

Efeitos Citogenotóxicos das Infusões de *Costus Spicatus* sobre Células Meristemáticas de *Allium Cepa*

Cytogenotoxic effects of Costus Spicatus infusions on Allium Cepa meristematic cells

Claudia de Faria Leal¹, Daiane Maria de Alemida¹, Lília Rosário Ribeiro¹

¹Centro Universitário de Formiga/MG – UNIFOR/MG.

Resumo

Introdução: *Costus spicatus* (Jacq.) é uma espécie herbácea cujo uso medicinal é indicado para fins depurativos, adstringentes, diuréticos e, também, para o tratamento de algumas doenças do trato urinário e malária. Considerando a escassez de informações sobre a toxicidade das infusões dessa planta, este trabalho teve como objetivo verificar os possíveis efeitos citogenotóxicos das infusões de *C. spicatus* sobre células meristemáticas de *A. cepa*. **Material e Métodos:** Foram realizadas avaliações microscópicas utilizando três concentrações de infusões (0,9; 4,5; 9,0 g/L) preparadas a partir das folhas *in natura* de *Costus spicatus* (Jacq.). Como controle negativo foi utilizada água destilada, e metil metano-sulfonato (MMS) (10 µg/mL) como controle positivo. **Resultados:** A análise citogenética evidenciou aumento significativo do índice mitótico e das alterações cromossômicas ($p < 0,05$) em todos os tratamentos nos quais foram utilizadas as infusões de *C. spicatus*. Foi observado também que as infusões foram capazes de provocar distúrbios no fuso mitótico das células meristemáticas de *A. cepa*, independentemente da concentração. **Conclusão:** As infusões de *C. spicatus* provocaram efeitos citogenotóxicos sobre células meristemáticas de *A. cepa*.

Palavras-chave: Bioensaio, citogenotoxicidade, Cana-de-macaco.

Abstract

Introduction: *Costus spicatus* (Jacq.) is an herbaceous species whose medicinal use is indicated for purifying, astringent, diuretic and also for the treatment of urinary tract diseases and malaria. Requesting the scarcity of information about the toxicity of infusions of this plant, this work aimed to verify the possible cytogenotoxic effects of *C.*

spicatus infusions on *A. cepa* meristematic cells. **Material and Methods:** Microscopic evaluations were performed using three infusions concentration (0.9; 4.5; 9.0 g / L) prepared from fresh leaves of *Costus spicatus* (Jacq.). Distilled water was used as negative control, and methyl methanesulfonate (MMS) (10 µg / mL) as positive control. **Results:** A cytogenetic analysis showed a significant increase in mitotic index and chromosomal changes ($p < 0.05$) in all treatments where they were used as infusions of *C. spicatus*. It was also observed that the infusions were able to cause disturbances in the mitotic spindle of *A. cepa* meristematic cells, regardless of concentration. **Conclusion:** Infusions of *C. spicatus* caused cytogenotoxic effects on meristematic cells of *A. cepa*.

Keywords: Bioassay, cytogenotoxicity, spiked spiralfly ginger.

Recebido em: 25-10-2021

Publicado em: 22-12-2021

Autor correspondente

Claudia de Faria Leal

Endereço: Rua Pains, 300 – Sagrado Coração de Jesus - Formiga (MG), Brasil.

E-mail: claudia.faria.leal@gmail.com

1. Introdução

A utilização de plantas para fins terapêuticos surgiu em consequência do acúmulo, ao longo dos séculos, de conhecimentos práticos a respeito da ação dos vegetais por diferentes grupos étnicos, dando origem a uma medicina tradicional reconhecida atualmente pela Organização Mundial da Saúde (OMS). No Brasil, além dos conhecimentos tradicionais da cultura indígena, as contribuições fornecidas sobre esse tema pelos imigrantes e pelos escravos tiveram significativa relevância no surgimento de uma rica medicina popular apoiada na utilização da biodiversidade vegetal¹.

A demanda crescente pela utilização das plantas medicinais no Brasil, está relacionada a vários fatores, incluindo baixo custo, eficácia, melhor controle de qualidade, bem como a grande biodiversidade da flora brasileira².

Costus spicatus (Jacq.), conhecida popularmente como cana-de-macaco ou cana-do-brejo, é uma espécie herbácea encontrada em florestas úmidas costeiras, e seu uso medicinal é indicado para fins depurativos, adstringentes, diuréticos e também para o tratamento de algumas doenças do trato urinário e malária³.

As propriedades químicas de *C. spicatus* podem ser observadas, a partir de

estudos realizados com os caules, folhas e flores dessa planta, nos quais foram confirmadas as presenças de triterpenos e esteroides, flavonoides, saponinas, alcaloides e taninos. Ademais, os extratos dessa herbácea mostraram ter potencial antioxidante⁴.

Ainda que o uso de plantas medicinais para fins terapêuticos seja uma realidade promissora, compostos existentes em determinadas espécies podem ser responsáveis por efeitos nocivos às pessoas que as consomem. Por esse motivo, é necessário averiguar por meio de testes biológicos, se as drogas vegetais possuem efeito⁵.

Um dos testes eficientes para a detecção de citogenotoxicidade em extratos de plantas medicinais é o bioensaio *Allium cepa*, pois possibilita a identificação da presença de alterações cromossômicas, como quebras, pontes e micronúcleos, além de mudanças no processo de divisão celular⁵.

Muitas espécies vegetais são utilizadas na medicina popular por diversas populações. No entanto, seu uso indiscriminado e não controlado pode causar mais danos à saúde pública do que benefícios². Dessa forma, considerando a escassez de informações sobre a toxicidade das infusões de *C. spicatus*, este trabalho teve como objetivo verificar

os possíveis efeitos citogenotóxicos das infusões de *C. spicatus* sobre células meristemáticas de *A. cepa*.

2. Materiais e métodos

Material vegetal

Foram preparadas infusões em água destilada, a partir de folhas *in natura* de *C. spicatus* nas concentrações de 0,9 g/L, 4,5 g/L, 9,0 g/L. Após a fervura da água, o tempo de infusão das folhas foi de dez minutos.

Bioensaio *Allium cepa*

Sementes de *A. cepa* foram tratadas com água destilada durante as primeiras 24 horas, a fim de induzir a emissão das raízes. Em seguida, as raízes foram submetidas aos tratamentos (infusões de *C. spicatus*) e aos grupos controle (negativo com água destilada e positivo com metil metano-sulfonato - 10 µg/mL) durante 72 horas, utilizando estufa do tipo B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) a 24°C. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 3 repetições de 50 sementes por placa para cada tratamento. As raízes

obtidas foram coletadas, fixadas em solução *Carnoy*, e armazenadas a -4° C até uso¹⁵.

Análise citogenética

As raízes fixadas foram lavadas em água destilada, e hidrolisadas em HCl a 60° C por 2 minutos. Em seguida, os meristemas foram isolados e as lâminas foram confeccionadas utilizando a técnica do esmagamento e coradas em orceína acética 2%⁶.

Para cada tratamento, foram consideradas cinco lâminas, cada uma com dez campos com aproximadamente cem células, totalizando cinco mil células⁷.

Para a avaliação dos efeitos citogenotóxicos, os seguintes parâmetros foram avaliados microscopicamente: (i) índice mitótico (IM), calculado pelo número de células em divisão pelo número total de células; (ii) alterações cromossômicas (AC), expressas como a porcentagem do número de alterações, como: c-metáfases, cromossomos pegajosos (*stickness*), pontes, fragmentos cromossômicos; e (iii) alterações nucleares (AN), determinadas pela frequência de núcleos condensados e micronucleados em células em interfase⁸.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o software Sisvar⁹. As médias \pm desvio padrão (SD) de todos os parâmetros analisados (índice mitótico e frequência de alterações cromossômicas) foram submetidas à análise de variância e comparadas com os grupos controle utilizando o pós-teste de *Scott-Knott* ($p < 0,05$).

3. Resultados e Discussão

O potencial citotóxico de compostos ou substâncias químicas pode ser definido pelo acréscimo ou redução do índice mitótico (IM) dos tecidos expostos a esses agentes¹⁰. O índice mitótico de uma população de células, por sua vez, é expresso como uma proporção da população em qualquer estágio mitótico. É um critério importante para o crescimento e multiplicação dos tecidos. Por ser calculado em preparações de células fixadas e coradas em uma fase de divisão particular, o IM reflete apenas os estágios da divisão no momento da fixação. Além disso, como a divisão celular é um processo que segue a replicação do DNA em condições normais, o índice mitótico é indiretamente um parâmetro

que também está associado à replicação do DNA¹¹.

Uma redução no IM pode estar relacionada à inibição da síntese de DNA ou retardo nas fases do ciclo celular. Ocasionalmente, também pode haver aumentos significativos no IM em comparação com as soluções controle. Isso pode ser devido a uma redução na duração dedicada ao reparo do DNA ou a aceleração da transição entre as fases do ciclo celular. Ambos os eventos podem

resultar em uma progressão descontrolada da proliferação celular.

Os efeitos das infusões sobre a divisão celular e o comportamento cromossômico de *A. cepa* são apresentados na TABELA 1. Foi observado aumento significativo do índice mitótico e das alterações cromossômicas ($p < 0,05$) em todos os tratamentos onde foram utilizadas as infusões de *C. spicatus*, evidenciando os efeitos citotóxicos sobre as células meristemáticas de *A. cepa*.

TABELA 1 – Análises citogenéticas de pontas de raízes de *A. cepa* expostas a infusões de folhas de *C. spicatus*.

Tratamento	Índice Mitótico	Alterações Cromossômicas	Alterações Nucleares	
			Micronúcleo	Núcleo condensado
Controle Negativo	9,713 ± 0,85	0,206 ± 0,45	0,142 ± 0,72	0,074 ± 0,66
Controle Positivo	8,647 ± 0,85	1,786 ± 0,45*	3,225 ± 0,72*	6,390 ± 0,66*
Chá <i>in natura</i> (0,9 g/L)	14,327 ± 0,85*	3,155 ± 0,45*	1,236 ± 0,72	0,040 ± 0,66
Chá <i>in natura</i> (4,5 g/L)	11,273 ± 0,85*	2,234 ± 0,45*	0,411 ± 0,72	0 ± 0,66
Chá <i>in natura</i> (9,0 g/L)	12,357 ± 0,85*	3,045 ± 0,45*	0,907 ± 0,72	0 ± 0,66

Nota: os valores mostrados são média \pm DP. Para cada tratamento, e dentro da mesma linha, os valores com um asterisco são significativamente diferentes daqueles do controle correspondente (Pós teste Scott-Knott; $p < 0,05$).

O potencial genotóxico de uma substância está relacionado à capacidade que ela possui de provocar alterações nos cromossomos ou no DNA. A análise das alterações cromossômicas (AC) serve como um teste de genotoxicidade, e é um dos poucos métodos para medir os danos em sistemas expostos a possíveis agentes mutagênicos ou cancerígenos. Para permitir a avaliação dos efeitos ou danos que esses agentes podem causar, é necessário que a amostra esteja em divisão mitótica constante, buscando identificar os efeitos tóxicos e alterações que ocorrem durante o ciclo celular. Assim, a análise das alterações cromossômicas, além de estimar o efeito genotóxico de agentes testados, também

permite a avaliação de suas ações clastogênicas e aneugênicas¹².

Para avaliar as alterações cromossômicas a partir do bioensaio *A. cepa*, vários tipos de AC são considerados nas diferentes fases da divisão celular. Dessa forma, AC como pontes e quebras cromossômicas, são indicadoras de uma ação clastogênica, enquanto que perdas cromossômicas, atrasos, aderência (*stickness*), multipolaridade e metáfases colchicínica resultam de efeitos aneugênicos¹². As infusões de *C. spicatus* provocaram distúrbios no fuso mitótico das células meristemáticas de *A. cepa*, independente da concentração (TABELA 1 e FIGURA 1).

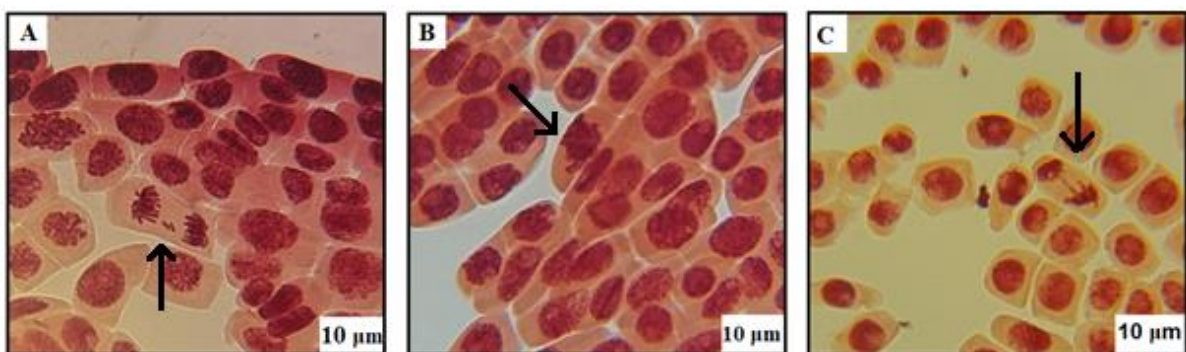


FIGURA 1 - Alterações Cromossômicas observadas em células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com infusões de *C. spicatus*: A – Cromossomos perdidos; B – *Stickness* (cromossomo pegajoso); C – Ponte cromossômica.

A toxicidade de *C. spicatus* pode estar associada à presença de alcaloides, substâncias nitrogenadas estruturalmente diversas, considerando que algumas delas podem ser princípios tóxicos de plantas¹³. Outros compostos fenólicos encontrados em extratos de plantas, principalmente flavonoides e taninos, podem apresentar propriedades pró-oxidantes e citotóxicas sob determinadas condições, o que pode explicar os efeitos citogenotóxicos dos chás de *C. spicatus* sobre as células meristemáticas de *A. cepa*.¹⁴.

4. Conclusão

As infusões de *C. spicatus* provocaram efeitos citogenotóxicos sobre células meristemáticas de *A. cepa*. Os resultados sugerem ponderação quanto ao uso frequente das infusões de *C. spicatus* por humanos, bem como a necessidade de estudos utilizando outros sistemas de teste em mamíferos.

Declaração de Conflitos De Interesses

Os autores do artigo não se encontram em nenhuma situação de conflito de interesse que possa afetar o desenvolvimento do trabalho, e não receberam nenhum apoio financeiro para a pesquisa, bem como para a publicação deste artigo.

Referências Bibliográficas

- 1- MACHADO, C.A.; VARGAS, J.F.R. Plantas Medicinais do Jardim Botânico de Porto Alegre. Porto Alegre: Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul, 2018. 112 p.
- 2- TEDESCO, S.B.; LAUGHINGHOUSE IV, H.D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. *Environmental Contamination*, p. 137-156, 2012.
- 3- PAES, L.S.; MENDONÇA, M. S.; CASA, L.L. Aspectos Estruturais e Fitoquímicos de partes vegetativas de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. (Costaceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, Campinas, v. 15, n. 03, p. 380-390, 2013.

- 4- LAURINTINO, T. K. S. Avaliação de compostos bioativos e potencial antioxidante da folha e caule da cana do brejo (*Costus spicatus*) por diferentes métodos de extração. Orientador: Dr. Arioaldo Bolzan. 2020. 106 p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, 2020.
- 5- LESSA, L.R.; SILVA, M.C.C; CARIELLO, F.M.R. Fundamentos e aplicações do *Allium cepa* como bioindicador de mutagenicidade e citotoxicidade de plantas medicinais. Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, v. 10, n. 03, p. 39-48, out. 2017.
- 6- GUERRA, M.; SOUZA, M.J. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: Ed. FUNPEC, 2002. 131p.
- 7- RIBEIRO, L.R. *et al.* Cytogenotoxic effects of ethanolic extracts of *Annona crassiflora* (Annonaceae). Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, p. 433 - 438, 2013.
- 8- ANDRADE-VIEIRA, L.F. *et al.* Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. Anais da Academia Brasileira de Ciências, p. 373-382, 2014.
- 9- FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- 10- SALES, I.M.S.; SANTOS, F.J.S.; PERON, A.P. Citologia de aromatizantes utilizados na fabricação de alimentos industrializados. Caderno de Pesquisa, v 29, n.3, p. 31-38, 2017.
- 11- ISTIFLI, E. S.; HÜSUNET, M. T.; İLA, H. B. Cell Division, Cytotoxicity, and the Assays Used in the Detection of Cytotoxicity. *In*: ISTIFLI, E. S.; İLA, H. B. Cytotoxicity: Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds. 2019. cap. 6.
- 12- MARIN-MORALES, M.A.; LEME, D.M. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. Mutation Research, p. 1-11, 2009.
- 13- BITENCOURT, A.P.R.; ALMEIDA, S.S.M.S. Estudo fitoquímico, toxicológico e microbiológico das folhas de *Costus spicatus* Jacq. Biota Amazônica Open Journal System, Macapá, v. 4, n. 4, p. 75-79, 2014.
- 14- AZEVEDO, L.F.P. *et al.* Triagem fitoquímica e atividade antioxidante de

Costus spicatus (Jacq.) S.w. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Campinas, v. 16, n. 2, p. 209-215, 2014.

15- RIBEIRO, L.R.; BELO, G.A.; MONTEIRO, A.B. Avaliação da Atividade Citogenotóxica e Antimutagênica do Extrato Aquoso de *Bidens Pilosa*. Revista Conexão Ciência, v. 13, n. 4, p. 15-22, 2018.