em altas concentrações o látex causa o atraso na proliferação e/ou morte celular e dessa forma não existem células em divisão, não sendo possível observar anomalias cromossômicas. Já em menores concentrações, o efeito citotóxico não é tão acentuado e as células entram em divisão. Contudo, essa divisão é alterada, com a presença de muitas anomalias cromossômicas, classificando essa substância como genotóxica. Entre os diferentes tipos de anomalias observadas, as mais comuns foram atrasos no fuso mitótico (Figura 1). Em relação à incidência de micronúcleos, não foram observados micronúcleos nas diferentes concentrações do látex de pinhão manso testadas. Contudo, no controle positivo (Figura 1) pode-se observar alta frequência de micronúcleos. As análises estatísticas da genotoxicidade confirmam esses resultados e mostram que não existem diferenças significativas entre os tratamentos a 1% e 0.5% em relação ao controle negativo. Por outro lado, obteve-se uma diferença altamente significativa quando comparado os tratamentos a base de látex 0.1% e o controle negativo. Esses resultados evidenciam estatisticamente que o látex de pinhão manso é altamente genotóxico na concentração de 0.1% sendo o número de anomalias superior ao controle positivo.

De forma geral pode-se concluir que o látex de pinhão manso é tóxico as células da raiz da cebola, sendo citotóxico em variadas concentrações e genotóxico quando há pouca quantidade de látex na solução. Esses resultados indicam que o látex de pinhão manso não deveria ser utilizado na medicina caseira de forma indiscriminada.



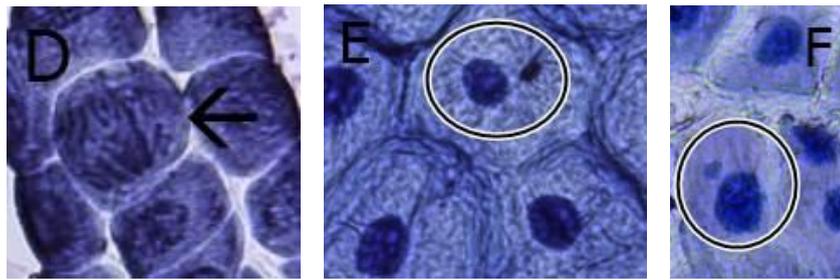


Figura 1: Fotografias de células das raízes de cebola em diferentes concentrações de látex de pinhão manso com aumento de 40x. **A:** células na concentração de 0,1% com anomalia de cromossomos retardatários; **B:** células na concentração de 0,1% com anomalia de cromossomos perdidos; **C:** células na concentração de 0,5% com anomalia de atrasos metafásicos; **D:** células na concentração de 0,5% com anomalia de pontes anafásicas; **E e F:** células na concentração de 1% evidenciando micronúcleos.

5. Considerações Finais

Os resultados apresentados sugerem que o látex de pinhão-manso apresenta atividade genotóxica e citotóxica para as células da raiz da cebola.

6. Agradecimentos

Agradeço a Unidade Estadual de Goiás e Pró-Reitoria de Pesquisa devido à confiança e estímulo dados a mim, a minha orientadora pela oportunidade e a unidade onde foi desenvolvido o trabalho.

7. Referências

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista brasileira de oleaginosas e fibras**, Campina Grande/PB, V. 8, n.1, p. 789-799, 2004.

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.

CHOI, S.; KIM, K. W.; CHOI, J. S.; HAN, S. T.; PARK, Y. I.; LEE, S. K.; KIM, J. S.; CHUNG, M. H. Angiogenic activity of beta-sitosterol in the ischaemia/reperfusion-damaged brain of Mongolian gerbil. **Planta Medica**. V. 68, n. 4, p. 330-335, 2002.

COMBES, R.D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry & Industry**. V. 24, p. 950-954, 1992.

DIANA, F.; FERNANDÉZ, V.; TORRES, E. Evaluación de la actividad genotóxica de efluentes de curtiembres del Dpto. Central de la región oriental. **Revista de Ciencia y Tecnología**. V. 2, p. 37-48, 2000.

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

FLORIANO, J. F.; MOTA, L. S.; FURTADO, E. L.; ROSSETTO, V. J.; GRAEFF, C. F. Biocompatibility studies of natural rubber latex from different tree clones and collection methods. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**. Doi: 10.1007/s10856-013-5089-9, 2014.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. **Nature Med**. V. 1, p.27-31, 1995.

IGBINOSA, O. O.; IGBINOSA, E. O.; AIYEGORO, O. A. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* L. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. V. 03, n°2, p. 58-62, 2009

IVANOVA, E.; STAIKOVA, T. A.; VELCHEVA, I. Cytogenetic testing of heavy metal and cyanide contaminated river waters in a mining region of Southwest Bulgaria. **Journal of Cell and Molecular Biology**. V. 4, p. 99-106, 2005.

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

MELO-REIS, P. R.; ANDRADE, L. S.; SILVA, C. B.; ARAÚJO, L. M. M.; PEREIRA, M. S.; MRUE, F.; CHEN-CHEN, L. Angiogenic activity of *Symadenium umbellatum* Pax latex. **Braz. J. Bio.** V. 70, p. 189-194, 2010.

NANGIA-MAKKER, P.; HONJO, Y.; SARVIS, R.; AKAHANI, S.; HOGAN, V.; PIENTA, K. J.; RAZ, A. Galectin-3 induces endotelial cell morphogenesis and angiogenesis. **Am J Pathol.** V. 156(3), p.899-909, 2000.

NAYAK, B. S. & PATEL, K. N. Anti-inflammatory screening of *Jatropha curcas* root, stem and leaf in albino rats. **ROM. J. BIOL. – PLANT BIOL.** V.55, n.1, p. 9–13, 2010.

OSKOUUEIAN, E.; ABDULLAH, N.; AHMAD, S.; SAAD, W. Z.; OMAR, A. R.; HO, Y. W. Bioactive Compounds and Biological Activities of *Jatropha curcas* L. Kernel Meal Extract **International Journal of Molecular Sciences.** V.12, p.5955-5970, 2011.

OSONLYI, O. & ANAJOBI, F. Coagulant e antcoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. **Journal of Ethnopharmacology.** V. 89, p. 101-105, 2003.

RIBEIRO, S. S.; JESUS A. M.; SILVA T. B.; SANTOS A. D. C.; JESUS J. R.; ANDRADE M. S.; SAMPAIO, T. B.; GOMES, W. F.; ALVES P. B.; CARVALHO A. A.; PESSOA C.; MORAES, M. O.; PINHEIRO, M. L. B.; PRATA, A. P.; BLANK, A.; SILVA-MANN, R.; MORAES, V. R. S.; COSTA, E. V.; NOQUEIRA, P. C. L.; BEZERRA, D. P. Evaluation of the cytotoxic activity of some Brazilian medicinal plants. **Planta Med.** V. 78, p. 1601-1606, 2012.

SANTOS, W. L. C.; FRANÇA, F. A.; LOPEZ, L. B.; SOÇVA, G. M. S.; AVELAR, K. E. S.; MORAES. S. R. Atividades farmacológicas e toxicológicas da *Jatropha curcas* (pinhão-manso). **Revista brasileira de farmácia.** V. 89, n. 4, p. 333-336.

SETH, C. S.; MISRA, V.; CHAUHAN, L. K. S.; SINGH, R. R. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. **Ecotoxicology Environmental Safety.** V. 71, p. 711–716, 2008.

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

SLUSZZ, T.; MACHADO, J. A. D. Características das ponteciais culturas matérias primas do biodiesel e sua adoção pela agricultura familiar. **Agreded**. p. 1-10. 2006.

TEIXEIRA, R.O; et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidiumguajava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *invivo* assays. **Genet. Mol. Bio.** v.5. p.551-555, 2003.

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.

WANG, S.; ZHENG, Z.; WENG, Y.; YU, Y.; ZHANG, D.; FAN, W.; DAI, R.; HU, Z. Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts. **Life Science.**, V. 74, n. 20, p. 2467-2478, 2004.