

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOGENOTÓXICA DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Ageratum conyzoides* UTILIZANDO O BIOENSAIO *Allium cepa*.

Giovanna A. Belo^{1*}, Ana Beatriz Monteiro¹, Lília R. Ribeiro²

1. Estudante de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Formiga-MG

2. Professora do Centro Universitário de Formiga-MG

Resumo:

Ageratum conyzoides (mentrasto), é uma espécie amplamente utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas patologias. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade citogenotóxica e mutagênica dos extratos aquosos de *A. conyzoides*, por meio do bioensaio *Allium cepa*. Os resultados obtidos mostram que o extrato de *A. conyzoides* é capaz de aumentar o índice mitótico e induzir alterações cromossômicas, de modo dose dependente. Dessa forma, conclui-se que, o extrato possui efeito citotóxico e genotóxico sobre as células meristemáticas de *A. cepa*.

Palavras-chave: Mentrasto; Mutagenicidade; Plantas Medicinais.

Apoio financeiro: FAPEMIG e UNIFOR-MG

Introdução:

A Organização Mundial de Saúde estima que mais de 5,6 bilhões de pessoas, utilizam fitoterapia para cuidados primários de saúde. (SHEN et al., 2012). Essa situação é sustentada por diversos fatores, inclusive pelo alto custo dos medicamentos industrializados, o difícil acesso da população à assistência médica, bem como a tendência, da utilização de produtos de origem natural. (BRASILEIRO et al., 2008).

Ageratum conyzoides L. é uma erva aromática anual pertencente à família Asteraceae que pode chegar até 1 metro de altura. (LORENZI; MATOS, 2002). No Brasil é popularmente conhecida como mentrasto, erva de São João, catinga de bode, picão-branco, picão-roxo, maria preta, entre outros nomes, variando com a localidade no país. (MING, 1999; LORENZI; MATOS, 2002). Na medicina popular o chá de mentrasto é utilizado principalmente como anti-inflamatório e analgésico (YAMAMOTO et al., 1991), e por suas propriedades antirreumática, antiespasmódica, antisséptica e cicatrizante de ferimentos e queimaduras. (GRANDI et al.,

1989; OKUNADE, 2002; LORENZI; MATOS, 2002).

O uso popular bem sucedido desta planta levou à sua inserção na lista de medicamentos herbáceos notificados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Anvisa (RDC nº 10, 9 de março de 2010). Dessa forma o medicamento bruto (partes aéreas, esmagadas ou em pó) está autorizado para comercialização e uso em preparação na forma de infusões. (BOSI et al., 2013).

O bioensaio *Allium cepa* tem sido rotineiramente utilizado para avaliar os danos causados por substâncias mutagênicas ou carcinogênicas que podem estar presentes nos extratos das plantas. (BIDAU et al., 2004; SILVA et al., 2015; KRUGER, 2009; PINHO et al., 2010; FACHINETTO et al., 2007). Este método já validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP), possui uma ótima correlação com os resultados de testes realizados em mamíferos e é capaz de informar possíveis alterações cromossômicas, numéricas e estruturais, e inibição/aumento do índice mitótico. (LEME; ÂNGELES; MARIN-MORALES, 2008; BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007)

Visto que a maioria das plantas medicinais, utilizadas popularmente, ainda não possuem estudos suficientes sobre seu potencial citotóxico e mutagênico, esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade citogenotóxica dos extratos aquosos de *Ageratum conyzoides*, por meio do bioensaio *Allium cepa*.

Metodologia:

Obtenção dos extratos aquosos

Os extratos aquosos de *Ageratum conyzoides* foram obtidos a partir da infusão da parte aérea triturada (produto comercial) por 10 minutos. Três diferentes concentrações foram preparadas (0,56 g/L, 2,8 g/L, 5,6 g/L), a

fim de comparar as alterações causadas por diferentes dosagens do chá.

Bioensaio de germinação

Sementes de *Allium cepa* foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio (1%). A germinação foi induzida em estufa do tipo B.O.D. a 24°C, por um período de 96 horas. Os ensaios foram realizados em placas de Petri, com 50 sementes de *A. cepa* cada, com 3 repetições por tratamento e os grupos controle.

Para a avaliação do potencial citogenotóxico, sementes de *A. cepa* foram tratadas com água destilada por 24h para a emissão de raízes. Em seguida, as placas foram separadas e classificadas de acordo com o tipo de tratamento (T) utilizado: (T1) controle negativo: água destilada por 72h; (T2) controle positivo: metil metano-sulfonato (MMS - 10 µg/mL) por 72h; (T3) extrato aquoso 0,56 g/L por 72h; (T4) extrato aquoso 2,8 g/L por 72h; (T5) extrato aquoso 5,6 g/L por 72h.

As raízes de *A. cepa* foram coletadas e fixadas em solução Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético) e armazenadas a -4°C até a sua utilização para as análises microscópicas.

Análise citogenética

As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento (GUERRA, 2002) e coradas com orceína acética (2%). Para cada tratamento foram analisadas 5 lâminas sendo avaliadas cerca de 1000 células meristemáticas em cada.

Para verificar os efeitos citotóxicos das concentrações do chá, avaliou-se a presença de alterações cromossômicas e o índice mitótico, onde os grupos T1 e T2 foram utilizados como parâmetros para comparações.

Análises estatísticas

Para todos os parâmetros avaliados foi realizada análise de variância com pós teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão:

Entre as maneiras mais conhecidas e utilizadas de consumir as plantas medicinais se encontra a preparação de infusões, conhecidas popularmente como chás. (HARAGUCHI; CARVALHO, 2010). Para aumentar a segurança das pessoas que consomem extratos aquosos para fins

medicinais, novos estudos buscam cada vez mais informações sobre a ação dos componentes presentes nos extratos das plantas em nível celular. (SILVA et. al., 2015).

O bioensaio *Allium cepa* é um excelente bioindicador para o primeiro *screening* da genotoxicidade de extratos de plantas medicinais (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007). O teste é capaz de detectar o efeito clastogênico (quebras cromossômicas) e aneugênico de um composto (aneuploidias ou segregações cromossômicas anormais devidas a disfunções no aparato mitótico) (FISKEJO, 1985).

No presente estudo, investigou-se pela primeira vez, os efeitos citotóxicos dos extratos aquosos de *A. conyzoides* sobre células meristemáticas de *A. cepa*. Foi verificado um aumento significativo do índice mitótico nos tratamentos realizados com os extratos aquosos, quando comparados aos grupos controle (TAB. 1), indicando que os extratos exibiram efeito citotóxico.

A partir dos resultados observados na tabela 1 pode-se verificar que, independente da concentração utilizada, o extrato de *A. conyzoides* possui a capacidade de estimular divisões celulares. Cuidados devem ser tomados ao ingerir infusões de plantas que apresentam componentes capazes de aumentar o índice mitótico. De acordo com Belcavello et al. (2012) tal ação demonstra que o extrato em estudo possui atividade citotóxica, capaz de estimular o efeito carcinogênico *in vivo*.

Tabela 1 – Médias dos índices mitóticos de células meristemáticas de *A. cepa* submetidas a diferentes concentrações do extrato aquoso de *A. conyzoides*

| Tratamentos | Médias (%) |
|-------------|------------|
| T1 | 8,84 a |
| T2 | 8,086 a |
| T3 | 10,484 b |
| T4 | 10,426 b |
| T5 | 11,374 b |

Fonte: Os autores (2017)

Nota: Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

O efeito genotóxico dos extratos aquosos de *A. conyzoides* sobre o material genético de *A. cepa* também foi investigado

neste estudo. Todas as células tratadas com os extratos, apresentaram alterações cromossômicas diferentes, que incluem fragmentos cromossômicos, pontes, poliploidia e aderências (*stickinnes*). Constatou-se que o efeito genotóxico observado foi dose dependente, ou seja, quanto maior a concentração do extrato, maior o número de alterações cromossômicas observadas. (TAB. 2)

Tabela 2 - Médias das alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *A. cepa* submetidas a diferentes concentrações do extrato aquoso de *A. conyzoides*.

| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
|---------------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Total de Alterações | 2,0 a | 25,6 b | 72,0 c | 109,6d | 148,4e |
| <i>Stickinnes</i> | 1,6 a | 9,4 b | 8,8 b | 11,8 b | 8,8 b |
| Duplicações | 0,2 a | 2,6 a | 59,6 b | 91,6 c | 131,8d |
| Pontes | 0,0 a | 4,6 b | 1,4 a | 1,4 a | 2,8 b |

Fonte: Os autores (2017)

Nota: Médias seguidas por letras distintas, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Em relação às alterações cromossômicas (TAB. 2), observou-se diferença estatística significativa entre todos os tratamentos e os grupos controle. As alterações cromossômicas aumentaram proporcionalmente às concentrações dos extratos, causando ainda mais danos do que o observado no controle positivo sob a ação do agente mutagênico.

Dentre as alterações encontradas, as duplicações cromossômicas merecem destaque, apontando mais uma vez, o efeito aneugênico dos extratos estudados. Outra alteração cromossômica observada com frequência foram as aderências cromossômicas (*stickiness*). Segundo Fiskejo (1985), tal alteração indica alta toxicidade sendo geralmente irreversível, chegando a causar a morte celular.

Foram constatados também efeitos clastogênicos do extrato através da observação de pontes cromossômicas que resultam em quebras, gerando fragmentos cromossômicos que ocasionam a perda de material genético e, até mesmo, o surgimento de micronúcleos (FISKEJO, 1985). Essa alteração foi estatisticamente significativa

apenas na concentração que simula uma super dosagem (5,6 g/L).

Tais efeitos clastogênicos e aneugênicos observados nas células meristemáticas de *Allium cepa* demonstram que o extrato de *Ageratum conyzoides* provoca danos ao DNA e que alguns destes danos se agravam de acordo com a concentração utilizada. Esses resultados reforçam a cautela quanto à utilização de plantas medicinais pela população, pois seu uso indiscriminado pode gerar prejuízos que não justifiquem seu potencial terapêutico. (BELCAVELLO et al., 2012)

Conclusões:

Os resultados obtidos neste estudo, sugerem cautela quanto ao uso do extrato de *Ageratum conyzoides*, frente ao seu potencial citogenotóxico.

Mais estudos devem ser realizados, principalmente aqueles que avaliem seus componentes químicos, uma vez que, alguns são capazes de aumentar o índice mitótico e induzir duplicações cromossômicas. Todas estas ações sugerem que o mentrasto possui substâncias com efeito carcinogênico.

Referências bibliográficas

BAGATINI, Margarete Dulce; SILVA, Antonio Carlos Ferreira da; TEDESCO, Solange Bosio. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 17, n. 3, p. 444-447, jul. 2007.

BELCAVELLO, Luciano et al. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza On Line**, Espírito Santo, v. 10, n. 3, p. 140-145, 2012.

BIDAU, Claudio J. et al. Evaluation of the genotoxicity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae) using the *Allium* test. **Cytologia**, v. 69, n. 2, p. 109-117, 2004.

BOSI, Cristiane F. et al. Pyrrolizidine alkaloids in medicinal tea of *Ageratum conyzoides*. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 23, n. 3, p. 425-432, jun. 2013.

BRASILEIRO, Beatriz Gonçalves et al. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida

no "Programa de Saúde da Família", Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 629-636, out. 2008.

FACHINETTO, Juliana M. et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Rev Bras Farmacogn**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 49-54, jan./mar. 2007.

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

GRANDI, Telma Sueli Mesquita et al. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 3, n. 2, p. 185-224, 1989.

GUERRA, Marcelo; SOUZA, MJ de. **Como observar cromossomos**: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. FUNPEC: Recife, 2002.

HARAGUCHI, Linete Maria Menzenga; CARVALHO, Oswaldo Barreto de. Plantas medicinais: do curso de plantas medicinais. In: **Plantas medicinais: do curso de plantas medicinais**. Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente, 2010.

KRÜGER, Rosangela Angelise. Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa*. **Univ. Feevale**, v. 58, 2009.

LEME, Daniela Moraes; DE ANGELIS, Dejanira de Franceschi; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 4, p. 214-219, 2008.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MING, Lin Chau. *Ageratum conyzoides*: A tropical source of medicinal and agricultural products. **Perspectives on new crops and new uses**, p. 469-473, 1999.

OKUNADE, Adewole L. *Ageratum conyzoides* L.(Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 1-16, 2002.

PINHO, Daiane S. de et al. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 165-170, abr./mai. 2010.

SHEN, Tao et al. The genus *Commiphora*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 319-330, maio. 2012.

SILVA, Francisca Daniela Barros da et al. Evaluation of the genotoxicity of aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae) using the *Allium* test. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 13, n. 2, p.101-109, abr. 2015.

YAMAMOTO, Lucia A. et al. Pharmacological screening of *Ageratum conyzoides* L. (mentrasto). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 2, p.145-147. 1991.