

Revista Agrária Acadêmica

Agrarian Academic Journal

Volume 2 – Número 3 – Mai/Jun (2019)

doi: 10.32406/v2n32019/133-138/agrariacad

Teste *Allium cepa* como indicador da atividade genotóxica do avelós *Euphorbia tirucalli*. Test *Allium cepa* as indicator of genotoxic activity of the aveloz *Euphorbia tirucalli*.

Maria Clara Moreira Maia¹, Caroline Martins Rocha², Tatielle Erins Santos³, Janini Tatiane Lima Souza Maia⁴, Priscila Regina Queiroz⁵, João Paulo Gomes Oliveira⁶

¹ - Graduada em Medicina Veterinária, Faculdades Integradas do Norte de Minas FUNORTE – Avenida Osmani Barbosa, 11.111, JK, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil, CEP:39.404-006, telefone (38) 2101-9292.

claramoreiram@gmail.com

² - Graduada em Biomedicina pelas Faculdades Integradas do Norte de Minas- FUNORTE – MG – BRASIL

³ - Graduada em Biomedicina pelas Faculdades Integradas do Norte de Minas - FUNORTE– MG – BRASIL

⁴ - Professora Titular das Faculdades Integradas do Norte de Minas - FUNORTE– MG – BRASIL

⁵ - Graduada em Biomedicina pelas Faculdades Integradas do Norte de Minas - FUNORTE – MG – BRASIL

⁶ - Graduando em Medicina Veterinária, Faculdades Integradas do Norte de Minas - FUNORTE – MG – BRASIL

Resumo

O objetivo foi identificar a atividade genotóxica do avelós, testando-se através do método *Allium cepa*, metodologias adaptadas aplicadas em literatura científica. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos: cinco concentrações distintas do látex: 0; 0,15; 0,50; 0,75 e 1 mL L⁻¹, com cinco repetições. Após a germinação dos bulbos da cebola, lâminas foram preparadas com os meristemas e examinadas em microscópio óptico. Os tratamentos aplicados contribuíram com a apresentação de dois tipos de aberrações celulares: células binucleadas e pontes em anáfase e telófase. São necessários mais estudos que avaliem melhor os riscos potenciais dos agentes mutagênicos presentes no látex de aveloz, bem como adequar a metodologia utilizada.

Palavras-chave: *Allium cepa*, *Euphorbia tirucalli*, látex, plantas medicinais.

Abstract

The objective was to identify the genotoxic activity of the aveloz, using the *Allium cepa* method, adapted methodologies applied in scientific literature. The experimental design was a completely randomized design with five treatments: five distinct concentrations of latex: 0; 0.15; 0.50; 0.75 and 1 mL L⁻¹, with five replicates. After germination of the onion bulbs, slides were prepared with meristems and examined under an optical microscope. The applied treatments contributed to the presentation of two types of cellular aberrations: binucleate cells and bridges in anaphase and telophase. Further studies are needed to better assess the potential risks of the mutagenic agents present in hazelnut latex, as well as to adjust the methodology used.

Keywords: *Allium cepa*, *euphorbia tirucalli*, latex, medicinal plants.

Introdução

Os fundamentos que respaldam os estudos acerca de plantas medicinais subsistem ao longo de muitos anos, previamente à compreensão das possibilidades terapêuticas exequíveis a partir de seu emprego para fins fitoterápicos. Nos dias atuais, existe uma tendência quanto à aplicação medicamentosa dos vegetais curativos, despertando ainda mais o interesse pela cultura medicinal. É válido ressaltar que a terapêutica de uma planta não é proveniente de um simples composto, mas de uma diversidade de fitoquímicos designados “fitocomplexo” (TOFANELLI; SILVA, 2011).

Embora os avanços da medicina moderna, a Organização Mundial da Saúde reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária. Dessa forma, desenvolve uma Estratégia de Medicina Tradicional e Complementar de forma a traçar o curso para o desenvolvimento, desde 2002. Em seu novo documento, afirma que o número de países membros com políticas relativas à medicina tradicional se encontra em número de 69, enquanto que aqueles que possuem regulamentações em relação às plantas medicinais correspondem a 119 países (WHO, 2013).

A maior parte da flora medicinal é ainda desconhecida químico/farmacologicamente, e o saber tradicional a ela associado existe predominantemente em países em desenvolvimento. O Brasil é o detentor da maior biodiversidade mundial, possuindo 43.020 espécimes vegetais conhecidos, distribuídos em seus diferentes biomas resultantes das distintas zonas climáticas e biogeográficas do país (MMA, 2019). Dentre essas espécies encontradas em regiões tropicais destaca-se o avelós (*Euphorbia tirucalli* L.), pertencente à família *Euphorbiaceae* é de origem africana, conhecida popularmente também como, coroa-de-cristo, árvore de São Sebastião dentre outros nomes. Esta espécie pode atingir até 10 metros de altura, apresentando ramos e troncos lenhosos, produtora de uma seiva leitosa, cáustica, denominada látex (ITF, 2008).

O látex é uma solução coloidal polidispersa, onde as partículas de borracha (poli-isopreno) encontram-se dispersas em um meio aquoso, sendo que nesse meio aquoso, a água representa 50 a 70% do peso/volume (RIBEIRO, 2014). Estudos apontam a presença de constituintes terapêuticos no látex, como enzimas proteolíticas capazes de exercer funções larvicida, moluscida, bactericida, anti-helmíntica, antitumoral, antimutagênica, anticancerígena, (WACZUK, 2014).

Segundo Alves, Nepomuceno (2012), a ampla utilização do avelós na medicina popular pode ser justificada, uma vez que diminuiu a concentração de células tumorais na *Drosophila melanogaster*, ação que é desenvolvida por algumas substâncias presentes nesta *Euphorbiaceae*, como os ésteres de forbol que são capazes de aumentar a imunidade celular, porém estes são dose-dependentes. O efeito do extrato bruto de avelós foi analisado frente a inibição do tumor ascítico de Ehrlich, em camundongos, em que os autores observaram uma tendência de diminuição do volume do líquido ascítico e do número de células tumorais nos indivíduos tratados, inferindo na sobrevida dos animais (SANTOS *et al.*, 2016).

Por outro lado, é sabido também que o látex extraído de plantas do gênero de *Euphorbia* é considerado tóxico, que em contato com a pele causa edema, eritema e formação de bolhas e vesículas muito pruriginosas ou dolorosas no local (MATIAS *et al.*, 2013). Os efeitos negativos do consumo do avelós, mais especificamente do látex estão ligados à presença dos ésteres diterpênicos de forbol, que possuem estrutura altamente insaturada, capazes de desenvolver atividade tumoral (VARRICCHIO *et al.*, 2008). Essa atividade carcinogênica foi comprovada em células procariotas, associada em dosagem específica (2 gotas em 250mL de água e 2 gotas em 25mL de água), do extrato aquoso resultante da planta (LIMA *et al.*, 2009). Particularidades genotóxicas de um composto químico causam

modificações na molécula de DNA, que ocorre quando a capacidade de replicação e de transporte da codificação gênica é atingida total ou parcialmente (RIBEIRO, 2014).

Testes de genotoxicidade são efetuados com o propósito de analisar os agentes potencialmente nocivos, identificando compostos com possível capacidade mutagênica, carcinogênica ou teratogênica (PEREIRA, 1992). Segundo Ribeiro (2014), tais métodos determinam características específicas; causadas por genotoxicidades resultante de danos no DNA, como aberrações cromossômicas, mutações pontuais, micronúcleos (pequenos corpos contendo ácido desoxirribonucléico, encontrados no citoplasma).

São realizados testes para detecção do potencial genotóxico, como por exemplo, o *Allium cepa* (cebola) que é um teste *in vivo*, no qual as raízes da cebola ficam em contato direto com a substância testada, permitindo assim o efeito anti-secretório. A partir daí pode se avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos da substância testada sobre a célula (RIBEIRO, 2014). Os ensaios mutagênicos e genotóxicos são de alta viabilidade, pois permitem a identificação de mutações fenotípicas causadas por mudanças súbitas no genótipo de um organismo, alterando suas características. Pode-se obter dados sobre mutação gênica em eucariotos com testes em leveduras, *Drosophila* ou mesmo mutações somáticas em mamíferos. Estes testes possuem validação internacional e podem ser desenvolvidas tanto *in vivo* quanto *in vitro*, desde que se conheça a biologia do organismo em teste (GASPARRI, 2005).

Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo identificar a atividade genotóxica do avelós, testando-se através do método *Allium cepa*, metodologias adaptadas aplicadas em literatura científica.

Material e métodos

As coletas do látex foram realizadas na cidade de Ninheira, Minas Gerais, com a confirmação da espécie com o auxílio do Herbário Virtual (INCT, 2019). O látex foi coletado por meio de perfuração na planta, com o auxílio de uma faca com corte de aproximadamente 10 cm de comprimento e 05 cm de profundidade, o mesmo foi armazenado em frascos estéreis devidamente identificados.

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório Multidisciplinar das Faculdades Integradas do Norte de Minas – FUNORTE, sendo primeiramente realizada a centrifugação do látex para a retirada das impurezas. Após isso o látex foi armazenado em tubos de ensaio na temperatura de 5°. Assim deu-se o início ao procedimento para obtenção dos bulbos de cebola, através do método de *Allium cepa*.

Foram selecionadas 25 cebolas não germinadas e saudáveis, colocadas em um recipiente contendo água, com o propósito de que as raízes do bulbose desenvolvessem, por mais ou menos três dias. A posologia de acordo com a medicina tradicional corresponde a seis gotas de látex diluídas em 02 litros de água VARRICCHIO *et al.*, 2008) correspondendo a 0,15 mL⁻¹. As diluições foram realizadas com água potável, utilizando-se 200 mL para todas as concentrações, que foram de 0; 0,15; 0,50; 0,75 e 1 mL por litro. Para cada concentração foram feitas cinco repetições, resultando assim em um delineamento experimental e inteiramente casualizado. Procedeu-se retirando os bulbos das cebolas, e colocando-os nos extratos por 72h.

Após esse período os bulbos foram retirados para fixação, e submergidos em solução de álcool absoluto e ácido acético (3:1) por aproximadamente oito horas e armazenadas em álcool 70% a 5°C, para posterior preparação e observação de lâminas. Para preparação dessas, as raízes foram retiradas do álcool lavadas em água destilada, submetidas a hidrólise ácida com HCl 1N durante oito

minutos a 60°C, lavadas novamente em água destilada, coradas durante 10 minutos emorceína acética a 1% aquecida e então, preparadas em lâminas de citologia através de esmagamento manual. Tais métodos utilizados foram adaptados de estudos dispostos na literatura científica pertinente (VARRICCHIO *et al.*, 2008; TOFANELLI; SILVA, 2011; ALVES; NEPOMUCENO, 2012; FRITSCH, 2012).

Para cada concentração foram preparadas pelo menos três lâminas, contendo cerca de três radículas em cada uma, e levadas para examinar em microscópio óptico na objetiva de 40x.

Resultados e Discussão

A partir dos testes realizados, as concentrações do látex de avelós testadas, apresentaram dois tipos de aberrações celulares: células binucleadas e pontes em anáfase e telófase (Figura 1). Pelo menos alguma alteração foi observada em todas as concentrações testadas.

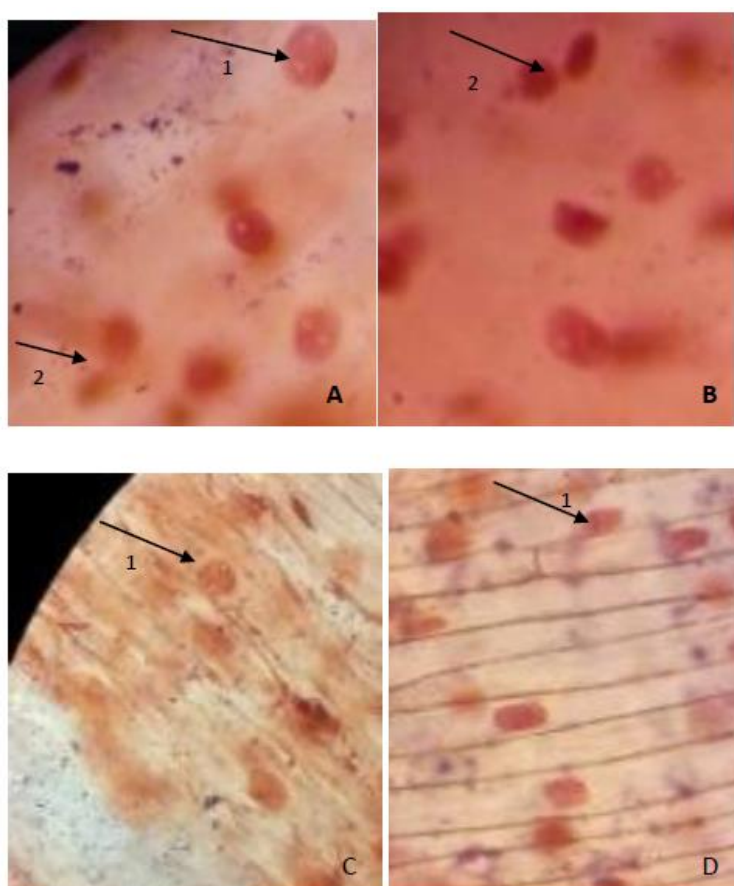


Figura 1. Células de cebola submetidas às diferentes concentrações de látex de avelós, visualizadas na objetiva de 40x. A: Concentração de 0,15 mL L⁻¹; B: Concentração de 0,5 mL L⁻¹; C: Concentração de 0,75 mL L⁻¹; D: Concentração de 1 mL L⁻¹. Seta 1: Células binucleadas; Seta 2. Pontes em anáfase e telófase.

Substâncias genotóxicas, são causadoras de danos ao DNA da célula, possuem em comum propriedades químicas e físicas que admitem suas interações com os ácidos nucleicos. Por sua alta reatividade, podem causar alterações hereditárias por meio de mutações em células germinativas, e quando a mutação ocorre em células somáticas, o resultado mais comum é a formação de neoplasias, benignas ou malignas (FRITSCH, 2012). Essas mutações podem ser identificadas de várias formas, como é o caso das pontes cromossômicas. Tais alterações surgem devido a falhas na segregação dos cromossomos durante a anáfase, resultando em perda de material genético (GÖMÜRGEN, 2005).

Outro tipo de mutação é a formação de micronúcleos (MN), que são pequenos corpos contendo fragmentos de DNA, resultado de quebras cromossômicas e aparecendo no citoplasma celular por divisão mitótica, tendo em média um terço do tamanho do núcleo, a presença do MN é decorrente de um fenômeno natural, porém tem sua frequência aumentada quando em contato com agentes genotóxicos. A análise de MN serve como teste de mutagenicidade e genotoxicidade, é também um dos poucos métodos diretos para detectar danos em sistemas expostos a agentes mutagênicos ou carcinogênicos (FRITSCH, 2012). Tais alterações não foram observadas no presente estudo.

Segundo Oliveira e Nepomuceno (2004), nos testes para avaliação dos efeitos genotóxicos e antígenotóxicos da *Euphorbia tirucalli* em *Drosophila melanogaster*, foram observados aumentos porém não significativos, nas frequências de manchas mutantes. Afirmam ainda que os resultados negativos possam ser devido às diluições feitas no experimento, onde também foi utilizada a posologia popular. De acordo com Fernando *et al.* (2017), em ensaios toxicológicos *in vitro* com *E. tirucalli*, observaram que o extrato etanólico e frações demonstraram elevada toxicidade.

De acordo com um estudo *in vitro*, pode-se observar que o extrato aquoso de *E. tirucalli* apenas nas duas maiores concentrações testadas induziu um aumento significativo no dano do DNA de leucócitos. Além disso, a exposição dessas células ao extrato aquoso demonstrou atividade citotóxica significativa, caracterizada pela diminuição da viabilidade celular a partir da concentração de $10\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato (WACZUK, 2014).

Neste estudo para a avaliação da atividade genotóxica das diluições do látex de *Euphorbia tirucalli* foi possível verificar-se a presença de atividade mutagênica, indicando que sua utilização requer maior cuidado. No entanto, são necessários mais estudos para avaliar com maior precisão os riscos potenciais dos agentes mutagênicos presentes no látex de avelós, bem como adequar a metodologia utilizada.

Conclusão

Apesar da eficácia do teste *Allium cepa*, para detectar danos mutagênicos analisados pela presença de micronúcleos utilizando *E. tirucalli*, sugere-se novos estudos em diferentes e elevadas concentrações do látex, estabelecendo novos protocolos para uma melhor avaliação de sua ação genotóxica.

Referências

- ALVES, E. M.; NEPOMUCENO J. C. Avaliação do efeito anticarcinogênico do látex do avelós (*Euphorbia tirucalli*), por meio do teste para detecção de clones de tumor (Wharts) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, v.9, n.2, p.125-140, 2012.
- BETIM, F.C.; SOUZA, S.W.; BERGAMO, R.A.M.; DIAS, J.F.G. Estudo fitoquímico de *Euphorbia tirucalli* L. (avelós), atividade antimicrobiana e ensaios toxicológicos preliminares *in vitro*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.22, n.3, p.1-15, 2017.
- FRITSCH, E. **Análise antimutagênica do látex da *Euphorbia tirucalli* em teste de *Allium cepa***. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) - Faculdades de Educação e Meio Ambiente Ariquemes, 2012.
- GASPARRI, S. **Estudo das atividades antioxidantes e mutagênicas/antimutagênicas induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus***. Teses de Mestrado. Universidade Luterana do Brasil. Canoas, p.4, 2005.

GÖMÜRGEN, A.N. Cytological effect of the potassium metabisulphite and potassium nitrate food preservative on root tips of *Allium cepa* L. **Cytologia**, v.70, p.119-128, 2005.

INCT Herbário Virtual da Flora e dos Fungos. Disponível em: <<http://inct.florabrasil.net/herbario-virtual/>>. Acesso em abril de 2019.

ITF. **Índice Terapêutico Fitoterápico**. Petrópolis: Editora de Publicações Biomédicas LTDA, 2008. 328p.

LIMA, L. G. S.; PAIVA, J. P.; SIQUEIRA, C. M.; CARDOSO, J. S.; HOLANDINO, C.; LEITAO, A. C. Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de soluções diluídas e dinamizadas de *Euphorbia tirucalli* Lineu (AVELOZ). **Braslian Homeopathic Journal**, v.11, n.1, p. 1-2, 2009.

MATIAS, J. A. G.; FIGUEIREDO, C. A. **Abordagem teórica - prática das plantas tóxicas na disciplina de Fitoterápia**. Trabalho de Conclusão de Curso, 2013.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/convencao-da-diversidadebiologica%3E>>. Acesso em abril de 2019.

OLIVEIRA, A. P.; NEPOMUCENO, J. C. **Avaliação dos efeitos genotóxicos e antígenotóxicos do avelós (*Euphorbia tirucalli*) em *Drosophila melanogaster***. Universidade Federal de Uberlândia, v.20, n.2, p. 179-186, 2004.

PEREIRA, C. A. B. **Plantas Tóxicas e Introdução na Veterinária**. Goiânia - UFG. p.4-7, 1992.

RIBEIRO, T. P. **Avaliação da biocompatibilidade e potencial angiogênico do látex da *Hancornia speciosa***. Tese de Mestrado, Ipameri-GO, 2014.

SANTOS, O.J.; SAUAIA FILHO, E.N.; NASCIMENTO, F.R.F.; SILVA JÚNIOR, F.C.; FIALHO, E.M.S.; SANTOS, R.H.P.; SANTOS, R.A.P.; SERRA, I.C.P.B. Avaliação do uso do extrato bruto de *Euphorbia tirucalli* na inibição do tumor ascítico de Ehrlich. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.43, n.1, p.18-21, 2016.

TOFANELLI, E. J.; SILVA, F. A. Propriedades Fitoterápicas de *Euphorbia tirucalli* L. **Biofar: Revista de Biologia e Farmácia**, v.6, n.1, p.151-166, 2011.

VARRICCHIO, M. C. B.; SALES, F.; SILVA, S.; KUSTER, R.M.; PYRRHO, A. S.; CASTELO BRANCO, M. L. T.; Efeitos toxicológicos crônicos do látex bruto de *E. tirucalli* (AVELOZ) sobrepeso de fígado e baço conforme uso tradicional: Um Estudo Preliminar. **Biofar: Revista de Biologia e Farmácia**, v.2, n.2, p.6-11, 2008.

WACZUK, E. P. **Avaliação toxicológica do extrato aquoso dos ramos *E. tirucalli* L. in vitro**. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Uruguaiana, RS, Brasil, p.78, 2014.

WHO. **The WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023 thus reappraises and builds on the WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005, and sets out the course for TM and CM (T&CM) in the next decade**. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201en/s21201en.pdf>>. Acesso em abril de 2019.

Recebido em 11 de abril de 2019

Aceito em 04 de maio de 2019