

## Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 12 (4)

August 2019

Article link

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=743&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



## Avaliação do efeito genotóxico da solução aquosa de *Illicium verum* com uso dos biotestes *Pisum sativum* L. e *Allium sativum*

### Evaluation of the genotoxic effect of the aqueous solution of *Illicium verum* with the use of the biotestes *Pisum sativum* L. and *Allium sativum*

S. M. Alves<sup>1</sup>, T. N. Queiroz<sup>1</sup>, N. T. da Silva<sup>1</sup>, P. N. Nascimento<sup>1</sup>, I. V. Karsburg<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Estado de Mato Grosso

Author for correspondence: [stephaniemarielalves@gmail.com](mailto:stephaniemarielalves@gmail.com)

**Resumo.** Produtos naturais têm sido muitos utilizados pela população em todo o mundo. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o efeito genotóxico de *Illicium verum* sobre o ciclo celular de *Pisum sativum* L. e *Allium sativum*. Para o preparo das infusões, os frutos secos foram adquiridos no comércio local no município de Alta Floresta, Mato Grosso, foram preparados quatro tratamentos em quatro concentrações para 200mL de água destilada: 1,5g, 3,0g, 4,5g, 6,0g, além de um controle positivo composto por 40 gotas de paracetamol, e de um controle negativo composto por água destilada. Após período de 24, 48 e 72 horas, as radículas foram coletadas das infusões, fixadas em metanol-ácido acético (3:1) por 24 horas. Foram analisadas células em todas as fases do ciclo celular, totalizando 3000 células, para cada grupo de tratamentos. Os índices mitóticos (IM) foram calculados e submetidos à análise de variância e ao teste Scott Knott a 5%. Os resultados mostraram que, nas amostras *P. sativum* e *Allium sativum* com controle negativo não houve anomalia. Obteve-se aumento dos índices mitóticos em função do aumento da concentração das infusões. Ocorrendo anomalias cromossômicas nas raízes de *P. sativum*, porém o *A. sativum* foi menos sensível na detecção de anomalias. Concluiu-se que as infusões de *I. verum*, nas concentrações estudadas, possuem efeito antiproliferativo e mutagênico sobre o ciclo celular de *P. sativum*.

**Palavras-chaves:** Anis estrelado; Genotoxicidade; Índice mitótico.

**Abstract.** Natural products have been widely used by the population around the world. The objective of this research was to evaluate the genotoxic effect of *Illicium verum* on the cell cycle of *Pisum sativum* L. and *Allium sativum*. In order to prepare the infusions, the dried fruits were purchased in the local commerce in the municipality of Alta Floresta, Mato Grosso, four treatments were prepared in four concentrations for 200mL of distilled water: 1,5g, 3,0g, 4,5g, 6,0g, plus a positive control composed of 40 drops of paracetamol, and a negative control composed of distilled water. After 24, 48 and 72 hours, the radicles were collected from the infusions, fixed in methanol-acetic acid (3:1) for 24 hours. Cells were analyzed at all stages of the cell cycle, totalizing 3000 cells, for each treatment group. Mitotic indexes (MI) were calculated and submitted to analysis of variance and the Scott Knott 5% test. The results showed that in the samples *P. sativum* and *Allium sativum* with negative control there was no anomaly. Mitotic indices increased as a result of the increased concentration of infusions. Chromosomes anomalies occurring in the roots of *P. sativum*, but *A. sativum* was less sensitive in the detection of anomalies. It was concluded that the infusions of *I. verum*, in the concentrations studied, have an antiproliferative and mutagenic effect on the cell cycle of *P. sativum*.

**Keywords:** Star anise; Genotoxicity; Mitotic index.

## Introdução

Os produtos naturais desempenham um papel promissor no tratamento e prevenção de várias doenças em todo o mundo. Muitas das

drogas modernas disponíveis em uso clínico de hoje são de origem natural. Apesar das profundas vantagens terapêuticas que algumas plantas medicinais possuem, alguns constituintes de plantas

medicinais são potencialmente tóxicos, mutagênicos, cancerígenos e teratogênicos. Isso gera preocupação com os potenciais efeitos tóxicos resultantes do uso a curto e em longo prazo de tais plantas. Portanto, a avaliação dos efeitos toxicológicos de qualquer extrato herbáceo destinado a ser utilizado em seres humanos é de extrema importância (Ping et al., 2012).

Substâncias aromatizantes são compostos aromáticos voláteis de alimentos e especiarias que emitem um aroma durante o cozimento e o processamento. O anis estrelado é uma dessas especiarias, possui origem chinesa, um fruto da planta *Illicium verum* possui de 5 a 8% de óleo essencial volátil e é amplamente utilizado como condimento e perfumaria, o mesmo possui forma de estrela de cor castanho avermelhado, consistindo de seis a oito folículos dispostos em espirais (Wang et al., 2011).

A genotoxicidade está interligada com a genética e a toxicologia, os seus indicadores concede a realização da avaliação dos efeitos de exposição ao material genético através da avaliação de alteração gênica, ocorrência de dano no cromossomo ou ao DNA. Desse modo, o estudo desses indicadores possui grande importância na avaliação do potencial de danificação, provocado pela exposição do material (Valente, 2017).

A utilização de bioindicadores possui diversas vantagens por serem organismos eucariotos, (organização cromossômica similar de humanos) é possível estabelecer comparações; avaliação de substâncias isoladas ou em mistura; componentes essenciais de um ecossistema, entre outros (Souza, 2015). O uso de tecidos vegetais (pontas de raízes) para estudo de distúrbios genéticos são métodos de avaliação simples, confiáveis e com menor preço. Através dessa análise pode-se reconhecer e caracterizar aberrações cromossômicas e mutações (Geras'kin et al., 2011)

Devido à utilização de plantas como especiarias, é pertinente a realização de maiores estudos para identificar as possíveis consequências do uso desenfreado de algumas plantas, utilizadas na realização de chás. Em consequência disso, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar o efeito genotóxico do extrato aquoso de *Illicium verum* sobre o ciclo celular de *Pisum sativum* L e *Allium sativum* submetidos a seis diferentes concentrações, verificando o comportamento mitótico em diferentes tempos de exposição.

## Métodos

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética e Cultura de tecidos vegetais e Laboratório Didático I da Universidade Estadual de Mato Grosso (UNEMAT), localizado no município de Alta Floresta/MT (09° 52' 32" latitude Sul e 56° 05' 10" longitude Oeste).

Os organismos testes utilizados foram sementes de ervilha e alho, as *P. sativum* foram semeadas em placas de petri, forradas com papel

filtro e umedecidas com água destilada. As placas de petri foram acondicionadas em câmara de germinação e para cada tratamento utilizou-se dez sementes de ervilha. O alho foi colocado para enraizar em água destilada em câmara de germinação, utilizando 4 bulbos de *Allium sativum* para cada tratamento.

No preparo da infusão foi feito uso de frutos secos adquiridos no comércio local da cidade de Alta Floresta (MT) no período de setembro de 2017. Os frutos secos foram imersos em água fervente, permanecendo em infusão por 10 minutos, o qual foram deixados em temperatura ambiente para esfriar em descanso. As infusões foram preparadas em quatro diferentes concentrações para 200 mL de água destilada em cada concentração.

Após o enraizamento das ervilhas e dos alhos foram submetidos aos tratamentos, com seguintes pesos aproximados de anis estrelado, T1: 1,5g, T2: 3,0g, T3: 4,5g, T4: 6,0g e T5: controle negativo com água destilada e T6: controle positivo com 40 gotas de paracetamol para 200mL de água destilada. Expostos a um período de 24hs, 48hs e 72hs, sempre realizando a troca das infusões diariamente.

Após a realização dos tratamentos, 10 meristemas radiculares foram coletados de cada organismo teste, em seguida os meristemas foram lavados em água destilada, fixados em metanol: ácido acético (3:1) por 24 horas e armazenados no refrigerador para posterior confecção das lâminas.

Para o preparo das lâminas, os meristemas foram retirados da solução fixadora, lavados em água destilada sendo realizadas trocas a cada 10 minutos, em seguida o material foi hidrolizado em HCl 1 N durante 10 minutos. Após isso, as lâminas foram confeccionadas pela técnica de esmagamento de acordo com Guerra e Souza (2002), utilizando-se coranteorceína acética 2%. Para cada tratamento avaliou-se 10 lâminas e em cada lâmina, foram analisadas 300 células aleatoriamente.

No microscópio com aumento de 40x foram analisadas as diferentes fases da divisão celular, observando as células com comportamento normal e as com irregularidades utilizando um microscópio óptico modelo Primo Star Carl Zeiss. As imagens (anomalias) de interesse foram fotografadas com o uso de objetiva de 100X de um microscópio fotômico binocular (Leica ICC 50) acoplado a um computador e no software LAZ EZ V1. 7.0.

O delineamento experimental foi totalmente ao acaso, e os dados encontrados para o índice mitótico e para as anomalias foram transformados em  $\arcsen \sqrt{x/100}$  e submetidos à análise de variância e, para as causas de variação significativas, utilizou-se o teste Scott Knott a 5% de probabilidade pelo programa computacional Genes (Cruz, 2016).

## Resultados e discussão

Os resultados expressos da análise de variância das três características analisadas pode-

se observar que houve diferenças significativas para todas as características (Tabela 1).

Todas as fases mitóticas foram inibidas pela infusão de anis estrelado (*Illicium verum*), ocorrendo aumento no decorrer do tempo em que as raízes ficaram expostas, diferindo estatisticamente dos controles negativo e positivo, tendo assim o indicativo de ocorrência de atividade antiproliferativa das infusões (Tabela 2). Conforme Silva et al. (2009) os compostos alelopáticos possui diversas funções como inibir o crescimento, interferir na divisão celular e ainda alterar a permeabilidade de membranas e na atividade enzimática.

No tratamento de 1,5g o número de células em interfase aumentou, chegando a 285 células, o que indica que os números de células se

reproduzindo diminuíram, abaixando a média do índice mitótico de 9.2% a 4.4%. A ocorrência maior de anomalias para essa concentração ocorreu no período de 48 horas com um total de 28 células (Tabela 2).

A média do índice mitótico para 48hs na concentração de 3,0g foi o maior com 12% com número de anomalias de 37 células, porém diminuindo o índice para 3.7% em 72hs, havendo ocorrência de baixa multiplicação da célula, o número de anomalias aumentou para 81 células, sendo a concentração com maior número de anomalias. No tratamento de 6,0g o índice mitótico aumentou com o decorrer do tempo, com isso também houve acréscimo no número de anomalias encontradas, subindo de 13 para 71 células.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para a interfase, o índice mitótico e as anomalias de raízes de *Pisum sativum* L. expostos aos extratos aquosos de anis estrelado.

FV	GL	QM Interfase	QM índice mitótico	QM anomalias
Tratamentos	13	1953.13 **	0.063319 **	0.054431 **
Média		272.64	0.25	0.13
CV (%)		8.88	51.99	79.10

\*\*Significativo a 1% de probabilidade; ns, não significativo pelo teste F.

Tabela 2. Índice mitótico, anomalias, e a fase de interfase de células de *Pisum sativum* expostas a quatro diferentes tratamentos com anis estrelado durante 24, 48 e 72 horas.

Tratamentos	Interfase	Média (%)	Anomalias
Controle -	271.4 a	9.20 b	0.00 c
1,5g	24hs	269.9 a	9.20 a
	48hs	269.0 a	9.40 a
	72hs	285.6 a	4.40 b
3,0g	24hs	271.3 a	9.30 a
	48hs	260.2 b	12.0 a
	72hs	280.8 a	3.70 b
4,5g	24hs	287.1 a	3.10 b
	48hs	271.6 a	7.70 a
	72hs	274.5 a	7.50 b
6,0g	24hs	290.2 a	2.90 b
	48hs	253.1 b	15.4 a
	72hs	242.3 b	16.5 a
Controle +	290.0 a	2.60 b	22.0 b

Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Normalmente o uso para chás de anis estrelado é utilizado de 1,5 e 3,0g. Na concentração de 4,5g para o período de 24hs o índice mitótico era mais baixos que os demais horários, porém com maior número de anomalias, obtendo anomalias em

todas as fases mitóticas, já para os demais períodos, conforme o índice meiótico aumentavam as anomalias diminuíram.

A citotoxicidade causada pela infusão do anis estrelado ficou demonstrada nas diferentes

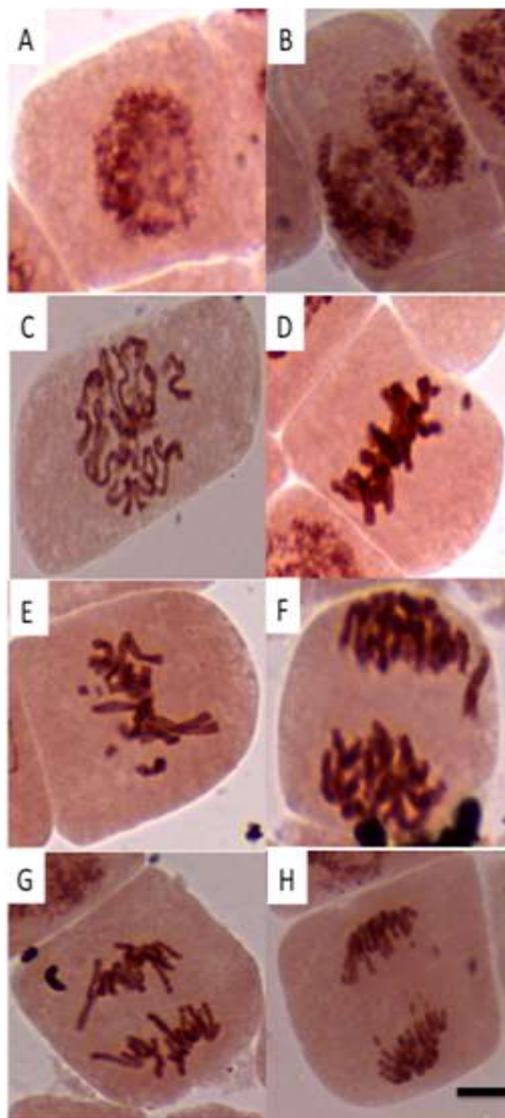
anomalias cromossômicas causadas às células meristemáticas do *P. sativum*. Entre essas anomalias estão: telófase com cromossomo isolado, interfase com micronúcleo, telófase com ponte, anáfase com cromossomo isolado, anáfase com formação de ponte anafásica entre outras (Figura 1).

Em relação ao bioindicador *A. sativum*, os resultados expressos da análise de variância das duas características analisadas, pode-se observar que houve diferenças significativas para todas as características (Tabela 3).

Pode-se observar que os números de índice mitótico na fase de interfase não variaram muito em relação ao tempo de exposição e aos tratamentos. Apresentando uma maior diferença no tratamento 3,0g às 24 horas com 9,8% e no controle negativo com 9,2% percebendo-se um aumento da proliferação celular de *A. sativum* L. (Tabela 4). Foi possível verificar e comprovar a atividade citotóxica pela significativa inibição do ciclo celular das raízes, caracterizando a atividade antiproliferativa.

Iganci et al. (2006) afirmaram que as diferenças nos índices mitóticos podem ser indícios de diferentes ações fisiológicas, isso devido a aplicação do infusos de plantas. Importante relatar que com o uso cada vez mais frequente de plantas medicinais, há necessidade dos estudos de toxicidade, e o teste *A. sativum* é uma das análises para uso de monitoramento da genotoxicidade.

Com relação às aberrações cromossômicas, foram encontradas baixa taxa de anomalias, sendo mais encontrada no controle, não ocorrendo diferenças em comparação aos tratamentos estudados. Segundo Natarajan, (2002) as aberrações cromossômicas são decorrentes de ações genotóxicas de agentes químicos. No entanto o alho se mostrou um bioindicador menos sensível a este extrato quando se trata da presença de anomalias durante a divisão mitótica, diferente do encontrado na ervilha para os mesmos tratamentos.



**Figura 1** – Células mitóticas de *Pisum sativum* obtidas da exposição de infusão de anis estrelado. A) interfase com micronúcleo. B) interfase binucleada com micronúcleo. C) prófase com cromossomo isolado. D) metáfase com cromossomos isolado. E) Metáfase em C com cromossomo e fragmento de satélite isolado. F) telófase com cromossomo isolado. G) telófase com formação de dois blocos de cromossomos em um dos polos. H) telófase com polos de cromátides desiguais com cromossomo isolado. Barra = 10µM.

**Tabela 3.** Resumo da análise de variância para a interfase e o índice mitótico de raízes de *Allium sativum* L. expostos aos extratos aquosos de anis estrelado.

FV	GL	QM Interfase	QM índice mitótico
Tratamentos	13	9033,69**	0,087 **
Média		290,02	0,12
CV (%)		4,67	86

\*\*Significativo a 1% de probabilidade; ns, não significativo pelo teste F.

Tabela 4: Índice mitótico (média) e a fase de interfase de células de *Allium sativum* L. expostas a quatro diferentes tratamentos com anis estrelado durante 24, 48 e 72 horas.

Tratamentos	Interfase	Média (%)
Controle -	275,3 c	9,2 a
1,5g	24hs	281,7 b
	48hs	288,5 a
	72hs	298,4 a
3,0g	24hs	270,5 c
	48hs	300,0 a
	72hs	294,0 a
4,5g	24hs	290,7 a
	48hs	298,1 a
	72hs	299,0 a
6,0g	24hs	289,9 a
	48hs	292,5 a
	72hs	299,0 a
Controle +	284,5 b	4,5 b

Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade.

### Conclusões

Para todas as fases mitóticas analisadas, através dos resultados obtidos é possível verificar a atividade antiproliferativa e mutagênica da espécie *Illicium verum*, sobre as raízes de *P. sativum*, indicando seu potencial terapêutico para inibição do ciclo celular. Já o *Allium sativum*, foi menos sensível em detectar atividades mutagênicas, tendo apenas atividade antiproliferativa.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade do Estado do Mato Grosso - UNEMAT por viabilizar a condução da pesquisa, a FAPEMAT e a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado para as autoras.

### Referências

CRUZ, C.D. Genes Software extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Scientiarum*. v. 38, n.4, p.547-552, 2016.

GERAS'KIN, S. A.; KIM, J. K.; DIKAREV, V. G.; OUDALOVA, A. A.; DIKAREVA, N. S.; SPIRIN Y. V. Cytogenetic effects of combined radioactive (<sup>137</sup>Cs) and chemical (Cd, Pb, and 2,4-D herbicide) contamination on spring barley intercalary meristem cells. *Mutation Research*, v. 586, p. 147–159, 2005.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. Funpec. São Paulo, 2003. 131p.

IGANCI, J.R.V.; BOBROWSKI, V.L.; HEIDEN, G.; Stein, V.C.; ROCHA, B.H.G. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo. *Arquivos*

do Instituto Biológico, São Paulo, v. 73, n. 1, p. 79-82, 2006.

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberration: past, present and future. *Mutation Research*, Orlando, v. 504, n. 6, p. 3-16, 2002.

PING, K. Y.; DARAH, I.; YUSUF, U.K.; YENG, C.; SASIDHARAN, S. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: An *Allium cepa* Assay. *Molecules*, n.17, p. 7782-7791, 2012. Doi:10.3390/molecules17077782.

SILVA, C.B.; SIMIONATTO, E.; HESS, S.C.; PERES, M.T.L.P.; SIMIONATTO, E.L.; JÚNIOR, A.W.; POPPI, N.R.; FACCENDA, O.; CÂNDIDO, A.C.S.; SCALON, S.P.Q. Composição química e atividade alelopática do óleo volátil de *Hydrocotyle bonariensis* lam (Araliaceae). *Quim. Nova*, v. 32, n. 9, 2373-2376, 2009.

SOUZA, Cleiton Pereira de. Investigação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade de uma formulação comercial de 2,4-D (diclorofenoxiacético) utilizando os organismos testes *Allium cepa* e *Tradescantia pallida*. 2015. 75 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti. 2015

VALENTE, D.; COSTA-AMARAL, I.S.; CARVALHO, L.V.B.; SANTOS, M.V.C.; CASTRO, V.S.; RODRIGUES, D.D.R.F.; FALCO, A.; SILVA, C.B.; NOGUEIRA, S.M.; GONÇALVES, E.S.; MOREIRA, J.C.; ANDRÉ, L.C.; TEIXEIRA, L.R.; SARCINELLI, P.N.; SISENANDO, H.A.; OLIVEIRA, M.S.; PERINI, J.A.; MATTOS, R.C.O.C.; LARENTIS, A.L. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de

postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. Revista Brasileira de Saúde Ocupacional. São Paulo. V.42, 2017. URL: <http://dx.doi.org/10.1590/2317-6369000124415>.

WANG G.W., HU W.T., HUANG B.K., QIN L.P. *Illicium verum*: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. J Ethnopharmacol, v.1, n.136, p. 10-20, 2011. DOI: 10.1016/j.jep.2011.04.051.