

ATIVIDADE GENOTÓXICA DE *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae) EM TESTE DE *Allium cepa* (Amaryllidaceae).

Marcia Simone Araújo da Silva Souza ¹; Anna Clara Paulino de Queiroz ²; Marcos Antonio Nobrega de Sousa ³

Universidade Federal de Campina Grande UFCG. E-mail: simoneandrin@gmail.com

Universidade Federal de Campina Grande UFCG. E-mail: annclaraqueiroz@gmail.com

Universidade Federal de Campina Grande UFCG. E-mail: marcosandesousa@gmail.com

Resumo: A *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore pertence à família Bignoniaceae, conhecida como Craibeira, Craiba, Ipê do cerrado. Sua entrecasca é útil para o tratamento de gripes e resfriados e pode ser utilizada na forma de xaropes ou infusões. O objetivo desse estudo foi testar os possíveis efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico de *T. aurea*, em células de *Allium cepa*. Foram utilizados extratos aquosos de cascas do caule de *T. aurea*, nas concentrações 4 g/1000 mL (0,4%), 4 g/500 mL (0,8%) e 4 g/100 mL (4%) para as concentrações de tratamentos teste, água destilada para o controle negativo, paracetamol a (500 µL/mL) para o controle positivo, e para o controle antígenotóxico foi utilizado uma mistura em partes iguais da concentração de paracetamol do controle positivo mais o extrato aquoso de *T. aurea* na maior concentração (4%). Foi observado ausência de germinação das sementes em todas as réplicas nos testes realizados para o controle positivo e o antígenotóxico. A análise de germinação de sementes mostrou indicativo de toxicidade nas concentrações testadas, mas apenas a concentração de 4% apresentou-se com uma diferença estatística significativa. As anomalias observadas nas radículas da *T. aurea* sugere um indicativo de processos genotóxicos. A análise das fases do índice mitótico para cada concentração-teste, apresentou diferença significativa quanto ao número de prófases em relação ao controle negativo, nas concentrações de 0,8% e 4%. Conclui-se que o extrato aquoso de *Tabebuia aurea* apresentou indícios de toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade.

Palavras-chave: Bignoniaceae, planta medicinal, toxicologia, fitoterapia, mutagenicidade.

Introdução

Tabebuia aurea (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore é uma espécie de planta pertencente à família Bignoniaceae, sendo uma árvore de 5-10 metros, decídua durante o inverno, nativa do Cerrado, Caatinga e do Pantanal Mato-Grossense, é florífera e ornamental, suas flores são andróginas e grandes, é ocasionalmente cultivada na arborização urbana e no paisagismo (LORENZI, 2008). É conhecida popularmente como Craibeira, Craiba, Ipê-do-cerrado. Têm como distribuição de domínio fitogeográfico a Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (FLORA DO BRASIL, 2020).

Determinadas plantas produzem compostos do metabolismo secundário que agem inibindo ou favorecendo o processo germinativo bem como o processo de divisão celular (IGANCI et al, 2006). Os estudos sobre as atividades medicinais de *Tabebuia aurea* são escassos, sendo encontrado apenas um sobre atividade antifúngica, anti-inflamatória, anti-mitóticas e anti-hemorragicas (SILVA; PAULA; ESPINDOLA, 2009). Entretanto, sua casca e folhas são muito utilizadas na

medicina, sua entrecasca é útil para o tratamento de gripes e resfriados e pode ser utilizada na forma de xaropes ou infusões. Na Argentina, essa espécie é utilizada como abortiva e suas folhas são consideradas purgativas (LORENZI, 2008). O gênero *Tabebuia* tem demonstrado o seu emprego no tratamento de diversas afecções como, câncer, malária, tuberculose, congestão nasal, antimicrobiano e no tratamento de feridas e picadas de cobras.

A utilização de produtos naturais para tratamentos de doenças é uma prática bastante antiga, mais utilizada até os dias atuais. Segundo Bagatini, Silva, Tedesco (2007) as plantas medicinais são utilizadas mundialmente para tratar de doenças, e a maioria delas não foram estudadas suficientemente no que se refere ao seu potencial citotóxico e mutagênico, onde os mesmos podem ser simplesmente monitorados pelo uso do sistema de *Allium cepa*. O sistema de *Allium cepa* é bem aceito para o estudo de efeitos de citotoxicidade de plantas medicinais, pois suas raízes ficam em contato direto com as substâncias testadas, possibilitando a avaliação de diferentes concentrações.

Além de sua utilização nos testes de mutagenicidade e citotoxicidade em plantas medicinais, o sistema de *Allium cepa*, é também utilizado para monitoramento de qualidade ambiental e avaliação do potencial mutagênico de vários compostos químicos. O mesmo apresenta-se como um bioindicador ideal para o primeiro screening da genotoxicidade de infusões de plantas medicinais, devido ao seu baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade, ajudando nos estudos de prevenção de danos à saúde humana.

Com esse trabalho objetivou-se avaliar os possíveis efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato da casca da planta *Tabebuia aurea*, em células de *Allium cepa* e in vitro, através do teste germinação e de alterações celulares e nucleares.

Metodologia

Coleta do material biológico e identificação

Para este trabalho, foram utilizadas amostras de cascas do caule de *T. aurea* coletadas no Sítio Exu, localizado nos domínios da cidade de São Mamede (6°55'37.0"S 37°05'45.0"W), inserido na mesorregião do Seridó ocidental do estado da Paraíba, Brasil.

A coleta aconteceu em abril de 2017 e a identificação da espécie foi realizada através de guias de campo e posteriormente, por especialistas do Herbário CSTR, sendo depositada exsiccata, tombada sob número 6758 CSTR.

As cascas frescas foram secas a temperatura ambiente por uma semana e em seguida foram trituradas em moedor elétrico (Thomas Wiley Laboratoty Mill Model 4) do laboratório de zootecnia

da UFCG, para a obtenção de um pó, necessário para a preparação do extrato aquoso. O mesmo foi peneirado em uma peneira artesanal com tecido de organza, até obter-se um pó fino e uniforme.

Preparação da substância teste

Foram preparadas três soluções em diferentes concentrações de *Tabebuia aurea* diluídas em água destilada. As soluções foram preparadas de acordo com Colacite (2015), 4 g/1000 mL (0,4%); 4 g/500 mL (0,8%); e 4 g/100 mL (4%) utilizadas nos experimentos com sementes de *Allium cepa*.

Para o controle negativo (CN) foi utilizado água destilada; A substância utilizada para o controle positivo (paracetamol a 500 µL/mL) seguiu as recomendações de Rego (2015) e para o teste antígenotóxico foi utilizado uma mistura da concentração de paracetamol do controle positivo mais o extrato aquoso na concentração de (4%) de *T. aurea* em iguais proporções.

Processo de Germinação

As sementes de *A. cepa* foram adquiridas em centro comercial especializado em produtos agrícolas, na cidade de Campina Grande, Paraíba. Para este estudo, foram utilizadas sementes de *A. cepa* da variedade Vale Ouro IPA-11, lote com germinabilidade de 92% e pureza de 99%.

Para higienização e quebra de dormência das sementes foi utilizada uma solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 1%. As sementes foram imersas nessa solução e agitadas cuidadosamente durante 5 minutos. Em seguida, foram enxaguadas 3 vezes com água destilada, e secas com papel filtro esterilizado (BRASIL, 2009).

O teste de germinação foi realizado segundo Sax e Sax (1968). A semeadura foi realizada em placas de Petri estéreis, sobre papel filtro umedecido com os controles negativo, positivo, antígenotóxico e o extrato aquoso de *T. aurea*, nas três concentrações (0,4; 0,8 e 4%). Em cada placa foram colocados 5 mL de cada tratamento e em seguida elas foram tampadas e lacradas com papel filme.

As placas permaneceram sob condições controladas de temperatura e luminosidade. A temperatura foi ajustada para $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, considerada uma das temperaturas ótimas para o crescimento de sementes de cebola da variedade IPA-11 (PINHEIRO et al., 2014), e fotoperíodo de 12 horas com luz artificial, em câmara de germinação. O teste de germinação foi realizado com três placas de petri para cada tratamento, com 25 sementes de *A. cepa* em cada placa, sendo assim, foram utilizadas 18 placas para os seis referidos tratamentos, durante seis dias (144 horas), no Laboratório de Germinação de Sementes da UFCG-CSTR.

Porcentagem de germinação

Para avaliação de toxicidade das espécies de plantas estudadas foi levado em consideração à quantidade de sementes germinadas. Sendo consideradas germinadas apenas as sementes em que a radícula foi visível. E depois foi calculada a porcentagem de germinação, dividindo o número de sementes germinadas pelo total de sementes colocadas para germinar e multiplicando o resultado por 100.

Anomalias Radiculares

Os aspectos morfológicos foram registrados através do uso de uma câmera com 12 megapixels. Através da observação dos registros fotográficos das radículas foi realizada a avaliação da morfologia do crescimento das raízes através da contagem das sementes germinadas, sendo estas classificadas em 4 tipos de anomalias: raízes retorcidas, protuberâncias, bifurcação, ondulação e radícula curta.

Observação do índice mitótico

Para análise do índice mitótico (IM) foi utilizada a técnica de esmagamento para observação das células em processo de divisão (GUERRA; SOUZA, 2002). Onde foram coletadas de (duas a três raízes por réplica) e colocadas em solução fixadora de Carnoy (etanol: ácido acético 3: 1) até o momento da preparação.

Preparação e análise das Lâminas

Durante o processo de preparação de lâminas, as raízes (por réplica) foram retiradas do fixador e passadas por duas lavagens de cinco minutos cada (10 min total) na água destilada e logo depois ficavam mergulhadas durante mais 10 minutos no ácido clorídrico (HCl). Após passar por uma nova lavagem em água destilada por mais 5 minutos, ficavam submersas em ácido acético 45% durante mais 10 minutos. Obtendo assim um total de 35 minutos de preparação, para melhor observação celular.

Em seguida, foi realizada a troca do ácido acético e com o auxílio de pinça e também agulha de seringa foi retirada a coifa (porção apical da raiz) e a zona de crescimento foi colocada sob uma lâmina. Em cada lâmina foram colocadas de duas a três raízes adicionadas a uma gota de HCl mais uma de corante (orceína acética a 2%).

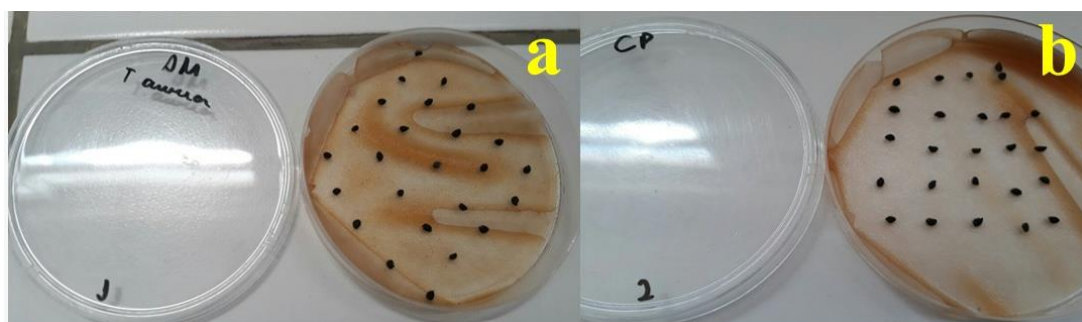
Com o uso de uma lupa e de seringas, eram feitos inicialmente um corte transversal nas raízes além de cortes aleatórios. A lamínula foi então colocada sobre a lâmina e realizada o squash (esmagamento) com o dedo polegar e suave pressão (GUERRA; SOUZA, 2002).

Foram avaliadas 1.000 células por réplica, totalizando 3.000 células por tratamento. As mesmas foram contabilizadas através do uso de um microscópio óptico com aumento de 400x.

Resultados e Discussão

A análise de germinação demonstrou que os testes realizados para o controle positivo e o antígenotóxico na presença de paracetamol (500 $\mu\text{L}/\text{mL}$), mostraram ausência de germinação das sementes em todas as réplicas (Figura 1).

Figura 1- Representação das placas de Petri com controle antígenotóxico para *T. aurea* (a), e Controle Positivo (b), com ausência total de germinação.



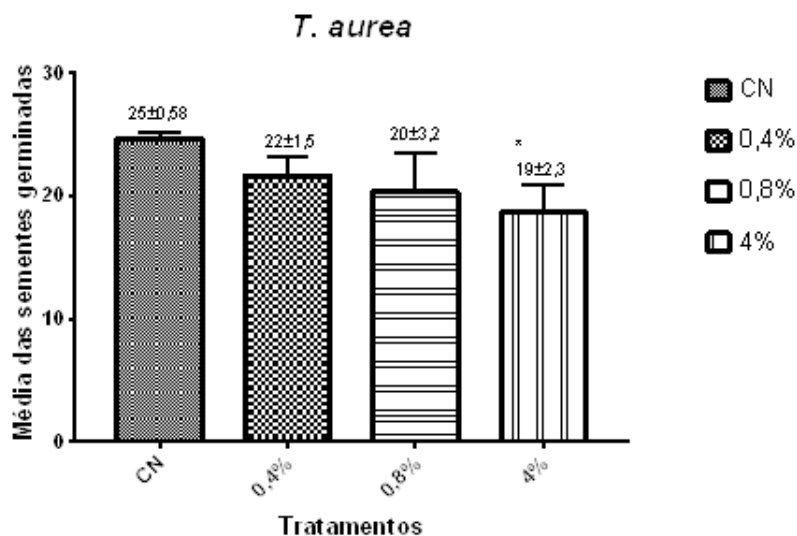
Fonte: Os autores

De acordo com AGARWAL et al. (2011) o paracetamol é um analgésico antitérmico comumente utilizado, sendo a causa mais comum de insuficiência hepática aguda induzida por drogas nos Estados Unidos. Segundo estudo realizado por Rego (2015) com testes em *Allium cepa*, *Artemia salina* e teste de bioensaio o paracetamol e a dipirona apresentam indícios de toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade.

Entretanto, os extratos de *T. aurea* nas concentrações de 4 g/1000 mL (0,4%); 4 g/500 mL (0,8%); e 4 g/100 mL (4%), mostraram alterações na germinação das sementes, um efeito alelopático, visto que, com o aumento da concentração a média de germinação decresceu, mas apesar disso, apenas a concentração de 4% apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle negativo. Portanto, o extrato mostrou indicativo de toxicidade apenas na concentração de 4% (Figura 2).

Figura 2- Gráfico da média de sementes germinadas de *Allium cepa* em função da exposição ao Controle Negativo (CN) e aos extratos de *T. aurea*; (Média por concentração +/- Desvio padrão); Teste de Tukey.

*Diferença estatística significativa

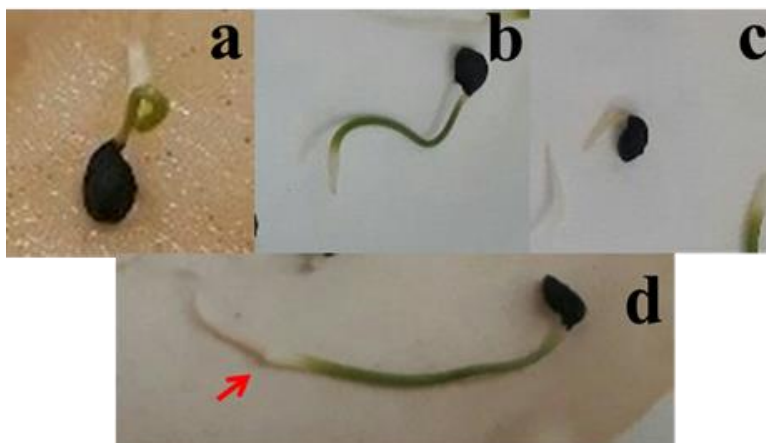


Fonte: Os autores

O teste de germinação com vegetais é um modelo vastamente utilizado para avaliar o potencial aleloquímico de extratos de plantas ou de algumas substâncias isoladas, um dos efeitos previstos quando o composto interfere no funcionamento celular é a alteração no índice de germinação das sementes, revelando ação tóxica ou citotóxica (LUZ et al., 2012). De acordo com Fiskesjö (1985) um agente pode ser considerado tóxico quando causa redução superior a 50% no índice de germinação de sementes de *Allium cepa*, em relação ao controle negativo.

Em referência as análises das anomalias radiculares, foram observados os tipos de anomalias presentes na Figura 3.

Figura 3- Tipos de anomalias observadas nas radículas de *A. cepa*. Retorcidas (a), ondulações (b), curtas (c) e protuberância (d).



Fonte: Os autores

Através da análise da média e desvio padrão foi possível observar diferença estatística significativa apenas nas raízes com protuberância na concentração de 0,4% de *Tabebuia aurea* em relação controle negativo (Tabela 1). No entanto, quando analisado o efeito total de todas as anomalias, foi observado diferença estatística significativa em todas as concentrações testadas.

Tabela 1- Média e desvio padrão das anomalias radiculares (curtas, protuberância, ondulação, bifurcação) para o Controle Negativo (CN) e as diferentes concentrações *Tabebuia aurea* (TA)
*Diferença estatística significativa

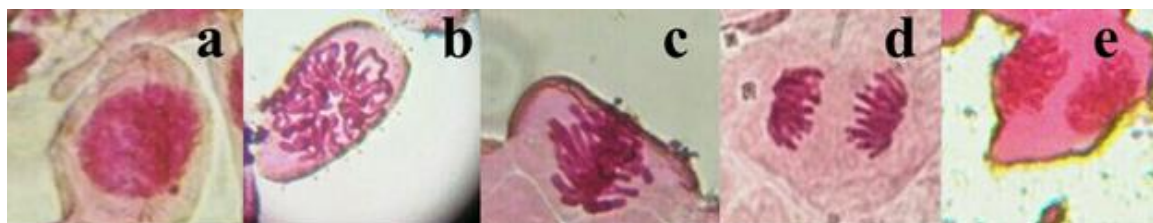
	CN	TA (0,4%)	TA (0,8%)	TA (4%)
Tipos de anomalias	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Curtas	3,00±1,78	1,66±1,52	4,66±5,68	3,66±3,05
Protuberância	0,33±0,58	*4±1,73	2,33±2,08	2,00±1,73
Ondulação	0,33±0,58	2,66±1,15	1,33±0,58	2,33±1,15
Bifurcação	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Fonte: Os autores

As substâncias são citotóxicas quando são capazes de causar danos nas células como um todo, ou reduzir sua taxa de crescimento. Deste modo, reduções no crescimento de raízes são indicativo de citotoxicidade e as anomalias macroscópicas são de genotoxicidade (MOREIRA et al., 2014). Desse modo, as anomalias observadas nas radículas da *Tabebuia aurea* sugere um indicativo de processos genotóxicos.

Na análise do índice mitótico foram identificadas todas as fases do ciclo celular nos extratos estudados (FIGURA 4).

Figura 4 -Estágio de mitose em células meristemáticas de *Allium cepa*: Prófase (a) Pró-metáfase (b) Metáfase (c) Anáfase (d) Telófase (e).



Fonte: Os autores

A análise das fases do índice mitótico para cada concentração-teste, apresentou diferença significativa quanto ao número de prófases em relação ao controle negativo, nas concentrações de 0,8% e 4% (TABELA 2).

Tabela 2 - Média e desvio padrão das fases mitóticas: prófase (P), pró-metáfase (PM), metáfase (M), anáfase (A), telófase (T) para o Controle Negativo (CN) e as concentrações de *Tabebuia aurea* (TA). *Diferença estatística significativa

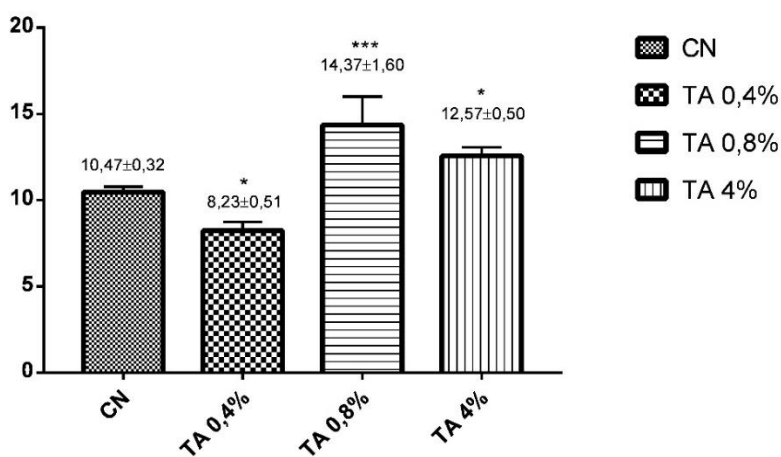
	CN	TA 0,4%	TA 0,8%	TA 4%
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
P	5,77 ± 1,44	6,77 ± 2,02	****13,87 ± 1,64	****11,77 ± 0,21
PM	0,37 ± 0,15	0,30 ± 0,44	0,10 ± 0,10	0,10 ± 0,17
M	2,10 ± 0,46	0,47 ± 0,72	0,20 ± 0,10	0,20 ± 0,10
A	1,17 ± 0,21	0,57 ± 0,90	0,10 ± 0,10	0,20 ± 0,34
T	1,07 ± 0,40	0,37 ± 0,23	0,10 ± 0,10	0,30 ± 0,20

Fonte: Os autores

Entretanto, quando foram analisadas todas as fases em conjunto, foram observadas diferenças importantes. Todas as concentrações apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle negativo (CN). Na concentração de 0,4% houve uma diminuição no índice mitótico em relação ao controle negativo, enquanto que para a concentração 0,8% apresentou um maior número de células em divisão (FIGURA 5).

Também foi observado através de uma anova duas vias que as fases do ciclo celular tiveram um efeito extremamente significativo em comparação com as concentrações-teste analisadas.

Figura 5 -Gráfico referente ao índice mitótico. Controle Negativo (CN); *Tabebuia aurea* (TA); Controle Negativo CN; Teste de Dunn; *Nível de Significância



Fonte: Os autores

Não foi possível realizar a análise do índice mitótico do controle positivo e dos tratamentos teste para antígenotóxico, pois não ocorreu germinação das sementes nestes testes. Provavelmente o uso do paracetamol teve efeito mutagênico letal nas células das sementes de *Allium cepa*. Pois foi observado que o paracetamol possui efeito mutagênico, causando anomalia e diminuindo o número de células em divisão (STURBELLE et al., 2010).

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as concentrações do extrato da casca de *Tabebuia aurea*, quando analisadas, influenciaram na germinação e causaram variação considerável no crescimento de radícula e no índice mitótico de *Allium cepa*, apresentando assim efeito tóxico e citotóxico. Na análise do índice mitótico foi constatado que o extrato nas três concentrações houve indícios genotóxicos. Não foi possível realizar a análise dos tratamentos do controle positivo e do teste antígenotóxico, pois não ocorreu germinação das sementes, ocorrendo um efeito alelopático. O consumo para uso medicinal da casca dessa planta, deve ser evitado nas concentrações apresentadas nesse trabalho, devido ao seu efeito tóxico, citotóxico e genotóxico.

Referências

AGARWAL, Rakhee et al. Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice occurs with inhibition of activity and nitration of mitochondrial manganese superoxide dismutase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 337, n. 1, p. 110-118, 2011.

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**. Set. 2007. p 444 – 447.

BRASIL. Instrução Normativa nº 30, de 21 de maio de 2009 (estabelece normas e padrões para produção e comercialização de sementes de espécies forrageiras de clima tropical). **Diário Oficial da União: Brasília**, mai. 2009. Seção 1, p.45-48.

COLACITE, J. Triagem fitoquímica, análise antimicrobiana e citotóxica e dos extratos das plantas: *Schinus terebinthifolia*, *Maytenus ilicifolia* REISSEK, *Tabebuia avellaneda*, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) BRENAN. **Revista Saúde e Pesquisa, Maringá, PR**, v. 8, n. 3, p. 509-516, dez. 2015.

FISKESJÖ, GEIRID. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: Funpec, 2002. p. 1-131.

HOSHINA, M. M. Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro, município de Rio Claro, pertencente à bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa*. 2002. 52 f. **Monografia** (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, SP, 2002.

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

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

LORENZI, H. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 178 p.

LUZ, A. C. et al. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of *Plantago major* L. in test systems in vivo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 635-642, 2012.

MOREIRA, T. C. et al. Avaliação da toxicidade e da genotoxicidade da ivermectina e da deltametrina através de bioensaio com *Allium cepa*. **Revista Científica da Faminas**, v. 9, n. 1, p.25-40, 2014.

PINHEIRO, G. S. et al. Efeito da temperatura sobre a germinação de sementes de cebola. **Scientia Plena**, v. 10, n. 11, p.1-6, 2014.

REFLORA. **Lista de espécies da Flora do Brasil**. 2020. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do#CondicaoTaxonCP>>. Acesso em: 17 abril. 2018.

REGO, S. C. et al. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade da dipirona e do paracetamol em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*. **Boletim Informativo Geum**, v. 6, n. 4, p. 7, 2015.

SAX, K.; SAX, H. J. Possible mutagenic hazards of some food additives, beverages and insecticides. **Japan. J. Genetics**, v. 43, n. 2, p.89-94, 1968.

SILVA, F. M.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Mycoses**, [S.l.], v. 52, n. 6, p. 511-517, nov. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01647.x>>. Acesso em: 18 abril 2018.

STURBELLE, Régis T. et al. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Rev. bras. farmacogn**, v. 20, n. 3, p. 409-415, 2010.