



PESQUISA

**Avaliação tóxica, citotóxica, mutagênica e genotóxica do látex da Himatanthus sucuuba: uma questão de saúde pública**

Evaluation toxic, cytotoxic, mutagenic and genotoxic latex Himatanthus succuba: a public health issue  
Evaluación tóxicos, citotóxicos, mutagénicos y genotóxicos Himatanthus sucuuba de látex: un problema de salud pública

Márcia Fernanda Correia Jardim Paz<sup>1</sup> Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar<sup>2</sup> Ravena Lis Lima Soares<sup>3</sup>  
Débora de Alencar Franco Costa<sup>4</sup> Amanda Torres Nunes<sup>5</sup> Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante<sup>6</sup>

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito tóxico, citotóxico e mutagênico do látex da *Himatanthus sucuuba*, em *Allium cepa*; e a genotoxicidade “ex vivo”, em linfócitos humanos, com o Teste Cometa. Os linfócitos foram expostos nas concentrações 1g/100ml, 2g/100ml e 3g/100ml. Os bulbos de cebola foram expostos nas concentrações 1g/100ml, 2g/100ml, 3g/100ml e 5g/100ml, 10g/100ml e 20g/100ml do látex e controle positivo (sulfato de cobre). Em 1 e 2g/100ml não apresentaram toxicidade nem citotoxicidade em *Allium cepa*. Entretanto, nas maiores concentrações foram significantes a toxicidade e citotoxicidade. Foi observada significativa mutagenicidade pela frequência de micronúcleos e de aberrações cromossômicas nas concentrações menores. Genotoxicidades foram observadas em linfócitos de homens e mulheres expostos “ex vivo” ao látex da janaguba, apresentando índice de danos significativo, exceto para 1g/100ml em mulheres; e frequência de danos nas concentrações testadas, exceto para 1 e 2mg/100ml femininas. O estudo da mutagenicidade da janaguba pelo uso popular é necessário para prevenção de instabilidade genética, como uma alternativa de importância para a saúde humana. **Descritores:** Janaguba. Citotoxicidade. Genotoxicidade. *Allium cepa*. Teste cometa.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the toxic, cytotoxic and mutagenic effect of latex from the *Himatanthus sucuuba* in *Allium cepa*, and genotoxicity “ex vivo”, in human lymphocytes, with the Comet Test. The lymphocytes were exposed at concentrations 1g/100ml, and 2g/100ml 3g/100ml. The onion bulbs were exposed on concentrations 1g/100ml, 2g/100ml, and 3g/100ml 5g/100ml, and 10g/100ml 20g/100ml latex and positive control (copper sulphate). In one 2g/100ml and showed no toxicity or cytotoxicity in *Allium cepa*. However, the highest concentrations were significant toxicity and cytotoxicity. Significant mutagenicity was observed by the frequency of micronuclei and chromosomal aberrations in lower concentrations. Genotoxicidades were observed in lymphocytes of men and women exposed “ex vivo” janaguba of latex, and showed significant damage, except for 1g/100ml in women, and frequency of damage at the concentrations tested, except for one female and 2mg/100ml. The study of mutagenicity at popular use of janaguba is required for prevention of genetic instability, as an alternative importance for human health. **Descriptors:** janaguba. Cytotoxicity. Genotoxicity. *Allium cepa*. Comet assay.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto tóxico, citotóxico y mutagénico del látex de la *Himatanthus sucuuba* en una cepa de *Allium*, y de la genotoxicidad “ex vivo”, en linfocitos humanos, con el ensayo del cometa. Los linfocitos fueron expuestas a concentraciones 1g/100ml, y 3g/100ml 2g/100ml. Los bulbos de cebolla fueron expuestos en concentraciones 1g/100ml, 2g/100ml y 5g/100ml 3g/100ml y 10g/100ml 20g/100ml látex y control positivo (sulfato de cobre). En una concentración de 2g/100ml no mostró toxicidad o la citotoxicidad en *Allium cepa*. Sin embargo, en las concentraciones más altas la toxicidad y la citotoxicidad fueron significativa. Mutagenicidad significativa fue observada por la frecuencia de micronúcleos y aberraciones cromosómicas en concentraciones más bajas. Genotoxicidades se observaron en Linfocitos de hombres y mujeres expuestos “ex vivo” janaguba de látex, y mostraron un daño significativo, a excepción de 1g/100ml en las mujeres, y la frecuencia de daño a las concentraciones ensayadas, excepto para las mujeres y 2mg/100ml uno. El estudio del uso popular e la mutagenicida de janaguba es necesario para la prevención de la inestabilidad genética, como una alternativa importancia para la salud humana. **Descritores:** Janaguba. Citotoxicidad. Genotoxicidad. *Allium cepa*. Comet ensayo.

R. Interd. v.6, n.1, p.52-61, jan.fev.mar. 2013

1. Biomédica. Mestranda pela Universidade Luterana do Brasil - ULBRA, Canoas - RS. [marciafernanda@uol.com.br](mailto:marciafernanda@uol.com.br) 2. Biomédico pelo Centro Universitário - UNINOVAFAPÍ. Teresina - PI. 3. Biomédica. 4. Bióloga. Mestre em Genética e Toxicologia. Doutoranda em Biotecnologia pela UNICASTELO. Docente da Faculdade Integral Diferencial - FACID e Faculdade Maurício de Nassau. 5. Biomédica. Mestre em Biologia de Fungos/UFPE. Docente e Coordenadora do Curso de Biomedicina do Centro Universitário - UNINOVAFAPÍ. 6. Bióloga. Doutora em Biologia Celular e Molecular/UFRS. Docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPI e do Centro Universitário UNINOVAFAPÍ

## INTRODUÇÃO

A família *Apocynaceae*, conhecida pela presença de alcaloides indólicos, é uma das famílias com maior representatividade dentro das Angiospermas, contribuindo com cerca de 3700 espécies, constituindo expressiva fonte de elementos químicos utilizados na medicina moderna (LIMA, 2005). Conhecida popularmente como janaguba, sucuuba, bellaco caspi, é uma espécie latescente, de grande porte, detentora de casca rugosa, tronco ereto, folhagem glabra, coriácea e de margens inteiras (LARROSA; DUARTE, 2004).

Em estudos anteriores foram isolados, da casca e do látex da janaguba, iridoides fulvoplumierina, plumericina, isoplumericina, ácido confluêntico e ácido metilparlatólico. Estudos farmacológicos sinalizaram que estas substâncias são responsáveis pela atividade antiinflamatória e analgésica, efeito cicatrizante e baixa toxicidade reprodutiva e teratogênica em animais, sugerindo terapêutica segura no tratamento de gastrites e hemorroidas (LARROSA; DUARTE, 2004).

A atividade antifúngica, principalmente para o fungo *Cladosporium shaerospermum*, apresentou halo de inibição satisfatório, apresentando, na porção bioativa, iridoides plumericina 5 e isoplumericina 6 com atividade cinco vezes maior que a observada na droga padrão, o antibiótico nistatina. O seu extrato aquoso inibiu o crescimento de várias linhagens neoplásicas induzidas em camundongos. Diante do uso indiscriminado para diferentes patologias, há registros de que apresenta baixa toxicidade R. Interd. v.6, n.1, p.52-61, jan.fev.mar. 2013

aguda, apresentando margem de segurança para sua utilização (LIMA, 2005). Há relatos, também, em estudos anteriores, do isolamento de ésteres triterpênicos detentores de atividade analgésica e anti-inflamatória; e iridoides com atividade citotóxica e antiparasitária (BARRETO et al., 2007).

A garantia de segurança e eficácia desses medicamentos populares, utilizados mundialmente, é obtida através de biomarcadores, que sinalizam a presença de substâncias citotóxicas/mutagênicas - detectadas durante o ciclo celular - em sua composição ou decorrente do seu metabolismo. O potencial citotóxico/genotóxico das plantas medicinais pode ser monitorado pelo teste *Allium cepa*, validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNE) como um eficiente bioensaio para acompanhamento *in situ* de poluentes genotóxicos (BAGATINI et al., 2007).

Outro teste que está cada vez mais utilizado para detecção de genotoxicidade e biomonitorização humana é o Ensaio Cometa. A sua capacidade para detectar níveis baixos de danos no DNA, a aplicabilidade a diversos tecidos e tipos de células, a exigência de uma amostra pequena, bem como a rapidez de execução do procedimento, garantem ao Ensaio Cometa popular (SPEIT et al., 2008).

Considerando o uso indiscriminado da janaguba pela população e poucos registros na literatura, utilizou-se os testes *Allium cepa* e Cometa para avaliar possíveis atividades tóxica, citotóxica, mutagênica e genotóxica e, assim, ampliar o leque científico.

**METODOLOGIA**

Esta pesquisa científica tratou-se de um trabalho descritivo experimental seguindo metodologia com testes padronizados internacionalmente. Neste estudo, manipulou-se variáveis independentes. Células sanguíneas de humanos expostos *ex vivo* ao látex da *Himatanthus sukuuba* em 3 concentrações (C<sub>1</sub> 1g/100ml, C<sub>2</sub> 2g/100ml e C<sub>3</sub> 3g/100ml) para avaliação genotóxica, através do Teste Cometa. E, para avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica, no sistema *Allium cepa*, a exposição foi feita em 6 concentrações (C<sub>1</sub> 1g/100ml, C<sub>2</sub> 2g/100ml, C<sub>3</sub> 3g/100ml, C<sub>4</sub> 5g/100ml, C<sub>5</sub> 10g/100ml e C<sub>6</sub> 20g/100ml).

Tendo em vista o experimento *ex vivo* em células humanas, este projeto foi submetido ao Comitê de Ética da Faculdade NOVAFAPI, antes de sua execução, sendo aprovado conforme protocolo 0365.0.043.000-10.

**População e amostra**

Folhas e flores de janaguba foram coletadas na Fazenda Petrolina, município de Campo Maior - PI, em agosto de 2010, para confecção de exsiccatas, conforme instrução do Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí - UFPI, com a finalidade de determinar a espécie do gênero *Himatanthus* em estudo. A identificação está registrada com o número 27.180 pela referida instituição.

Posteriormente à identificação da espécie, coletou-se amostra do látex da janaguba para exposição ao *Allium cepa*. Após incisão no caule, com auxílio de um instrumento cortante, previamente autoclavado, a amostra começou a verter da região seccionada e foi coletada com uma colher, também autoclavada. O material foi acondicionado em placas de petri, que

R. Interd. v.6, n.1, p.52-61, jan.fev.mar. 2013

*Avaliação tóxica, citotóxica...*

permaneceram na geladeira até a preparação das concentrações expostas ao *Allium cepa*. No transporte da fazenda Petrolina, município de Campo Maior, até o Laboratório de Biomedicina da Faculdade NOVAFAPI, em Teresina-PI, onde foi executado o Teste *Allium cepa*, as amostras foram acondicionadas em isopor.

Em seguida, coletou-se 12 amostras de sangue de voluntários, após assinarem um Termo de Consentimento Livre Esclarecido, para realização do Teste Cometa.

A Clínica de Biomedicina da Faculdade de Saúde, Ciências Humanas e Tecnológicas do Piauí - NOVAFAPI serviu de suporte para realização dos experimentos. Os procedimentos foram realizados nos laboratórios desta IES, de acordo com a disponibilidade de horários dos mesmos.

**Teste *Allium cepa***

Para realização deste teste foram obedecidas às premissas do protocolo de Fiskesjo (1985), que se baseia na exposição de bulbos de cebola às concentrações testadas com cinco repetições cada uma do extrato aquoso da janaguba ((C<sub>1</sub> - 1g/100ml, C<sub>2</sub> - 2g/100ml, C<sub>3</sub> - 3g/100ml, C<sub>4</sub> - 5g/100ml, C<sub>5</sub> - 10g/100ml, C<sub>6</sub> - 20g/100ml), sendo que C<sub>7</sub> foi usado como controle negativo com adição apenas de água da torneira; e C<sub>8</sub> como controle positivo utilizando sulfato de cobre. Após 48 horas, as raízes foram removidas e fixadas em uma solução contendo três partes de álcool e uma de ácido acético, Carnoy, por 24h.

As lâminas foram preparadas após lavar as raízes em três banhos de cinco minutos cada para retirar o fixador do material; realização da hidrólise das raízes em solução com 1N HCL por onze minutos; banho com água destilada à temperatura ambiente. Nessa etapa, os meristemas foram colocados em vidro contendo HCL 1N. Em seguida, com auxílio de uma pinça, as raízes foram secas em papel filtro com atenção

para não encostar, no papel, a região meristemática. Na sequência, transferiu-se as raízes para frascos escuros (âmbar) contendo reativo de Schiff, também conhecido como Feugen, um corante à base de fucsina básica, por 2h, aproximadamente. Na etapa seguinte, lavou-se as raízes em água corrente para retirada total do corante, uma vez que quanto mais límpida sair a água da lavagem, maior será a reatividade do Schiff e, conseqüentemente, melhor coloração o material genético terá. As raízes foram colocadas sobre uma lâmina e, com auxílio de um estilete, seccionou-se a região meristemática. A este material, acrescentou-se uma gota de carmim acético 2%, cobriu-se com lamínulas e pressionou-se com um lápis para distribuir o material seccionado. Na análise que foi realizada com aumento de 400X, contou-se 2000 células por lâmina.

Os resultados foram avaliados por meio de teste estatístico com objetivo de comparar os grupos testes com o controle. Para tanto, utilizou-se o programa Graphpad Prism 4.0 com análise de variância (ANOVA) e aplicação do Teste de Dunnett's.

### Teste Cometa

Para realização deste ensaio foram coletados 5 ml de sangue de 06 indivíduos do sexo masculino e 06, do sexo feminino. Esta população-alvo, consciente da pesquisa, assinou um Termo de Consentimento Livre Esclarecido, antes da realização do procedimento, que foi realizado no laboratório da Clínica de Biomedicina da Faculdade NOVAFAP, por venepuncture em seringas heparinizadas obedecendo ao protocolo, de acordo com as premissas de Tice et al. (2000). A metodologia se fundamenta na disposição de uma suspensão de leucócitos extraídos com Ficoll, após realização de coleta da amostra sanguínea. Em seguida, foi feita a exposição *ex vivo* de 100 µl R. Interd. v.6, n.1, p.52-61, jan.fev.mar. 2013

### Avaliação tóxica, citotóxica...

de leucócitos ao látex da janaguba nas menores concentrações utilizadas no *Allium cepa* ((C<sub>1</sub> - 1g/100ml, C<sub>2</sub> - 2g/100ml, C<sub>3</sub> - 3g/100ml), durante 1 hora. Após esta etapa, foram feitas duas lavagens e do produto final foram pipetados 5 µl e colocados em lâminas pré-gelatinizadas com agarose normal e acrescentado 95 µl de agarose Low Melting. Em seguida, as lâminas foram transferidas para uma solução com alta concentração de sais e detergentes com a finalidade de lisar as células para remover o conteúdo citoplasmático e membrana nuclear. Posteriormente, as lâminas foram imersas em um tampão de pH alcalino (>13), durante 25 minutos. Este processo visa o desenovelamento das cadeias de DNA pelo rompimento das estruturas, secundária e terciária, presentes no núcleo celular. Após o desenovelamento, as lâminas foram submetidas a uma corrente elétrica, Eletroforese, que induziu a migração dos fragmentos de DNA no sentido da corrente elétrica, durante 25 minutos, a 25 volts. As lâminas foram coradas com nitrato de prata e o material foi analisado por um único observador com a finalidade de manter uniformidade no estudo. Utilizou-se a objetiva de 40 X para avaliação de uma possível genotoxicidade através da extensão da cauda, cujo tamanho obedeceu às classes de zero a quatro, formada pela migração do material genético. Os resultados foram avaliados por meio de teste estatístico com objetivo de comparar os dois grupos: expostos e não expostos no Ensaio Cometa. Para tanto, utilizou-se o programa Graphpad Prism 4.0 com análise de variância (ANOVA) e aplicação do Teste de Dunnett's. E, para comparar todas as concentrações entre si, utilizou-se o teste Tukey's.

### Aspectos Éticos

Este estudo respeita o disposto na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde,



considerando seus princípios de autonomia, não maleficência, beneficência e justiça. O projeto só foi iniciado após aprovação pelo Comitê de Ética da instituição NOVAFAPI.

Análise Estatística

A avaliação estatística do *Allium cepa* foi realizada com o programa Graphpad Prism 4.0 com análise de variância (ANOVA) e aplicação do Teste de Dunnett’s para comparar os grupos testes com o controle. No teste Cometa, o estudo das classes de danos em relação ao sexo nas diferentes concentrações foi realizado pelo teste de Tukey’s com significância para \*\*\*P<0,0001 da classe 0 em relação às demais classes, para o sexo masculino e feminino.

RESULTADOS

O resultado da toxicidade do látex da *Himatanthus sucuuba*, avaliada pelo teste *Allium cepa* através da inibição do crescimento das raízes, tamanho e forma das raízes, turgescência e alteração na cor, está apresentado na Tabela1. A janaguba, na maioria das concentrações testadas, inibe os crescimentos de meristemas de raízes de *Allium cepa* expostas ao seu látex, indicando atividades tóxicas dose-dependentes. Nas maiores concentrações, a janaguba pôde inibir o crescimento de raízes em mais de 60 %, chegando, na maior concentração testada, em quase 80 % de inibição de crescimento.

A citotoxicidade, através da inibição da divisão celular, em meristemas de raízes de *Allium cepa*, foi observada, após exposição ao látex da janaguba, mostrada pela inibição do índice mitótico. Nas duas maiores concentrações, a inibição foi acima de 75 %. Não ocorreu significância entre os percentuais das duas

Avaliação tóxica, citotóxica...

maiores concentrações, apesar da maior inibição observada para a concentração de 10 g/ml.

Tabela 1. Toxicidade e citotoxicidade da *Himatanthus sucuuba* (janaguba) em meristemas de raízes de *Allium cepa*, avaliadas pela inibição de crescimento de raízes e do índice mitótico no sistema *Allium cepa*.

| Tratamentos | Crescimento de Raízes (cm) <sup>1</sup> | Inibição de Crescimento (%) | Índice Mitótico (IM) | Inibição da Divisão Celular (%) |
|-------------|-----------------------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------------------|
| CN          | 0,58 ± 0,16                             | -                           | 10,91 ± 0,78         | -                               |
| CP          | 0,29 ± 0,18***                          | 50                          | 1,50 ± 0,45***       | 86,25                           |
| 1 g/mL      | 0,50 ± 0,12                             | 13,79                       | 9,00 ± 1,13          | 17,50                           |
| 2 g/mL      | 0,46 ± 0,19                             | 20,68                       | 8,25 ± 0,07          | 24,38                           |
| 3 g/mL      | 0,43 ± 0,22**                           | 25,86                       | 7,25 ± 1,78*         | 33,54                           |
| 5 g/mL      | 0,19 ± 0,08***                          | 67,24                       | 7,02 ± 1,94*         | 35,65                           |
| 10 g/mL     | 0,18 ± 0,08***                          | 68,96                       | 2,67 ± 0,53***       | 75,52                           |
| 20 g/mL     | 0,12 ± 0,03***                          | 79,3                        | 4,20 ± 0,01**        | 61,50                           |

CN (Controle Negativo); CP (Controle Positivo) <sup>1</sup>Média ± Desvio padrão. ANOVA, Teste de Dunnett’s. Significância para P<0,001 e P<0,01 em relação ao CN (Toxicidade). Significância para P<0,05; P<0,001 e P<0,0001 em relação ao CN (Citotoxicidade).

A avaliação da mutagenicidade, obtida pela frequência de micronúcleos e aberrações cromossômicas no látex da *Himatanthus sucuuba*, exposto a diferentes concentrações, está apresentada na (Tabela 2). A frequência de micronúcleos apresentou significância para p<0,05; p<0,001 e p<0,0001 em relação ao controle negativo nas concentrações C1 (1g/100ml) e C2 (2g/100ml).

Tabela 2. Mutagenicidade da *Himatanthus sucuuba* (janaguba) em meristemas de raízes de *Allium cepa*, avaliada pela frequência de MN e AC no sistema *Allium cepa*.

| Tratamentos | MN/2000 células <sup>1</sup> | % MN         | AC/2000 células <sup>1</sup> | % AC           |
|-------------|------------------------------|--------------|------------------------------|----------------|
| CN          | 0,75 ± 0,25                  | 0,07 ± 0,02  | 1,5 ± 0,70                   | 0,15 ± 0,07    |
| CP          | 5,7 ± 2,3***                 | 0,57 ± 0,23  | 8,00 ± 1,41***               | 0,80 ± 0,14*** |
| 1 g/mL      | 5,12 ± 1,88***               | 0,512 ± 0,18 | 5,50 ± 0,70**                | 0,50 ± 0,07**  |
| 2 g/mL      | 2,25 ± 1,9***                | 0,25 ± 0,19  | 5,50 ± 0,70**                | 0,50 ± 0,07 ** |
| 3 g/mL      | 0,87 ± 0,29 <sup>2</sup>     | 0,08 ± 0,02  | 1,50 ± 0,70 <sup>2</sup>     | 0,15 ± 0,07    |
| 5 g/mL      | CTC                          | -            | CTC                          | CTC            |
| 10 g/mL     | CTC                          | -            | CTC                          | CTC            |
| 20 g/mL     | CTC                          | -            | CTC                          | CTC            |

CN (Controle Negativo); CP (Controle Positivo) <sup>1</sup>Média ± Desvio padrão. ANOVA, Teste de Dunnett’s. Significância para P<0,05; P<0,001 e P<0,0001 em relação ao CN. CTC (concentração tóxica e citotóxica); <sup>2</sup>Concentração com indicativo de CTC.

As concentrações C3 (3g/100ml), C4 (5g/100ml), C5 (10g/100ml) e C6 (20g/100ml) apresentaram toxicidade e citotoxicidade, logo não foi possível avaliar a frequência de

micronúcleos. De forma similar, a mutagenicidade, que foi observada pelo aumento de aberrações cromossômicas, resultantes de danos no DNA.

O perfil fotomicrográfico de micronúcleos e aberrações cromossômicas nas concentrações C1, C2 e C3 do látex da janaguba exposto ao *Allium cepa* está apresentado na Figura 1.

Figura 1: Perfil fotomicrográfico de micronúcleos e aberrações cromossômicas

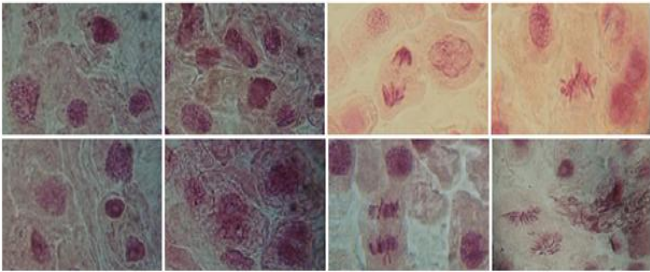


Figura 1 - O perfil fotomicrográfico de micronúcleos nas concentrações 1g/100ml, 2g/100ml e 3g/100ml; e aberrações cromossômicas nas concentrações 1g/100ml e 2g/100ml do látex da *Himatanthus sucuuba* (janaguba) exposto ao *Allium cepa*.

A genotoxicidade da *Himatanthus sucuuba* foi observada em linfócitos isolados de sangue periférico de homens e mulheres, expostos *ex vivo* ao látex pelo significativo ( $p<0,05$ ;  $p<0,001$  e  $p<0,0001$ ) pelo aumento do índice de danos em todas as concentrações testadas, exceto para C1, em mulheres. Entretanto, nas análises das frequências de danos, a genotoxicidade foi confirmada para todas as concentrações testadas em homens; e somente para C3, em mulheres (Tabela 3).

Tabela 3 - Genotoxicidade “*ex vivo*” da *Himatanthus sucuuba* (janaguba) em linfócitos de sangue periférico dos sujeitos femininos e masculinos, avaliada com o Teste Cometa.

| Grupos              | Índice de danos (0-400)     |                              | Frequência de Danos (0-100 %) |                            |
|---------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| CN                  | 14,26 ± 4, 69<br>(8- 20)    |                              | 10,46 ± 2,18<br>(8-15)        |                            |
| CP                  | 157,7 ± 35,31<br>(109 -211) |                              | (100 ± 26,05)<br>(70-100)     |                            |
|                     | Feminino                    | Masculino                    | Feminino                      | Masculino                  |
| Janaguba (1g/100mL) | 40,75±25,00<br>(6 – 64)     | 5,33±22,86**<br>(65-97)      | 27,80±10,15<br>(4-54)         | 67,00±12,41***<br>(45-77)  |
| Janaguba (2g/100mL) | 92,2±61,76**<br>(20- 143)   | 107,00±17,48***<br>(84- 105) | 35,40±14,19<br>(3 -70)        | 68,00±8,68***<br>(60-80)   |
| Janaguba (3g/100mL) | 73,60±52,10*<br>(14-81)     | 105,00±30,28**<br>(75-100)   | 47,80±27, 8*<br>(10- 73)      | 72,50±18,93***<br>(60-100) |

CN (controle negativo); CP (exposição a solução de peróxido de hidrogênio 135 µL/mL). Significância para  $P<0,05$ ,  $P<0,001$  e  $P<0,0001$  em relação ao CN. ANOVA (teste Dunnett's).

Avaliação tóxica, citotóxica...

As classes de danos em relação ao sexo, nas diferentes concentrações, apresentaram maior significância para o sexo masculino (Figura 2).

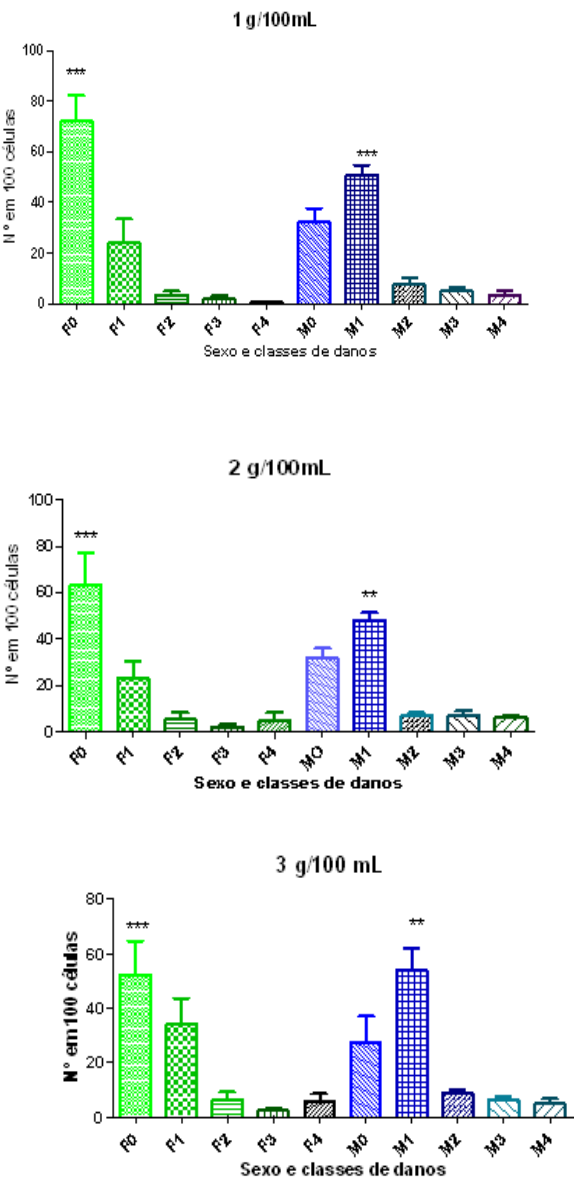


Figura 2 - Estudo das classes de danos em relação ao sexo nas diferentes concentrações. Significância para \*\*\* $P<0,0001$  da classe O em relação às demais classes, para o sexo masculino e feminino. Significância para \*\* $P<0,001$  da classe 1 em relação às demais classes para o sexo masculino. ANOVA (teste Tukey's).

DISCUSSÃO DOS DADOS

A *Himatanthus sucuuba* é fonte terapêutica, na medicina popular, como antitumoral, anti-inflamatória, antifúngica, vermífuga, antianêmica, anti-hipertensivas, antiúlceras, no tratamento de hemorroidas e de afecções de pele. No entanto, as plantas que são detentoras de princípios ativos capazes de curar, também podem interagir, no organismo,

provocando instabilidade genética em consequência de danos acumulativos ou não no DNA (WOOD et al., 2001).

A exposição do homem a agentes físicos, químicos e biológicos proporcionou a aquisição de instabilidades genéticas que podem resultar em danos no DNA e, conseqüentemente, neoplasias. Desta forma, fitoquímicos continuam a fornecer estruturas para a indústria de quimioterápicos na expectativa de solucionar doenças num mundo onde tem-se espectro de resistência a antibióticos, doenças infecciosas e cânceres (SETZER; SETZER, 2003).

O teste *Allium cepa* é realizado em um organismo eucariótico complexo, nas espécies do gênero *Allium* e fundamenta-se na avaliação de toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade de agentes químicos em amostras de resíduos, solo e efluentes, que indiquem a presença de poluentes ambientais tendo sido usado pela Agência de Proteção Ambiental (USEPA). Toxicidade é facilmente medida pela observação da inibição do crescimento de raízes do *Allium cepa*; e a mutagenicidade pode ser correlacionada com a taxa de quebras cromossômicas cujo risco pode ser avaliado pela frequência de quebras de cromossomos induzidas por vários tratamentos (FISKESJÖ, 1994).

Neste estudo, com a aplicação do teste *Allium cepa*, a toxicidade da janaguba foi observada pela inibição do crescimento das raízes do *Allium cepa* em exposição ao látex da janaguba, nas maiores concentrações. Muitos trabalhos de comparação entre sistemas-teste vegetais vêm sendo realizados por diversos autores e a maioria tem mostrado uma maior sensibilidade de *Allium cepa* em relação a outras plantas superiores utilizadas como organismos-teste, como, por exemplo, a espécie *Vicia Faba* (MIGID et al., 2007), e de que os resultados obtidos, nesse sistema, podem ser correlacionados com outros. R. Interd. v.6, n.1, p.52-61, jan.fev.mar. 2013

biomarcadores de genotoxicidade. Em estudos sobre atividade cicatrizante, em camundongos, com administração de 1mg de extrato por grama de peso do látex da janaguba, resultados também indicaram não toxicidade. Entretanto, esse mesmo grupo de pesquisa, através de cromatografia, isolou uma lactona, conhecida como iridoide plumericina, responsável por danificar o DNA, inibindo em 50% células neoplásicas em G1 (WOOD et al., 2001).

De forma similar ao observado para toxicidades, a citotoxicidade da janaguba também foi observada, para as maiores concentrações testadas. Estudos em outros sistemas testes com o uso de biomarcadores de citotoxicidade da janaguba apontam para atividade antiparasitária do seu látex para as formas amastigotas de *Leishmania amazonenses*, causador da leishmaniose cutânea, com inibição de sobrevivência dose-dependente (SOARES et al., 2010). Lima (2008), em ensaio realizado com linhagens leucêmicas, utilizando extrato de *Himatanthus lancifolius*, obteve efeitos citostáticos significativos, independente da origem linfóide ou mielóide da leucemia. Nesta mesma espécie do gênero *Himatanthus*, foi isolado o alcaloide uleína, um inibidor de acetilcolinesterase (AChE). Substâncias com estas características são utilizadas no tratamento de Alzheimer (SEIDL et al., 2010).

A toxicidade e citotoxicidade observadas (Tabela 1) em meristemas de raízes de *Allium cepa* podem, provavelmente, ser explicadas, pelos componentes químicos presentes na mistura complexa do látex da janaguba. Efeitos antifúngicos, devido à citotoxicidade foram observados para *Cladosporium shaerospermum*, graças aos iridóides plumericina 5 e isoplumericina 6. Além desse aspecto, o ácido confluênico 28, isolado de extrato metanólico da janaguba, é um inibidor seletivo da enzima monoaminaoxidase B (MAO-B). Cabe também enfatizar que a janaguba

apresenta efeito antitumoral relacionado à fração bioativa composta pelo iridoide plumericina 5 (LIMA, 2005). Estudos de avaliações de riscos em misturas complexas são de difíceis entendimentos sobre os químicos que a compõem no sentido da identificação de compostos que tenham efeitos tóxicos e /ou genotóxicos, devido aos efeitos antagônicos e/ou e sinérgicos dos compostos presentes na mistura (ERGENE et al., 2007).

Ainda no sistema *Allium cepa*, foi possível apontar efeitos mutagênicos, pelo aumento nas frequências de micronúcleos e de aberrações cromossômicas (Tabela 2) para as menores concentrações (1g/100ml e 2g/100ml), pois, provavelmente, devido à alta toxicidade e citotoxicidade evidenciadas nas maiores concentrações (3g/100ml, 5g/100ml, 10g/100ml e 20g/100ml) essa atividade não pôde ser observada. Esses dados sugerem que o látex da janaguba tem atividades clastogênicas e aneugênicas. Para Salvadori et al., (2008), os micronúcleos são marcadores biológicos de danos genéticos, sinalizadores de mutagenicidade, que podem servir como ferramenta de monitorização. O mesmo autor ainda relata que apesar da presença de micronúcleos ser um processo natural, a exposição a agentes mutagênicos pode aumentar sua frequência.

Os linfócitos isolados de sangue periférico são usados para determinar os efeitos dos mutágenos baseados em marcadores citogenéticos tais como as aberrações cromossômicas, micronúcleos, quebras de cromátides irmãs e Teste Cometa. Entretanto, vários estudos prévios mostram diferenças nas respostas aos mutágenos em linfócitos humanos (WENG; MARIMOTO, 2009).

O Ensaio Cometa é uma técnica consolidada para mensurar e analisar as lesões e detectar efeitos de reparo no DNA em células individuais expostas a agentes genotóxicos (TICE et al., 2000). Nos estudos realizados para R. Interd. v.6, n.1, p.52-61, jan.fev.mar. 2013

avaliação da genotoxicidade da janaguba, o teste Cometa foi aplicado em linfócitos de sangue periférico de homens e de mulheres com a exposição “ex vivo” ao látex da janaguba. A genotoxicidade foi evidenciada pelo aumento do índice de danos em todas as concentrações testadas, exceto para as concentrações 1g/100ml, do sexo feminino (Tabela 3). Em relação à frequência de danos, a genotoxicidade foi confirmada para o sexo masculino em todas as concentrações testadas; e, para o feminino, apenas para a concentração 3g/100ml (Tabela 3). Entretanto, existem relatos de diferenças em respostas para mutagenicidades entre gêneros, especialmente para micronúcleos e aberrações cromossômicas, indicando uma maior susceptibilidade para o sexo feminino (BATTERSHILL et al., 2008). Mas, significantes análises feitas por Neri et al., (2006) não encontraram diferenças para gêneros. No entanto, neste estudo, as classes de danos em relação ao sexo, nas diferentes concentrações, apresentaram maior significância para o sexo masculino (Figura 2).

Em experimento para verificar o potencial anticancerígeno da *Himatanthus suluuba*, Wood et al., (2001) utilizaram no ensaio leveduras de engenharia e verificaram que o extrato da janaguba inibiu a levedura mutante atribuindo tal fato à plumericina, responsável por danificar o DNA.

Os danos mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos alcali-lábeis, *crosslinks* e quebras resultantes de reparo por excisão. Este teste pode ser utilizado para qualquer tipo de células (qualquer tecido que possibilite a extração de células nucleadas), sendo necessário apenas um pequeno número das mesmas e não requerer células em divisão (TICE et al., 2000). Entretanto, a versão alcalina, usada



neste estudo, pode também detectar quebras simples e duplas e sítios alcali-lábeis, o que pode levar às alterações cromossômicas resultando num evento inicial para a carcinogênese e outras doenças genéticas. As quebras duplas são as lesões genotóxicas mais significantes e podem aumentar as quebras e reagrupamentos de cromossomos, bem como mutagênese e perda da informação genética. Lesões que ocorrem durante a replicação, em fitas simples, podem ser transformadas em quebras duplas, por deficiência em reparo de DNA (FORCHHAMMER et al., 2010).

CONCLUSÃO

Em síntese, o presente estudo demonstrou que o látex da janaguba, em algumas concentrações testadas, pode ser considerado como uma mistura complexa de químicos com atividades tóxicas, citotóxicas e mutagênicas, pela frequência de micronúcleos e de aberrações cromossômicas em meristemas de raízes de *Allium cepa*, devido a efeitos clastogênicos e aneugênicos. Entretanto, estudos devem ser realizados para sua melhor caracterização fitoquímica e extração de substâncias bioativas para genotoxicidade e mutagenicidade. Também foi possível evidenciar genotoxicidade em linfócitos isolados de sangue periférico, pelos índices e frequências de danos ao DNA, com a aplicação “ex vivo” da versão alcalina do Teste Cometa, sugerindo, caso não ocorra reparo, a indução de mutações, que constituem importantes indicativos para o desenvolvimento de neoplasias malignas. Assim, diante dos resultados apresentados, sugere-se mais cautela para o uso indiscriminado do látex da janaguba, na medicina popular, em benefício da saúde pública da população, bem como, para a prevenção de instabilidades genéticas e desenvolvimento do câncer.

R. Interd. v.6, n.1, p.52-61, jan.fev.mar. 2013

REFERÊNCIA

BAGATINI, M. et al. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev. bras. farmacogn.** João Pessoa, v. 17, n. 3, p. 444-447.jul./set. 2007.

BARRETO, A. S. et al. Ácido 15-desmetilisoplumierídeo, um novo iridóide isolado das cascas de *Plumeria rubra* e do látex de *Himatanthussucuuba*. **Quím Nova.** São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1333-1135, out. 2007.

BATTERSHILL, J. M. et al. Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitorin. **Mutagenesis.** London, n. 23, n. 6, p. 423-437, nov. 2008.

ERGESE, S. et al. Genotoxicbiomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. **Environment International.** Mersin, v. 33, n. p. 877-885, oct. 2007.

FISKESJÖ, G. *Allium* Test II: Assesmente of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa*L. **Environmental Toxicology and Water Quality.** v. 9, n. 3, p. 235-241, aug. 1994.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as standard in environmental monitoring. **Hereditas.** v. 102, p. 99-112, mar. 1985.

FORCHHAMMER, L. et al. Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAGy inter-laboratory validation trial. **Mutagenesis.** v. 25 n. 2 p. 113-123, nov. 2010.

LARROSA, C. R. R; DUARTE, M. R. Morfoanatomia de folhas de *Himatanthussucuuba*. **Acta Farm. Bonaerense.** Curitiba, v. 24, n. 2, p. 165-71, dez. 2004.

LIMA, M. P. Influência dos Extratos de *Casearia sylvestris*, *Bauhiniamicrostachya*, *RauvolfiasellowiieHimatanthuslancifoliussobre* o comportamento de células HL-60, K-562, DAUDI e REH. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Submissão: 18.09.2012

Aprovação: 13.01.2013

LIMA, V. B. Estudo fitoquímica de *Himatanthusobovatus* (Muell. Arg.) Woodson (APOCYNACEAE): isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica. 2005. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

MIGID, A.H.M.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 66, n. 1, p. 57-64, dec. 2007.

NERI, M. et al. Prognostic role of K-Ras mutations in non-small cell lung cancer: Still an issue for open debate. **Lung Cancer**. v. 53, n. 3, p. 393-395, set. 2006.

SALVADORI, D. M. F. et al. Effect of beta-carotene on clastogenic effects of mitomycin C, methyl methanesulfonate and bleomycin in CHO cells. **Mutagenesis**. London, v. 9, n. 1, p. 53-57, jan. 2008.

SEIDL, et al. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Uleine from *Himatanthuslancifolius*. **Journal of Biosciences**. v. 65, n. 8, p. 440-444, jul./aug. 2010.

SETZER, W. N.; SETZER, M. C. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. **EUA. Mini Rev Med Chem**. v. 3, n. 6, p. 540-556, set. 2003.

SOARES, et al., Leishmanicidal activity of *Himatanthussucuubalátex* against *Leishmaniaamazonensis*. **Parasitology International**. v. 59, n. 2, p. 173-177, jun. 2010.

SPEIT, G. et al. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. **Mutation Research**. v. 681, n. 1, p. 3-12, jan./fev. 2008.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/Comet assay; guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

WENG, H.; MORIMOTO, K. Differential responses to mutagens among human lymphocyte subpopulations. **Mutation Research**. v. 672, n. 1, p. 1-9, jan. 2009.

WOOD, L. K. et al., A bioactive spirolactoneiridoid and triterpenoids from *Himatanthussucuuba*. **Chem Pharm Bull**. v. 49, n. 11, p. 1477-1478, nov. 2001.

R. Interd. v.6, n.1, p.52-61, jan.fev.mar. 2013