



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMIÁRIDO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
PROGRAMA INTEGRADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL -  
PPGPA

**AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DE  
EXTRATOS AQUOSOS DE *Ipomoea asarifolia*  
(CONVOLVULACEAE).**

**ELIEZER FERNANDES DA SILVA FILHO**

MOSSORÓ/RN – BRASIL  
2015

ELIEZER FERNANDES DA SILVA FILHO

**AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DE  
EXTRATOS AQUOSOS DE *Ipomoea asarifolia*  
(CONVOLVULACEAE).**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semiárido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Nobrega de Sousa

MOSSORÓ/RN – BRASIL  
2015

Catálogo na Fonte  
Catálogo de Publicação na Fonte. UFERSA - BIBLIOTECA CENTRAL ORLANDO  
TEIXEIRA - CAMPUS MOSSORÓ

Silva Filho, Eliezer Fernandes da  
Avaliação tóxica, citotóxica e mutagênica de extratos aquosos de *Ipomoea*  
*asarifolia* Convolvulaceae / Eliezer Fernandes da Silva Filho. - Mossoró,  
2015.  
61f: il.

1. Plantas daninhas. 2. Citotoxicidade. 3. Ipomea. 4. Mutagenicidade.  
5. Plantas - toxidade. I. Título

RN/UFERSA/BCOT/401

CDD 632.5 S586a

ELIEZER FERNANDES DA SILVA FILHO

**AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DE  
EXTRATOS AQUOSOS DE *Ipomoea asarifolia*  
(CONVOLVULACEAE)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semiárido – UFRSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

APROVADA EM: 11 / 02 / 15

BANCA EXAMINADORA:



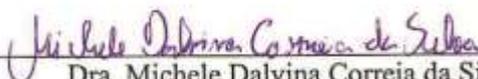
---

Prof. Dr. Marcos Antonio Nobrega de Sousa  
Presidente – Orientador – PPGPA/UFRSA



---

Prof. Dra. Liz Carolina da Silva Lago Cortês Assis  
Primeiro Membro – Interno – PPGPA/UFRSA



---

Dra. Michele Dalvina Correia da Silva  
Segundo Membro – Externo – DCAN/UFRSA

DEDICO ESTE TRABALHO AOS  
MEUS PAIS, ELIEZER E ANGELA.

Deem graças em todas as circunstâncias,  
pois esta é a vontade de Deus para vocês  
em Cristo Jesus.

*1 Tessalonicenses 5:18*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela sua infinita misericórdia, benignidade e amor. Pela família linda que me foi dada e por tudo o que sou, a ti sou infinitamente grato pelo dom da vida.

Aos meus Pais, Eliezer Fernandes e Ângela Maria Fernandes, A vocês, que nos deram a vida e nos ensinaram a vivê-la com dignidade, não bastaria um obrigado. A vocês, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que os trilhássemos sem medo e cheios de esperanças, não bastaria um muito obrigado. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudéssemos realizar os nossos. Pela longa espera e compreensão durante nossas longas viagens, não bastaria um muitíssimo obrigado. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que nos acontece agora, quando procuramos arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras.

Ao meu amor, Naama Jéssica, minha amiga e companheira para todas as horas, ao qual esteve presente desde o início, aconselhando em momentos difíceis, alegrando os meus dias. Obrigado meu amor por tudo e sou grato à Deus por todos os momentos em que estivemos juntos como namorados e como colegas de trabalho. Nas duras batalhas da vida, aprendemos o significado do verdadeiro amor. “O amor é paciente, o amor é bondoso. Não inveja, não se vangloria, não se orgulha. Não maltrata, não procura seus interesses, não se ira facilmente, não guarda rancor. O amor não se alegra com a injustiça, mas se alegra com a verdade. Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.” (1 Coríntios 13:4-7). Eu te amo princesa!

Aos meus irmãos Dinno Max Fernandes e Elizangela Fernandes, obrigado pela fraternidade, companheirismo, conselhos e ajuda. Agradeço por tudo e principalmente pelos meus sobrinhos Pablo Max, Letícia, Nicolay e Miguel. E a todos os familiares pelo importante apoio.

Ao meu orientador o Prof. Dr. Marcos A. N. de Sousa, muito obrigado pela confiança depositada desde a época da graduação e por ter acreditado em meu trabalho. Agradeço pela ajuda em muitos momentos difíceis e pelo empenho no ensino e dedicação dada a nós alunos da equipe LAGENE.

À Profa. Dra. Liz Carolina e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal (PPGPA), juntamente à Profa. Dra. Michelle Dalvina, pelo apoio dado à pesquisa e ao desenvolvimento do trabalho com inúmeras contribuições. Muito obrigado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) pelo apoio e incentivo à pesquisa e desenvolvimento do trabalho.

À toda equipe LAGENE, Mayra Pinheiro, Renata Kely, Giliane Duarte e em especial à Sra. Edigleyce Lima, por todos os anos trabalhando conosco, pelo apoio e dedicação. Pelo companheirismo e dedicação.

Aos meus amigos Antonio Rodrigues, Arthur Fernandes, Jedaías Freitas, Ednezer Junior, Jedíael Freitas, Gustavo Fernandes, Glenilton Miranda, Giordano Bruno. Obrigado pela compreensão, amizade, companheirismo e fraternidade.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Inibição relativa de raiz de <i>Allium cepa</i> L. expostas ao controle negativo e positivo e diferentes concentrações de extrato aquoso de folhas secas (EFS) e frescas (EFF) de <i>Ipomoea asarifolia</i> . Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão a ( $p < 0,05$ ) diferença estatística significativa entre as concentrações de extrato frente ao controle negativo. Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet. ....	37
Tabela 2 Índice Mitótico (IM%) e Valor Limite de Toxicidade de células de raiz de <i>Allium cepa</i> após exposição ao extrato aquoso de folhas secas (EFS) e frescas (EFF) de <i>Ipomoea asarifolia</i> . ....	39
Tabela 3 Número de mortes de camundongos expressos pela quantidade de mortes por sexo de animais durante o teste de Dose Letal Mediana (DL50). ....	50
Tabela 4 Peso (g) médio de camundongos submetidos ao extrato de folhas frescas de <i>Ipomoea asarifolia</i> . ....	51
Tabela 5 Média de Micronúcleos em células de camundongos expostos ao extrato aquoso de folhas frescas de <i>Ipomoea asarifolia</i> em diferentes concentrações. ....	52
Tabela 6 Média do número de células binucleadas presentes em amostras de sangue de medula de camundongos expostos ao extrato aquoso de folhas frescas de <i>Ipomoea asarifolia</i> .....	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (A) <i>Ipomoea asarifolia</i> , no município de Angicos, fazenda Bela Vista. (Fonte: Arquivo pessoal). (B) Flores e folhas de <i>I. asarifolia</i> . (Fonte: 7).....	23
Figura 2 (A) Ovinos pastejando em uma área invadida pela <i>Ipomoea asarifolia</i> . (B) Ovino ingerindo folhas de <i>I. asarifolia</i> . (Fonte: 7). ....	23
Figura 3 Ovino intoxicado pela <i>I. asarifolia</i> , apresentando tremores de tensão e desequilíbrio, após o animal ser movimentado os sinais clínicos se acentuaram apresentando membros rígidos em extensão e queda. (Fonte: 7).....	24
Figura 4 Bovinos intoxicados por <i>Ipomoea asarifolia</i> apresentando desequilíbrio motor e ao serem movimentados apresentaram ataxia e queda. (Fonte: 7).....	24
Figura 5 Células em Intérfase (A), Prófase (B), Metáfase (C), Anáfase (D) e Telófase (E) de células de raízes de <i>Allium cepa</i> expostas ao extrato aquoso de folhas de <i>Ipomoea asarifolia</i> .....	40
Figura 6 Dose letal mediana de extrato aquoso de folhas frescas de <i>Ipomoea asarifolia</i> administrado intraperitonealmente a camundongos nas concentrações 5 mg/Kg, 50 mg/Kg, 300 mg/Kg e 600 mg/Kg. Regressão linear da dose-resposta: $r = 0,7750$ e $y = 0,06629 * X - 0,0$ . $n = 4$ .....	50
Figura 7 Interação entre pesos médios de camundongos machos e fêmeas expostos ao extrato aquoso de folhas frescas de <i>Ipomoea asarifolia</i> . ....	52
Figura 8 Eritrócito de camundongo tratado com extrato aquoso de folhas frescas de <i>Ipomoea asarifolia</i> apresentando micronúcleo (Aumento 1000X).....	54
Figura 9 Eritrócito de camundongo tratado com extrato aquoso de folhas frescas de <i>Ipomoea asarifolia</i> apresentando-se como célula binucleada.....	55
Figura 10 Camundongo utilizado para avaliação de micronúcleo e células binucleadas, apresentando lesão.....	55

## AVALIAÇÃO TÓXICA, CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Ipomoea asarifolia* (CONVOLVULACEAE)

Silva Filho, Eliezer Fernandes da. AVALIAÇÃO TÓXICA, CITÓTOXICA E MUTAGÊNICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae). 2015. 61f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal: Caracterização, Conservação e Melhoramento Genético de Recursos Locais) - Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

RESUMO: As espécies do gênero *Ipomoea* estão inclusas entre as plantas daninhas comumente encontradas em áreas de cultivo, especialmente *Ipomoea asarifolia* (salsa) relatada como uma espécie vegetal tóxica e que causa distúrbios neurológicos. Existe pouca quantidade de estudos sobre a toxicidade do consumo a nível celular e genético dessas plantas nos animais de produção da região do Semiárido. Foi avaliada a capacidade tóxica, citotóxica e mutagênica do extrato aquoso de folhas da espécie *I. asarifolia* (Convolvulaceae) sobre crescimento de raízes em bulbos de *Allium cepa*; e sobre a frequência de eritrócitos micronucleados em células da medula óssea de roedores *in vivo* (teste do micronúcleo). Também foi obtida a Dose Letal Mediana (DL50) e foi estudado o efeito do peso em machos e fêmeas e analisado o comportamento dos animais (screening hipocrático). Os extratos aquosos de folhas secas (EFS) e frescas (EFF) de *I. asarifolia* não apresentaram efeitos tóxicos nem citotóxicos em raízes de bulbos de *Allium cepa*. Foram observados efeitos alelopáticos nos crescimentos de raízes. Os extratos aquosos de folhas secas apresentaram efeitos subletais nas concentrações de 5mg/L e 300mg/L. E o das folhas frescas apresentaram efeitos estimulatórios em todas as concentrações estudadas. O extrato aquoso de folhas secas e frescas não provocou efeitos tóxicos e citotóxicos. Não houve efeito citotóxico nem mutagênico nas células de roedores. A DL50 encontrada foi 754,26 mg/Kg. Não houve influência do gênero (Macho e fêmea) sobre o efeito tóxico, mas nas concentrações de 300 mg/Kg e 600 mg/Kg houve perda de peso. Os resultados vão de encontro ao conhecimento dos produtores no qual as folhas secas não prejudicam o animal de produção.

PALAVRAS CHAVE: *Ipomoea*, Toxicidade, Citotoxicidade, Mutagenicidade, Plantas.

TOXIC, CYTOTOXIC, AND MUTAGENIC EVALUATION OF AQUEOUS EXTRACTS  
OF *Ipomoea asarifolia* (CONVOLVULACEAE)

Silva Filho, Eliezer Fernandes da. Toxic, cytotoxic and mutagenic evaluation of aqueous extract of *Ipomoea asarifolia* (Convolvulacea). 2015. 61f. Dissertation (Master Science Degree in Animal Science: Characterization, Conservation and Genetic Improvement of Local Resources - Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

ABSTRACT: How do Genus Species *Ipomoea* station included between as weeds commonly found in cultivated areas, especially *Ipomoea asarifolia* (salsa) reported as a toxic plant species and causes que neurological disorders. There is little studies on the toxicity quantity make consumer cellular and genetic level these plants nos production animals semi-arid region. It was assessed a toxic capacity, cytotoxic and mutagenic of the aqueous extract of species leaves *I. asarifolia* (Convolvulaceae) about growth roots in *Allium cepa* bulbs; and about the frequency of micronucleated erythrocytes in bone marrow cells in vivo rodent (micronucleus test). Also it enrolled a median lethal dose (LD50) and studied the effect of weight in males and females and analyzed the behavior of animals (Hippocratic screening). Aqueous extracts of dried leaves (EFS) and Fresh (EFF) of *I. asarifolia* not presented toxic effects or cytotoxic in *Allium cepa* bulbs roots strain. Were observed allelopathic effects nos growth of roots. Aqueous extracts of dried leaves showed sublethal effects 5mg/L concentration and 300 mg/L. And the fresh leaves showed stimulatory effects all as concentrations studied. The aqueous extract of dried leaves and fresh not caused toxic effects and cytotoxic. There is not cytotoxic effect or in mutagenic rodent cells. The LD50 was found 754.26 mg/kg. From: No influence of gender (male and female) on the toxic effect, but at concentrations of 300 mg/kg and 600 mg/kg of weight was lost. The results against knowledge producers qua not like dry leaves not harm the production of animals.

KEY WORDS: *Ipomoea*, Toxicity, Cytotoxicity, Mutagenicity, Plants.

## SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	15
1 CAPÍTULO I - REFERENCIAL TEÓRICO .....	17
1.1 <i>Ipomoea asarifolia</i> e seus efeitos tóxicos e genotóxicos em animais de produção.....	17
1.2 INTRODUÇÃO .....	19
1.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	20
1.3.1 Plantas tóxicas de interesse pecuário .....	20
1.3.2 Considerações botânicas sobre a família <i>Convolvulaceae</i> .....	21
1.3.3 Considerações sobre plantas do gênero <i>Ipomoea</i> .....	22
1.3.4 Considerações sobre <i>Ipomoea asarifolia</i> .....	22
1.3.5 Ensaio de Toxicidade, Citotoxicidade e genotoxicidade de plantas. ....	25
1.4 CONCLUSÕES .....	27
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
2 CAPITULO II - Toxicidade e Citotoxicidade de Extrato Aquoso de <i>Ipomoea asarifolia</i> .....	32
2.1 INTRODUÇÃO .....	34
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
2.2.1 Coleta de material vegetal e obtenção do extrato aquoso de <i>Ipomoea asarifolia</i> .....	35
2.2.2 Avaliação da toxicidade de extrato aquoso de <i>Ipomoea asarifolia</i> em bulbos de <i>Allium cepa</i> .....	35
2.2.3 Ensaio de citotoxicidade da <i>Ipomoea asarifolia</i> com bulbos de <i>Allium cepa</i> .....	36
2.2.4 Análise estatística .....	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
3.1 CONCLUSÕES .....	40
3.2 REFERÊNCIAS .....	40
4 CAPÍTULO III - Avaliação Mutagênica e Citotóxica de Extrato Aquoso de <i>Ipomoea asarifolia</i> (SALSA) em Camundongos ( <i>Mus musculus</i> ).....	44
4.1 INTRODUÇÃO .....	46
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	47
4.2.1 Coleta e obtenção do extrato aquoso de <i>Ipomoea asarifolia</i> . ....	47
4.2.2 Utilização dos animais .....	47
4.2.3 Obtenção da Dose Letal Mediana (DL50) .....	48
4.2.4 Avaliação de mutagenicidade .....	48
4.2.5 Screening Hipocrático.....	49
4.2.6 Análises estatísticas .....	49
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
4.4 CONCLUSÕES .....	56
4.5 REFERÊNCIAS .....	56
5 ANEXOS.....	60
5.1 Anexo 1 - Identificação botânica ( <i>Ipomoea asarifolia</i> ). ....	60
5.2 Parecer de Projeto Encaminhado a CEUA-UFERSA .....	61

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

As espécies do gênero *Ipomoea* estão inclusas entre as plantas daninhas comumente encontradas em áreas de cultivo (CHAVES, 2009). A espécie *Ipomoea asarifolia* é uma planta do tipo herbácea prostrada ou trepadeira da família *Convolvulaceae*, conhecida popularmente como "salsa" ou "batatarana" (BARBOSA, 2005). Possui caule macio, normalmente rasteiro, sem a presença de lignina, caracterizado com o caule não lenhoso (JUNIOR et al., 2008).

Sendo planta nativa da América Tropical, a *I. asarifolia* ocorre em regiões da América do Sul e Central. No Brasil, é comum na Amazônia e em todo o litoral da Região Norte, além do Nordeste e partes do litoral do Rio de Janeiro e São Paulo (ARAUJO, 2008). É encontrada, em especial no semiárido, geralmente em margens de açudes, rios, lagoas e praias marítimas, além de estar presente em terrenos abandonados, margens de estradas e de preferência em solos arenosos (BLANCO, 1978; TOKARNIA, 2000; CHAVES, 2009).

Diversos autores estudaram a toxicidade da *Ipomoea* em animais de produção. Tokarnia (2002) considerou a *salsa* como uma espécie vegetal que causa distúrbios neurológicos, juntamente com outras espécies como *Ipomoea fistulosa*, *Polygala Klotzschii* e *Pteridium aquilinum*, causando intoxicação natural em ovinos (RIET-CORREA et al., 2003; GUEDES et al., 2007), caprinos (MEDEIROS et al., 2003; GUEDES et al., 2007) e bovinos (RIET-CORREA et al., 2003; BARBOSA et al., 2005). Intoxicações experimentais também foram encontradas em todas essas espécies, além de bubalinos (DÖBEREINER et al., 1960; BARBOSA et al., 2005).

Os sinais clínicos típicos da intoxicação por salsa variam de acordo com a espécie animal, mas são principalmente de ordem nervosa. Em bovinos e ovinos, foram observados entre outros sintomas, a presença de tremores musculares e desequilíbrio na locomoção (síndrome tremorgênica, conhecida popularmente como treme-treme), com consequente queda do animal ao solo. Em caprinos, observou-se apatia, sonolência, tremores musculares e desequilíbrio (CHAVES, 2009). Contudo, após retirar o consumo e ingestão da planta, os sintomas permanecem por alguns dias, mas os animais voltam ao estado natural (TOKARNIA, 2000). Alguns autores apontam que a síndrome tremorgênica é devido à presença de fitotoxinas ou micotoxinas (MEDEIROS et al., 2003).

A pesquisa básica referente ao potencial genotóxico e citotóxico de produtos químicos, substâncias complexas (extrato de plantas, por exemplo), dejetos industriais e águas contaminadas, possui forte contribuição do teste *Allium cepa* (CUCHIARA et al., 2012).

Conforme Monarca e colaboradores (2000), esse teste possibilita conhecimento acerca de dois tipos de toxicidade: Parâmetros macroscópicos observáveis através da formação de tumores, raízes torcidas e avaliação da taxa de crescimento de raízes para análise de efeitos citotóxicos e parâmetros microscópicos, como o índice mitótico, que por sua vez, permite a análise de taxa de divisões celulares, aberrações cromossômicas (cromossomos em anel, pontes cromossômicas e retardos cromossômicos observados nas fases de metáfase e anáfase), além da formação de micronúcleos, que podem servir para analisar os efeitos genotóxicos caracterizados pelas taxas de anormalidades no DNA.

Além de ser um teste simples e com alta sensibilidade a baixos custos, o teste com *Allium cepa* vem sendo selecionado por diversos pesquisadores devido à alta correlação observada com os resultados de outros bioensaios (KRÜGER, 2009).

O Teste de Micronúcleos (MN) também pode ser aplicado em mamíferos *in vivo* e permite a detecção dos agentes clastogênicos que atuam interferindo na formação do fuso mitótico e alteram assim a distribuição equitativa dos cromossomos ao longo da divisão celular (MAVOURNIN et al., 1990).

O Micronúcleo tanto em células vegetais, quanto animais, é originado através de quebras cromossômicas ou por cromossomos inteiros perdidos que não se prenderam às fibras do fuso mitótico, formadas principalmente na telófase da mitose ou meiose (CRUZ, 2013). Estes fragmentos ou cromossomos inteiros não são incorporados ao núcleo celular, mas são encapsulados em um pequeno núcleo. Com isso o micronúcleo representa tanto uma alteração cromossômica estrutural quanto uma alteração numérica (FENECH, 2003).

Quando os resultados para micronúcleos são positivos há fortes evidências de genotoxicidade sistêmica da substância química avaliada (CRUZ, 2013). O aumento da frequência de micronúcleos é indicativo de elevadas taxas de mutações sendo, portanto, um parâmetro representativo acerca do aumento da instabilidade genética nas células (CARVALHO et al., 2002). Por sua vez, em condições experimentais apropriadas, os resultados negativos indicam que a substância em teste não é genotóxica *in vivo* (CRUZ 2013).

Devido à escassez de informações relativa aos efeitos a nível genético que o consumo de *I. asarifolia* pode ocasionar, o presente estudo analisou a toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade do extrato aquoso de *Ipomoea asarifolia* através dos testes de micronúcleos em *Allium cepa* e em camundongos, além do estudo de toxicidade aguda (DL50) e estudo comportamental (screening hipocrático).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J.A.S. et al. Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* (*Convolvulaceae*) em caprinos e ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 28(10):488-494, outubro, 2008.

BARBOSA, J.D. et al. Intoxicação experimental e natural por *Ipomoea asarifolia* (*Convolvulaceae*) em búfalos e outros ruminantes. Rio de Janeiro: **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.4, p.231-234, 2005.

BLANCO, H.G. **Catálogo das espécies de mato infestantes de áreas cultivadas no Brasil. Família das Campainhas (*Convolvulaceae*)**. São Paulo: O Biólogo, v.44, p.259-278, 1978.

CARVALHO, M. B. et al. Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Rev Assoc Méd Brás.**48(8): 317-322, 2002.

CHAVES, D.P. **Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* em ovinos: achados clínicos, laboratoriais e anatomo-patológicos**. Jaboticabal, Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009.

CRUZ, A.G.M. **Investigação do potencial mutagênico e antimutagênico do extrato de *Acanthospermum hispidum* (Espinho-de-cigano) em células do sangue periférico de camundongos da espécie *Mus musculus* (Swiss albino) in vivo [manuscrito]**. (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. 2013.

CUCHIARA, C.C.; BORGES, C.S.; BOBROWSKI, V.L. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v .6, n.1, p.33-38, mar. 2012.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; CANELLA, C.F.C. Intoxicação experimental pela “salsa” (*Ipomoea asarifolia* R. et Schult.) em ruminantes. **Arqs Inst. Biol. Animal**, Rio de J., 3:39-57. 1960.

FENECH, M; SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. **Mutagênese Ambiental**. ULBRA, 1º ed:201-219, 2003.

GUEDES, K.M.R. et al. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. Rio de Janeiro: **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.1, p.29-38, 2007.

JUNIOR, D.A.O. et al. **Caracterização fenológica das plantas apícolas herbáceas e arbustivas da microrregião de Catolé do Rocha – PB – Brasil**. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, v.3, n. 4, p. 86-99, 2008.

KRÜGER, R.A. **Avaliação da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa***. (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Centro Universitário Feevale, Hamburgo-RS. 2009.

MAVOURNI, S.M. et al. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v.239, n.1, p.29-80, jun. 1990.

MEDEIROS, R.M.T. et al. Tremorgenic syndrome in goats caused by *Ipomoea asarifolia* in northeastern Brazil. **Toxicon**. V. 41, p. 933-935, 2003.

MONARCA, S. et al. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. **Water Research**, Londres, v. 34, n.17, p. 4261-4269, 2000.

RIET-CORREA, F. et al. **Doenças dos ruminantes e eqüinos no semi-árido da Paraíba**. João Pessoa: Semiárido em Foco, v. 1, p. 4-111, 2003.

SALLES, H.O. et al. Towards a better understanding of *Ipomoea asarifolia* toxicity: Evidence of the involvement of a leaf lectin. **Toxicon**, ELSEVIER, 58, 502–508. 2011.

TOKARNIA, C.R.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. Poisonous plants affecting lives tock in Brazil. Atlanta: Toxicon, **ELSEVIER** v.40, p.1635-1660, 2002.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Plantas Tóxicas do Brasil. Rio de Janeiro: **Helianthus**, 320 p. 2000.

# 1 CAPÍTULO I - REFERENCIAL TEÓRICO

## 1.1 *Ipomoea asarifolia* e seus efeitos tóxicos e genotóxicos em animais de produção.

Trabalho de revisão publicado na revista:

Revista Saúde & Ciência on line

Página eletrônica:

<http://www.ufcg.edu.br/revistasaudeeciencia/index.php/RSC-UFCG/index>

ISSN: 2317-8469

## ***Ipomoea asarifolia* E SEUS EFEITOS TÓXICOS E GENOTÓXICOS EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO.**

Marcos Antonio Nobrega de Sousa<sup>1\*</sup>, Eliezer Fernandes da Silva Filho<sup>2</sup>, Naama Jessica de Assis Melo<sup>2</sup>, Edigleyce De Lima Costa<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Docente Doutor. Departamento de Ciências Animais – DCAn. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

\*Correspondência: Avenida Francisco Mota, 572. Bairro Costa e Silva. Mossoró/RN. CEP: 59.625-900. E-mail:

[marcossousa@ufersa.edu.br](mailto:marcossousa@ufersa.edu.br)

<sup>2</sup> Biotecnologistas, Discentes do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN.

### RESUMO

A família *Convolvulaceae* possui grande distribuição de espécies no mundo. No Brasil as espécies são representadas, em sua maioria pelo gênero *Ipomoea*. Elas habitam várias regiões, desde o interior das florestas até regiões litorâneas. Muitas delas são descritas como plantas que causam intoxicação natural ou experimental em animais de interesse pecuário, tais como bovinos, caprinos e ovinos, causando uma doença conhecida como síndrome tremorgênica. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica acerca das espécies do gênero *Ipomoea*, em especial *Ipomoea asarifolia* e seus efeitos tóxicos, de citotoxicidade e genotoxicidade. Foram relatadas as principais características da família, do gênero e espécie e seus efeitos tóxicos nos organismos. Contudo, verifica-se a ausência na literatura científica de estudos que abordem os danos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos dessa espécie.

**DESCRITORES:** *Convolvulaceae*, *Ipomoea*, Toxicidade, Genotoxicidade.

### ABSTRACT

The family *Convolvulaceae* has great distribution of species in the world. In Brazil the species are represented mostly by genus *Ipomoea*. They inhabit various regions, from the interior of the forests to coastal regions. Many of them are described as natural plants that cause poisoning in experimental animals or livestock of interest, such as cattle, goats and sheep, causing a disease known as tremorgenic syndrome. The objective of this study was to review literature about the species of the genus *Ipomoea*, especially *Ipomoea asarifolia* and its toxic effects, cytotoxicity and genotoxicity. The main characteristics of family, genus and species and their toxic effects on organisms have been reported. However, it appears the absence in the literature studies that address the cytotoxic, genotoxic and mutagenic damage of this kind.

**Keywords:** *Convolvulaceae*, *Ipomoea*, Toxicity, Genotoxicity.

## 1.2 INTRODUÇÃO

A família *Convolvulaceae* é composta por cerca de 57 gêneros e 1.625 espécies (1). É amplamente distribuída, com representação máxima originária ou exclusiva das regiões tropicais, não possui representantes em áreas geladas ou desérticas (2).

No Brasil esta família é representada por 20 gêneros e cerca de 350 espécies. Sendo o gênero *Ipomoea* o de maior riqueza de espécies no mundo todo com 600 a 700 espécies (3). Os táxons deste gênero são, em sua maioria, trepadeiras volúveis de rápido crescimento que habitam diversos ambientes abrangendo desde o interior de florestas às regiões litorâneas (2).

A espécie *Ipomoea asarifolia* é caracterizada como planta tóxica e conhecida popularmente como salsa, batatarana, batata salsa e salsa brava; presente em margens de rios, lagoas e praias marítimas em todo o Brasil.

O consumo de plantas tóxicas por animais de produção causa enormes prejuízos à agropecuária, desde perdas indiretas como gastos para manejo de pastagens, até perdas diretas como morte dos animais intoxicados (4). Mesmo os produtores tomando medidas preventivas para evitar que os animais consumam plantas tóxicas e apresentem quadros de intoxicação, muitos são os fatores que contribuem para que eles venham a consumi-las, como: fome, palatabilidade, entre outros (5).

*I. asarifolia* é responsável por intoxicação experimental em roedores (6) além de intoxicação natural em ovinos e caprinos (7). Mesmo existindo o conhecimento acerca de intoxicações e seus efeitos no organismo animal, na literatura científica são poucos os estudos que buscam compreender os efeitos destas intoxicações ao nível celular.

Existem alguns testes, altamente sensíveis para o biomonitoramento de diversos compostos genotóxicos, que permitem avaliar o potencial genotóxico e mutagênico de substâncias de interesse em um organismo bioindicador (8,9).

O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre a espécie *Ipomoea asarifolia* relacionando seus efeitos tóxicos em animais de produção, assim como também analisar quais técnicas são necessárias para ser possível o conhecimento da ocorrência de prováveis danos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos causados pelas intoxicações por *Ipomoea asarifolia*.

### 1.3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho, as bases de dados utilizadas foram Scielo, Science direct e PubMed. Os trabalhos selecionados abordaram considerações gerais sobre plantas de interesse pecuário, da família *Convolvulaceae*, gênero *Ipomoea*, além de dados específicos de *Ipomoea asarifolia* quanto à toxicidade em animais de produção. A pesquisa bibliográfica incluiu artigos originais e de revisão, teses e dissertações, nos idiomas inglês e português. Os descritores utilizados e suas variadas combinações foram *Convolvulaceae*, *Ipomoea*, *Ipomoea asarifolia*, fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade, com foco referente à toxicidade de plantas de interesse pecuário.

#### 1.3.1 Plantas tóxicas de interesse pecuário

As plantas e os animais possuem uma relação mutuamente dependente; as primeiras produzem oxigênio através da fotossíntese e consomem o gás carbônico excretado pelos animais, que utilizam o oxigênio e compostos orgânicos (5). Contudo, não é interessante do ponto de vista evolutivo que as plantas sofram predação intensivamente até serem extintas (10).

Devido à incapacidade de locomoção para escapar dos herbívoros, as plantas tiveram que desenvolver técnicas para escapar da predação, criando assim mecanismos mecânicos e morfológicos de proteção como espinhos, cornos ou revestimento impenetrável (5). Desenvolveram também através do metabolismo secundário, diversos compostos químicos que promovem quadros de intoxicação em animais herbívoros (11).

Na natureza é, portanto, comum que as espécies vegetais possuam determinados princípios ativos capazes de provocar distúrbios nos animais (5). Entretanto, para classificar como planta tóxica de interesse pecuário, as espécies capazes de promover intoxicações em animais deverão produzi-las somente em condições naturais (4,12). Sendo assim, nem toda planta que experimentalmente for caracterizada como tóxica deve ser classificada como de interesse pecuário, quando não produzirem quadros clínico-patológicos em condições naturais (13).

Os princípios tóxicos consistem em substâncias ou um conjunto de substâncias quimicamente definidas, de mesma natureza ou de natureza diferente, que ao serem introduzidas no organismo são capazes de causar intoxicação o que é dependente da quantidade de componente tóxico absorvido, de sua natureza química e via de introdução

(12). As classes químicas mais importantes de compostos tóxicos das plantas são: alcaloides, glicosídeos, lectinas, ácidos orgânicos, além de minerais absorvidos do solo e acumulados na planta, como selênio, bário, nitratos e oxalatos (5).

É importante saber também que a ocorrência, a frequência e a distribuição geográfica das inúmeras intoxicações em diferentes regiões são determinadas por fatores como: 1) a fome, quando o animal consome a planta tóxica que permanece verde em épocas de estiagem ou inverno em detrimento de carência de forragem adequada; 2) a sede, quando os animais ao serem transportados consomem água e perdem a palatabilidade e capacidade de seleção; 3) o acesso às plantas tóxicas, na medida em que os animais se intoxicam quando possuem acesso a elas após, por exemplo, as árvores serem cortadas ou derrubadas por ventos; 4) além de outros fatores como a palatabilidade, período de ingestão, espécie animal, idade, deficiências minerais, superlotação, queimadas, fenação, vício, tolerância e imunidade dos animais (5, 12-15).

Devido a grande quantidade de espécies, as plantas tóxicas são classificadas em grupos que podem ser separados conforme, divisão regional, por ação patológica, quadro clínico-patológico, famílias botânicas e princípios tóxicos (5,13).

### **1.3.2 Considerações botânicas sobre a família *Convolvulaceae***

A Família *Convolvulaceae* compreende 1.930 espécies predominantes nas regiões tropicais; o gênero *Ipomoea* compreende o maior número de espécies (500 - 600) (16). Os exemplares desta família podem ser ervas trepadeiras, lianas, arbustos ou árvores; Por vezes possuem rizomas grandes, sendo algumas espécies parasíticas além disto, as do tipo trepadeiras podem ser herbáceas anuais ou fortemente lenhosas e duradouras semelhantemente à maioria dos cipós das matas africanas (17).

As raízes pivotantes são as mais comuns, ocasionalmente também possuem raízes tuberosas, enquanto raízes adventícias podem ser apresentadas nos gêneros *Dichondra*, *Ipomoea*, *Iseia*, *Evolvulus*, *Jacquemontia* e *Maripa*. As folhas sempre alternas são bem variáveis quanto à forma, tamanho e indumento, possuindo estômatos geralmente paracíticos em ambas as faces das folhas (18). As flores são dialissépalas, campanuladas, infundibiliformes ou hipocrateriformes, possuindo áreas mesopétalas proeminentes, estames epipétalos, ovário súpero e fruto do tipo cápsula valvar ou indeiscente (19). Sabe-se que diversas espécies de *Convolvulaceae* são de grande importância por serem alimentícias, daninhas, ornamentais, medicinais ou tóxicas (20).

### **1.3.3 Considerações sobre plantas do gênero *Ipomoea***

O gênero *Ipomoea* possui abrangência em todas as regiões tropicais do mundo, todavia algumas espécies são capazes de habitar regiões das zonas temperadas (21). As espécies deste gênero são largamente distribuídas ao longo da América do Sul, Central e continente africano (22). Uma das características anatômicas mais proeminentes desse gênero é a existência de células capazes de secretar glicosídeos de resina nos tecidos foliares e nas raízes; estes constituem importantes marcadores quimiotaxonômicos da família *Convolvulaceae* (23).

Estas plantas são utilizadas desde a antiguidade para fins nutricionais, medicinais, rituais e agrícolas (24). Para os fins nutricionais é importante salientar o uso e importância da *I. batatas*, espécie esta originária da América Central e amplamente cultivada e consumida em quase todo o mundo (25,26). A *Ipomoea aquática*, por exemplo, é consumida como alimento no Sri Lanka, Hong Kong, Taiwan e China (27); suas folhas possuem grandes quantidades de aminoácidos essenciais e, por isso, são comparadas aos produtos alimentares convencionais como soja ou ovos (23).

Várias outras espécies deste gênero possuem efeitos fitotóxicos, ou seja, produzem compostos químicos que inibem o crescimento de outras plantas, como ervas daninhas invasoras, sendo utilizadas por agricultores para evitar a proliferação destas (23). Há também relatos de seu uso como alucinógeno, devido ao grande teor de alcaloides, desde os tempos pré-colombianos pelos povos antigos em rituais e cerimônias religiosas (28).

A fitoquímica deste gênero vem sendo, portanto, bastante estudada. Assim, algumas espécies mostraram efeito antimicrobiano, analgésico, espasmogênico e anticancerígeno, devido aos componentes biologicamente ativos como alcaloides indolizidínicos, alcaloides nortropano, benzenóides, compostos fenólicos, cumarinas, diterpenos, isocumarina, além de glicolipídios e triterpenos (23).

### **1.3.4 Considerações sobre *Ipomoea asarifolia***

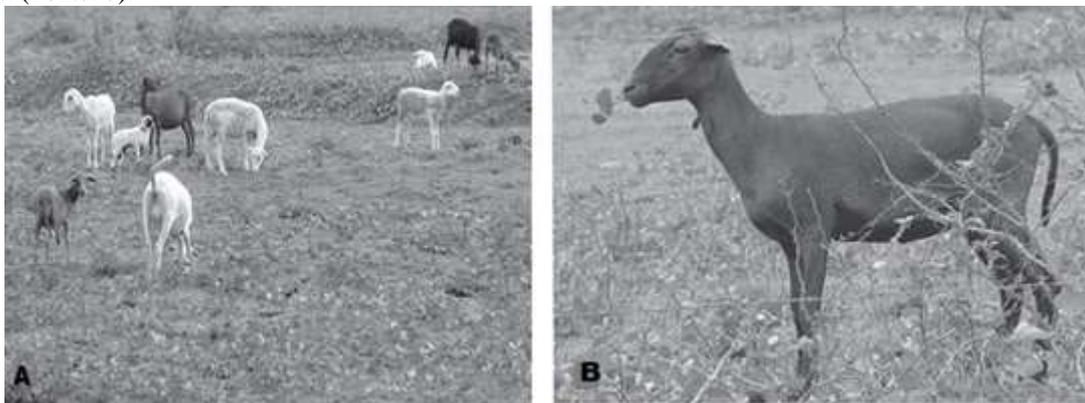
Comumente encontradas em áreas de cultivo (29), a espécie *Ipomoea asarifolia* (Fig. 1 A e B) que é uma planta do tipo herbácea prostrada ou trepadeira da família *Convolvulaceae*, é conhecida popularmente como "salsa" ou "batatarana" (30). Muito comum no Nordeste do Brasil, sua toxicidade afeta caprinos, ovinos e bovinos (Fig. 2 A e B) (31).

**Figura 1** (A) *Ipomoea asarifolia*, no município de Angicos, fazenda Bela Vista. (Fonte: Arquivo pessoal). (B) Flores e folhas de *I. asarifolia*. (Fonte: 7).



A intoxicação natural por *I. asarifolia* ocorre devido principalmente à fome, que induz o animal a ingerir a planta, uma característica que favorece esse processo é que a planta permanece verde durante todo o ano, e na maioria dos casos, são comuns ingestões por indivíduos jovens que se alimentam das partes aéreas. É importante salientar que essas intoxicações ocorrem geralmente em estações de seca, pois devido à carência de forragem, os animais acabam ingerindo grandes quantidades desta planta como fonte principal de alimento (32).

**Figura 2** (A) Ovinos pastejando em uma área invadida pela *Ipomoea asarifolia*. (B) Ovino ingerindo folhas de *I. asarifolia*. (Fonte: 7).



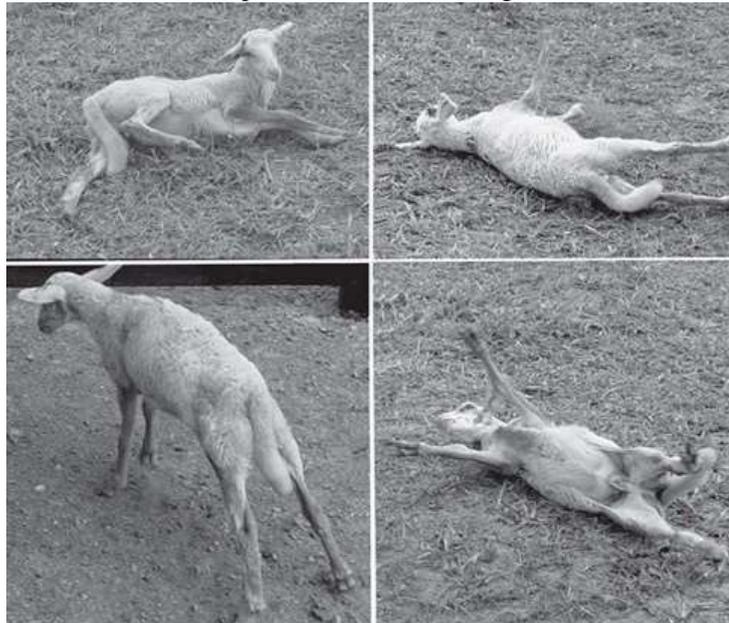
Os sinais clínicos mais comuns da intoxicação por *I. asarifolia*, variam de acordo com a espécie animal, mas são principalmente de ordem nervosa. Em bovinos e ovinos, foram observados sintomas como a presença de tremores musculares e desequilíbrio na locomoção, com conseqüente queda do animal ao solo e decúbito (Fig. 3 e 4); em caprinos observou-se apatia, sonolência, tremores musculares e desequilíbrio (29).

Outros estudos apontam que a intoxicação por *I. asarifolia* causa a chamada síndrome tremorgênica cujos sintomas incluem: depressão, tremores da cabeça, falta de coordenação

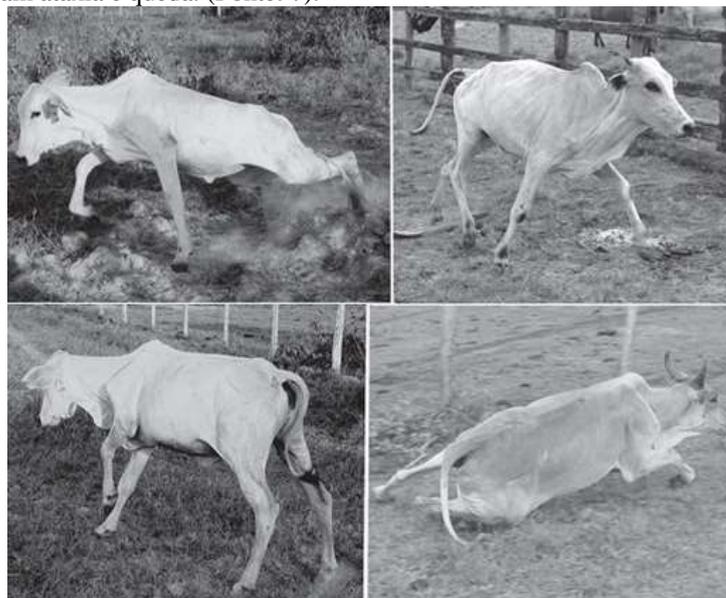
motora. Esta síndrome por sua vez pode ser causada pela presença de fitotoxinas ou micotoxinas (31).

A presença de sinais clínicos característicos da síndrome tremorgênica permite o diagnóstico de intoxicação por *I. asarifolia* tanto em ovinos quanto em bovinos, sendo os primeiros mais afetados, principalmente nos cordeiros (7). Os caprinos e bubalinos, embora com relatos de casos reduzidos, são espécies mais suscetíveis à intoxicação experimental (5,7).

**Figura 3** Ovino intoxicado pela *I. asarifolia*, apresentando tremores de tensão e desequilíbrio, após o animal ser movimentado os sinais clínicos se acentuaram apresentando membros rígidos em extensão e queda. (Fonte: 7).



**Figura 4** Bovinos intoxicados por *Ipomoea asarifolia* apresentando desequilíbrio motor e ao serem movimentados apresentaram ataxia e queda. (Fonte: 7).



Casos de surtos naturais por intoxicação de *I. asarifolia* em caprinos e ovinos de fazendas localizadas na região semiárida do Rio Grande do Norte foram relatados em 2010, com os animais apresentando os efeitos da síndrome tremorgênica. Houve um caso em que o proprietário informou que todo o rebanho ingeriu a salsa como parte da dieta, devido à escassez de alimentos, e novamente foram registrados sintomas de distúrbios nervosos (32, 33). Estudos apontam ainda que o componente químico responsável pela intoxicação é o ácido siálico encontrando nas lectinas presentes nas folhas (34). Além disto, a planta contém alcaloides do tipo chanoclavina, ergine, ergobalansinina e ácido lisérgico  $\alpha$ -hidroxietilamida (35). As chanoclavinas são conhecidas pelos seus efeitos alucinógenos e psicomiméticos (23).

### **1.3.5 Ensaio de Toxicidade, Citotoxicidade e genotoxicidade de plantas.**

Para estimativas do grau de impacto que estas substâncias podem produzir em um corpo receptor (caprino, por exemplo), são realizados ensaios de toxicidade, cujo objetivo é a simulação a nível laboratorial, dos efeitos que elas produziriam em um corpo receptor após a sua exposição e posterior observação (36).

#### **1.3.5.1 Toxicidade**

A toxicidade é a capacidade de uma determinada substância ou conjunto de substâncias de provocar alterações diversas nos organismos, como comportamentais, de crescimento, reprodutivas e até mesmo a morte.

O teste da DL50 (Teste de toxicidade aguda) é utilizado para definir a dose letal de um composto capaz de matar 50% dos indivíduos testados. Foi inicialmente introduzido em 1927, por Trevan, para avaliar substâncias que seriam utilizadas por seres humanos; posteriormente foi amplamente utilizado para comparação e classificação da toxicidade de substâncias, sendo assim considerado como um pré-requisito para várias agências reguladoras, como a *Food and Drugs Administration* [FDA] (37).

#### **1.3.5.2 Citotoxicidade**

As pesquisas em citotoxicidade correspondem aos estudos de danos cromossômicos ou distúrbios na divisão celular. As plantas superiores são empregadas em sistemas-teste para acompanhar o efeito de compostos tóxicos (38). Pesquisas com sementes da espécie *Allium cepa* (variedade baia periforme) são utilizadas pelo fato de ser em um material de análise

homogêneo (genética e fisiologicamente) e acessível o ano inteiro, o que proporciona maior confiabilidade nos ensaios realizados (39).

O *Allium cepa* é uma espécie que possui cariótipo composto por 8 pares cromossômicos grandes, subdivididos entre metacêntricos e submetacêntricos. Cada bulbo é capaz de produzir grande número de raízes em um curto período de tempo, o que fornece número satisfatório de células em divisão por lâmina de microscopia. Por estas razões, *A. cepa* é considerada um sistema-teste que possui alta sensibilidade e alta confiabilidade (40,41).

A seleção deste organismo vegetal com o bioindicador deve-se a uma série de vantagens entre elas, o baixo custo, facilidade de cultivo e também por poder ser usado em teste de toxicidade aguda e crônica, em condições laboratoriais e em campo (42). Além disso, pode ser analisada a fitotoxicidade, um dos parâmetros mais bem aceitos, onde se observa a inibição do crescimento da raiz ou a não germinação de suas sementes ao serem expostas ao composto poluente ou tóxico (38).

#### 1.3.5.3 Genotoxicidade e Mutagênese

A Genotoxicidade é um ramo da genética que estuda os processos ou agentes que afetam e/ou alteram o DNA em sua estrutura físico-química, o que é classificado como mutagênese. Tais processos ou agentes são os motores da mutagênese, considerados como "tóxicos" para o gene, e assim, chamados de genotóxicos. Quando ocorre qualquer alteração permanente no DNA que leva a uma alteração de natureza herdável da função gênica, temos os processos de mutação (42).

Quando as alterações decorridas na estrutura do material genético ocorrem por processos celulares normais, as mutações são conhecidas como espontâneas; Quando causadas pela exposição do organismo aos agentes químicos, físicos ou biológicos, são denominadas induzidas (43).

As mutações como processos biológicos comuns a todos os seres vivos, são fundamentais para a evolução e diversidade das espécies; Contudo, também podem promover uma série de problemas como malformação do organismo, câncer, envelhecimento e morte (44).

Existem alguns testes que permitem avaliar o potencial mutagênico de substâncias de interesse em um organismo bioindicador. Esses processos avaliam as modificações estruturais e/ou numéricas dos cromossomos, e permitem também observar a presença de anormalidades nucleares (45).

Para testes em mutagenicidade e genotoxicidade, são comumente utilizadas espécies como camundongos e/ou ratos (46), devido às vantagens como simplicidade no manuseio (alimentação) e fácil aplicação de procedimentos técnicos avaliativos de genotoxicidade (47). Utilizam-se para avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade respectivamente, o teste do micronúcleo (MN) e o ensaio do cometa, métodos altamente sensíveis para o biomonitoramento de uma ampla gama de substâncias genotóxicas que podem estar presentes nos ambientes e afetar animais (48).

#### 1.4 CONCLUSÕES

Caprinos, ovinos e bovinos em diversas ocasiões ingerem a espécie vegetal *I. asarifolia*. Estes animais podem apresentar sinais clínicos nervosos como consequência de intoxicação, o que traz prejuízos econômicos para os produtores.

Foi observado que os sinais clínico-patológicos ocasionados pelas intoxicações por *Ipomoea* são bastante conhecidos, mas são necessários estudos para o conhecimento de outros efeitos, e se a intoxicação por *Ipomoea asarifolia* pode afetar e causar danos celulares e genéticos nos animais.

#### 1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APGII (The Angiosperm Phylogeny Group). Disponível em <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/>. Acesso em: 10.10.2014.
2. Ferreira PPA, Miotto STS. Sinopse das espécies de *Ipomoea* L. (Convolvulaceae) ocorrentes no Rio Grande do Sul, Brasil. R. bras. Bioci., Porto Alegre, 2009. v.7, p. 440-453, out./dez.
3. Simão-Bianchini R, PIRANI JR. Duas novas espécies de Convolvulaceae de Minas Gerais, Brasil. Hoehnea, 2005. 32(2): 295-300.
4. Rossetti ACPA, Corsi M. Plantas tóxicas de interesse pecuário. Revisão bibliográfica. Projeto Capim – Pesquisa e Extensão; Departamento de Zootecnia; 2009. ESALQ – USP.
5. Barbosa RR, Filho MRR, Silva IP, Soto-Blanco B. Plantas tóxicas de interesse pecuário: importância e formas de estudo. Acta Veterinaria Brasília. 2007. V.1, n.1, p.1-17.
6. Monteiro EAS. Avaliação toxicológica da *Ipomoea asarifolia* (Salsa) em ratos. [Tese]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2007.
7. Tortelli FP, Barbosa JD, Oliveira CMC, Duarte MD, Cerqueira VD, Oliveira CA, et al. Intoxicação por *Ipomoea asarifolia* em ovinos e bovinos na Ilha de Marajó. Pesq. Vet. Bras. 2008. 28(12):622-626.

8. Matsumoto ST, Mantovani M S, Malagutti MIA, Dias A L, Fonseca IC, Marin-Morales MA. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root tips. *Genetics and Molecular Biology*. 2006. v. 29, n. 1, p. 148-158.
9. Fenech M. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis block micronucleous assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis*. 1999. vol. 14, n. 6, p.605- 612.
10. Cheeke PR. *Natural toxicants in feeds, Forages, and Poisonous Plants*. 2<sup>o</sup>ed. Danville: Interstate Publishers, 1998. 479p.
11. Wink M. Evolution of toxins and anti-nutritional factors in plants with emphasis on Leguminosae. In: Acamovic T., Stewart C.S., Pennycott T.W. (ed.) *Poisonous Plants and Related Toxins*. CAB Publishing, Oxon, 2004. p.1-25.
12. Haraguchi M. *Plantas Tóxicas de Interesse na Pecuária*. Biológico, São Paulo, 2003. v.65, n.1/2, p.37-39, jan./dez.
13. Tokarnia CH, Döbereiner J, Peixoto PV. *Plantas Tóxicas do Brasil*. Helianthus, Rio de Janeiro. 2000. 310p.
14. Pott A, Pott VJ, Souza TW. *Plantas daninhas de pastagem na região dos cerrados*. EMBRAPA Gado de Corte. Campo Grande, MS. 2006. 336 p. il.
15. Riet-Correa F, Mendez MC, Schild AI. *Intoxicações por plantas e micotoxícoses em animais domésticos*. Montevideo. Editorial Hemisfério Sul. 1993. 340 p.
16. Judd WS, Campbell CS, Kallog EA, Stevens PF, Donoghue MJ, Singer RB, et al. *Sistemática vegetal : um enfoque filogenético*. Porto Alegre: ARTMED. 2009. 612 p.
17. Barbosa LMMA, Dantas IC, Felismino DC, Costa SL. Levantamento taxonômico da família Convolvulaceae no sítio Imbaúba, Lagoa Seca, Paraíba. *Revista de Biologia e Farmácia*. 2012.
18. Metcalfe CR, Chalk L. *Anatomy of the dicotyledons 2*, 2. ed. Oxford Unive. Press, Oxford. 1983.
19. Simão-Bianchini R. Convolvulaceae. In: STANNARD, B.L. (Org.). *Flora of the Pico das Almas – Chapada Diamantina, Bahia, Brazil*. Kew: Royal Botanic Garden. 1995. p 271-281.
20. Simão-Bianchini R, Pirani JR. *Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Convolvulaceae*. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*. 1997. 16:125-149.
21. Cao S, Guzza RC, Wisse JH, Miller JS, Evans R, Kingston DGI. *Ipomoeassins A-E*, cytotoxic macrocyclic glycosides from the leaves of *Ipomoea squamosa* from the Suriname rainforest. *J Nat Prod*. 2005. 68: 487-492.

22. Austin DF, Huáman Z. A synopsis of *Ipomoea* (Convolvulaceae) in the Americas. 1996. *Taxon* 45: 3-38.
23. Meira M, Silva EP, David JM, David JP. Review of the genus *Ipomoea*: Traditional uses chemistry and biological activities. *Rev. Bras. Farm.* 2012. 22(3):682-713, May/Jun.
24. Pereda-Miranda R, Bah M. Biodynamic constituents in the mexican morning glories: purgative remedies transcending boundaries. *Curr Top Med Chem.* 2003. 3: 111-131.
25. Zhao G, Kan J, Li Z, Chen Z. Characterization and immunostimulatory activity of an (1→6)- $\alpha$ -D-glucan from the root of *Ipomoea batatas*. *Int Immunopharmacol.* 2005. 5: 1436-1445.
26. Bovell-Benjamin AC. Sweet Potato: A review of its past, present, and future role in human nutrition. *Adv Food Nutr Res.* 2007. 52: 1-59.
27. Prasad KN, Divakar S, Shivamurthy GR, Aradhya SM. Isolation of a free radical-scavenging antioxidant from water spinach (*Ipomoea aquatica Forsk*). *J Sci Food Agric.* 2005. 85: 1461-1468.
28. Daló N, Moussatché H. Acción tóxica de las plantas del género *Ipomoeas*. Tarea Común. *Rev Universidad Centro Occidental.* 1978. 6: 25-39.
29. Chaves DP. Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* em ovinos: achados clínicos, laboratoriais e anatomopatológicos/Jaboticabal, [Tese] - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo. 2009.
30. Barbosa JD, Oliveira CMC, Duarte MD, Peixoto PV, Tokarnia CH. Intoxicação experimental e natural por *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) em búfalos e outros ruminantes. *Rio de Janeiro: Pesquisa Veterinária Brasileira.* 2005. v.25, n.4, p.231-234.
31. Medeiros RMT, Barbosa RC, Riet-Correa F, Lima EF, Tabosa IM, Barros SS, et al. Tremorgenic syndrome in goats caused by *Ipomoea asarifolia* in Northeastern Brazil. *Toxicon.* 2003. 41: 933-935.
32. Araujo JAS, Riet-Correa F, Medeiros RMT, SoaresMP, Oliveira DM, Carvalho FKL. Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) em caprinos e ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 2008. 28(10):488-494, outubro.
33. Freitas FJC, Lima JM, Gameleira JS, Costa ALF, Câmara ACL, Soto-Blanco B. Surto de Intoxicação por *Ipomoea asarifolia* (Salsa) em cordeiros e cabritos lactentes. *Vet e Zootec.* 2011. 18 (4 supl.3):548.
34. Salles HO, Vasconcelos IM, Santos IFI, Oliveira HD, Costa PPC, Nascimento NRF, et al. Towards a better understanding of *Ipomoea asarifolia* toxicity: Evidence of the involvement of a leaf lectin. *Toxicon, ELSEVIER.* 2011. 58, 502–508.

35. Jenett-Siems K, Kaloga M, Eich . Ergobalansine/ergobalansinine, a proline-free peptide-type alkaloid of the fungal genus *Balansia*, is a constituent of *Ipomoea piurensis*. (Erratum to document cited in CA121:297184). *J Nat Prod.* 2004. 67: 2160.
36. Arenzon A, Neto TJP, Gerber W. Manual sobre toxicidade em efluentes industriais. Porto Alegre: Cespe/Senai de Artes Gráficas Henrique D'ávila Bertaso; 2011.
37. Pires OC, Tarquemasa VC, Akisu G, Oliveira F, Araujo CEP. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) comparativa entre os frutos de Pimenta-do-Reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius Raddi*) e Pimenta do Reino (*Piper nigrum L.*). *Acta Farm. Bonaerense.* 2004. 23 (2): 176-82.
38. Benassi JC. O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluente de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana. [Tese] - Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, 106-f, 2004.
39. Leme DM, Marin-Morales MA. Avaliação da Qualidade de Águas Impactadas por Petróleo por Meio de Sistema - Teste Biológico (*Allium cepa*) - Um Estudo de Caso. Universidade Estadual Paulista (UNESP). 4o PDPETRO, Campinas, SP, 2007. p. 21-24.
40. Fiskejo G. Allium Test II: assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberrations in root tips of *Allium cepa L.* *Environmental toxicology and water quality: An International Journal*, n. 9, 1994. p. 235-241.
41. Silva LPS, Bosso AA, Cardos SC. Avaliação da Citotoxicidade da Própolis em Células Meristemáticas de *Allium cepa*. *UNOPAR Cient. Exatas Tecnol.*, Londrina, 2010. v.9, n.1, p.67-70, nov.
42. Silva PS. Avaliação da toxicidade e genotoxicidade das águas do rio Criciúma (sc) utilizando como organismos bioindicadores *Artemia sp.*, *Daphnia magna* e *Allium cepa l.* [Tese]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC. 2008.
43. Poersch A. Atividade protetora da DCTN (transdesidrocrotonina) na frequência de micronúcleos e apoptose induzidos por diferentes agentes mutagênicos in vitro". [Tese]. Universidade Estadual de Londrina. PR. 2005.
44. Silva GA. Avaliação da genotoxicidade do extrato de *Mikania laevigata* no dano em DNA causado pela exposição aguda a poeira do carvão. [Tese]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC. 2008.
45. Matsumoto ST, Mantovani MS, Malagutti MIA, Dias AI, Fonseca IC, Marin-Morales MA. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion roottips. *Genetics and Molecular Biology.* 2006. v. 29, n. 1, p. 148-158.

46. Antunes IMG, Araújo MCP. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. *Rev. Nutr.* 2000. v. 13, n. 2., p. 81-88
47. Schnaider TB, Souza C. Aspectos éticos da experimentação animal. *Revista Brasileira de Anestesiologia.* 2003. v. 53, n, p. 278-285
48. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The human micronucleus project – an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research.* 1999. v. 428, p. 271-283.

## **2 CAPITULO II - Toxicidade e Citotoxicidade de Extrato Aquoso de *Ipomoea asarifolia***

Trabalho submetido a revista:  
REVISTA CAATINGA  
Página eletrônica:  
<http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/sistema>  
ISSN: 1983-2123

# TOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DE EXTRATO AQUOSO DE *Ipomoea asarifolia*

Eliezer Fernandes da Silva Filho<sup>1</sup>, Naama Jessica de Assis Melo<sup>2</sup>, Edigleyce De Lima Costa<sup>2</sup>, José Carlos da Silveira Pereira<sup>2</sup>, Liz Carolina da Silva Lago Cortês Assis<sup>3</sup>, Marcos Antonio Nobrega de Sousa<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Biotecnologista, Discente do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN. \*Correspondência: Rua Raimundo Cabral, N°33, Abolição, Mossoró-RN. e-mail: fernandes.eliezer@gmail.com

<sup>2</sup> Biotecnologistas, Discentes do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN.

<sup>3</sup> Docente Doutor. Departamento de Ciências Animais – DCAn. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

## RESUMO

A *Ipomoea asarifolia* (salsa) é uma liana perene de hábito rasteiro da família *Convolvulaceae*, sendo considerada uma planta nativa da América tropical. Pode ser consumida por bovinos, caprinos e ovinos do semiárido e promover surtos de intoxicação, isto devido a pouca disponibilidade de outras plantas forrageiras e à capacidade desta em permanecer verde durante todo ano mesmo em meio à seca. Baseado neste princípio, este trabalho objetivou avaliar a toxicidade e citotoxicidade de extrato aquoso de *I. asarifolia* através do sistema teste *Allium cepa* como bioindicador. Foram realizados testes com extratos aquosos de folhas secas e frescas tanto em bulbos como em sementes de *A. cepa* para avaliação da toxicidade e citotoxicidade. Os resultados mostraram que o extrato aquoso de folhas secas e frescas não provocam efeitos tóxicos em bulbos, embora atuem inibindo o crescimento de suas raízes. Não foram encontrados efeitos citotóxicos.

**Palavras chave:** Toxicidade, citotoxicidade, salsa, *Allium cepa*.

## ABSTRACT

The *Ipomoea asarifolia* (salsa) and a perennial liana creeping habit *Convolvulaceae* Family, being considered a plant native to tropical america. Cattle can be consumed por, goats and sheep and semi-arid promote poisoning outbreaks, This is due to low availability of fodder plants and the other capacity this staying in green during all even year amid drought. Based in principle, this work aimed to evaluate the toxicity and aqueous extract of cytotoxicity I do *asarifolia* through system *Allium cepa* test as bioindicators. Were testicles done with aqueous extracts of dried leaves and fresh both bulbs like seeds of. Para rating strain of toxicity and

cytotoxicity. The results showed that the aqueous extract of dried leaves and fresh not cause toxic bulbs in effects, although act by inhibiting the growth of its roots. There where no cytotoxic effects.

**Keywords:** Toxicity, citotoxicity, salsa, *Allium cepa*.

## 2.1 INTRODUÇÃO

A *Ipomoea asarifolia* conhecida popularmente como salsa, batatarana, batata salsa, salsa-brava é uma liana perene de hábito rasteiro da família *Convolvulaceae* (KILL; RANGA, 2003). É considerada uma planta nativa da América tropical e ocorre com frequência nas regiões da América do Sul e América Central (ARAÚJO et al., 2008). No semiárido cresce às margens de açudes e rios, margens de estradas e áreas próximas a reservatórios de água (TOKARNIA et al., 2000).

Nestas regiões, estas plantas são conhecidas por permanecerem verdes durante toda estação seca (RODRIGUEZ, 2006). Essa disponibilidade aliada à escassez de alimentos (baixa disponibilidade de forragem) faz com esta planta componha cerca de 80% da alimentação disponível para os animais (TORTELLI et al., 2008). No entanto, tem sido relatados casos de intoxicações por *Ipomoea* frequentemente em caprinos e ovinos no Nordeste brasileiro (OLIVEIRA et al., 2009). Os sinais clínicos mais comuns em caprinos e ovinos são caracterizados por tremores musculares, hipersensibilidade a ruídos, ataxia, membros abertos e decúbito (BARBOSA et al., 2005).

Além das evidências da toxicidade natural, muitos ensaios toxicológicos podem ser utilizados para determinar o efeito nocivo que agentes físicos, químicos e biológicos podem produzir nos animais (ARRAES; LONGHIN, 2012). O teste de *Allium cepa* é uma das ferramentas úteis para pesquisa básica do potencial tóxico e citotóxico de produtos químicos, substâncias complexas em plantas, dejetos industriais e águas contaminadas (CUCHIARA et al., 2012).

*Allium cepa* é utilizada em ensaios toxicológicos por meio da avaliação de parâmetros macroscópicos como alteração no formato, coloração, deformidades e tamanho da raiz, além de parâmetros microscópicos como aberrações cromossômicas, sendo ainda testes práticos, rápidos e eficientes (LONGHIN, 2008).

Devido a pouca informação referente aos efeitos tóxicos e citotóxicos de *I. asarifolia*, o objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade e citotoxicidade de extrato aquoso dessa espécie tendo como bioindicador o sistema Teste *Allium cepa*.

## **2.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.2.1 Coleta de material vegetal e obtenção do extrato aquoso de *Ipomoea asarifolia***

As amostras de folhas de *I. asarifolia* foram coletadas no município de Angicos, na fazenda Vista Bela no período seco do ano de 2014. A identificação botânica foi obtida no herbário Dardano de Andrade-Lima da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), sob o código 14524 (Ver anexo I). O material foi acondicionado à temperatura ambiente em sacos plásticos e transportado para armazenamento no Laboratório de Genética e Evolução (UFERSA).

O extrato aquoso do material vegetal seco foi obtido conforme Torres (2006) com modificações, onde folhas frescas de *I. asarifolia* foram selecionadas, desidratadas em bancada ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e trituradas em liquidificador até formação de pó fino. O extrato final foi obtido pela adição de água destilada (10g de pó misturados em 100 ml de água destilada), a mistura posta em descanso por 24 horas. Posteriormente filtrada em tecido organza, centrifugada a 2000 rpm por cinco minutos e estocada a  $5^{\circ}\text{C}$ .

O extrato aquoso do material vegetal fresco de *I. asarifolia* foi obtido conforme Barbosa (2008) com modificações. Foram utilizadas folhas frescas (100g), lavadas e homogeneizadas (Liquidificador comum) em 1000 mL de água destilada por 10 minutos. O material foi seguido por filtragem em tecido organza e centrifugação (30 minutos; 2000 rpm). O sobrenadante foi estocado a  $5^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.2 Avaliação da toxicidade de extrato aquoso de *Ipomoea asarifolia* em bulbos de *Allium cepa***

A avaliação de toxicidade com bulbos de *Allium cepa* foi realizada a partir do extrato seco e do extrato fresco das folhas de *Ipomoea asarifolia* conforme Fiskesjo (1988), com algumas modificações.

Os bulbos foram obtidos comercialmente em supermercados na cidade de Mossoró-RN e armazenadas em local livre de umidade e luz, lavados para retirada de impurezas em água corrente por 1 hora, seguido de remoção das raízes velhas (com aparência seca).

Os bulbos foram colocados em recipientes plásticos com capacidade para 50 ml de extrato. A distribuição feita em grupos com diferentes concentrações do extrato (5mg/L,

50mg/L e 300mg/L), controle negativo “C-“ (água destilada), sendo avaliado seis cebolas por tratamento.

Ao final do teste (72h), foi realizada a medição do comprimento das três maiores raízes de cada bulbo da cebola utilizando-se de um paquímetro digital. Foi calculado o Índice de Crescimento Relativo (ICR) conforme Iganci et al., (2006). O cálculo foi feito seguindo a equação a seguir:  $ICR = CRA / CRC$ . Onde, CRA é o Comprimento da Radícula na Amostra, CRC é o Comprimento da Radícula no Controle Negativo.

### **2.2.3 Ensaio de citotoxicidade da *Ipomoea asarifolia* com bulbos de *Allium cepa*.**

A citotoxicidade da *I. asarifolia* foi determinada através da avaliação do índice mitótico de células meristemáticas das raízes obtidas dos bulbos de cebola, expostos tanto ao extrato seco, como ao fresco de *I. asarifolia*. Para a determinação do índice mitótico, foi realizada a técnica de esmagamento descrita por Guerra e Souza (2002) com modificações. As radículas dos bulbos foram coletadas e fixadas em Carnoy (3:1, álcool etílico:ácido acético) por 24 horas e armazenadas em geladeira.

No material analisado foi realizada a lavagem com água destilada por 5 minutos; seguidas por lavagem em ácido clorídrico (HCl, 0,1N) por 11 minutos, e banho maria à 60°C seguido por três lavagens sucessivas com água destilada. Três radículas foram transferidas posteriormente, para lâmina de microscopia para seleção da coifa utilizando lupa binocular; em seguida foi realizada a coloração com Orceína acética (2%) e esmagamento da coifa por lâminula para observação em microscópio óptico.

A análise foi realizada por teste cego de 1000 células por bulbo. O índice mitótico foi avaliado conforme KUMARI, MUKHERJEE e CHANDRASEKARAN (2009). O valor limite de citotoxicidade foi determinado conforme MIGID, AZAD e IBRAHIM (2007), de acordo com a equação a seguir: Valor limite da citotoxicidade =  $IMA / IMC \times 100$ . Onde, IMA é o índice mitótico da amostra, IMC é o índice mitótico do controle negativo.

### **2.2.4 Análise estatística**

Os dados de crescimento de raízes e germinação foram obtidos através da comparação das amostras com o controle negativo pela Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ). O índice mitótico foi avaliado por Análise de Variância (ANOVA)

seguida do teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Estas análises foram realizadas com o auxílio do software R 3.2.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de toxicidade para avaliar diferentes concentrações dos extratos aquosos de folhas secas e frescas de *Ipomoea asarifolia* sobre bulbos de cebola, representado pelo teste de inibição do crescimento de raízes, com Média  $\pm$  Desvio Padrão ( $M \pm SD$ ) está expresso na tabela 1 e figura 1.

O resultado obtido pelo teste de Dunnet para o extrato obtido de folhas secas indicou que o controle negativo apresentou maior valor que todos os outros tratamentos. A concentração que apresentou maior valor foi a de 50 mg/L e a menor a de 5 mg/L. Mas não houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as três diferentes concentrações de extrato, Tabela 1.

Já os dados referentes ao extrato de folhas frescas revelaram que as concentrações de 5 mg/L e 300 mg/L não apresentaram diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo. Além disso, os extratos de folhas frescas nas concentrações de 5 mg/L e 300 mg/L apresentaram um antagônico efeito estimulante no crescimento de raízes. Tabela 1.

A tabela 1 também mostra o comparativo do potencial inibitório relativo do crescimento das raízes nas concentrações expostas em função do controle negativo (C-).

Observa-se que houve redução do crescimento das raízes nas diferentes concentrações quando comparadas ao controle negativo, indicando que as concentrações do extrato de folhas secas causaram toxicidade em bulbos. Enquanto que com a exposição ao extrato de folhas frescas de *I.asarifolia* houve estímulo ao crescimento nas concentrações de 5 mg/L e 300 mg/L, contudo houve inibição do crescimento na concentração de 50 mg/L.

**Tabela 1** Inibição relativa de raiz de *Allium cepa* L. expostas ao controle negativo e positivo e diferentes concentrações de extrato aquoso de folhas secas (EFS) e frescas (EFF) de *Ipomoea asarifolia*. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão a ( $p < 0,05$ ) diferença estatística significativa entre as concentrações de extrato frente ao controle negativo. Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet.

Concentração (mg/L)	Comprimento Médio Raiz (mm)		Inibição Relativa	
	EFS	EFF	EFS	EFF
Controle -	26,9 <sup>ns</sup> $\pm$ 15,3	7,9 <sup>ns</sup> $\pm$ 10,15	100	100
5 mg/L	16,2 <sup>ns</sup> $\pm$ 14,3	12,5 <sup>ns</sup> $\pm$ 13,7	39,7	-59,4
50 mg/L	22,5 <sup>ns</sup> $\pm$ 16,0	2,3 <sup>ns</sup> $\pm$ 2,95	16,3	71
300 mg/L	18,4 <sup>ns</sup> $\pm$ 11,0	8,9 <sup>ns</sup> $\pm$ 7,68	31,4	-13,1

ns = não significante

Os bulbos (*A. cepa*) de um material vegetal maduro, com possível exposição a agrotóxicos e poluentes, podem apresentar compostos químicos diferenciados que interagem com os compostos alelopáticos presentes em um extrato aquoso como o de folhas frescas de *I. asarifolia*, de forma a promover assim, estimulação do crescimento das raízes. Ferreira (2000) aponta os compostos alelopáticos como substâncias solúveis em água, produzidas por uma determinada planta capazes de interferir no desenvolvimento de outras plantas.

Conforti (1992), por sua vez, aponta a antocianina presente em *Ipomoea batatas* como uma das substâncias que podem exercer influência no crescimento de células meristemáticas de cebola. Ghani (1998) revela, por sua vez, a presença de substâncias do tipo alcaloides em outras espécies do gênero *Ipomoea*, como a *I. quamoclit* e *I. hederacea*. Tewari (1964) mostra ainda que substâncias como  $\beta$ -Sitosterol e saponinas podem ter algum efeito inibitório em cebolas. Schwarz (2004) aponta que em *Ipomoea carnea*, alcaloides swainsonina e calesteginas são os principais princípios ativos e, certamente, responsáveis por efeitos tóxicos desta espécie.

Tirkey et al. (1988) em seus estudos fitoquímicos com extratos da *I. carnea*, encontrou alcaloides no extrato aquoso e no etéreo, além de glicosídeos e taninos apenas no extrato aquoso. Ainda conforme este autor, os compostos como a antocianina, os taninos e os alcaloides são produtos do metabolismo secundário da planta sendo atuantes na defesa contra pragas e doenças, além de serem solúveis em água. Como foi utilizado extrato aquoso para análise dos dados tais compostos alelopáticos podem ter sido preservados nas amostras avaliadas.

Compostos alcaloides são compostos que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo por muitas vezes utilizados como venenos ou alucinógenos. Tais fatos podem justificar os efeitos tremorgênicos e alucinógenos em caprinos e ovinos que consumirem a *Ipomoea asarifolia* (LOPES et al., 2014).

Goldfarb et al. (2009); e Chon (2005) observaram que os compostos alelopáticos, ao serem produzidos em quantidades suficientes, podem inibir ou estimular a germinação de sementes, o crescimento de raízes e/ou desenvolvimento de plantas.

Para o ensaio de citotoxicidade foi avaliado o índice mitótico (IM) de células da raiz de bulbos de *A. cepa* com o grupos controle e as concentrações de 5 mg/L, 50 mg/L e 300 mg/L de extratos aquosos de folhas secas e frescas de *I. asarifolia* expressos pelo IM (%) e Valor Limite de Toxicidade (%) na tabela 2.

A estatística foi realizada pela Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste de Dunnet para múltiplas comparações ( $p < 0,05$ ) para o extrato de folhas secas e pelo teste de Kruskal-Wallis para extrato de folhas frescas de *I. asarifolia*.

O teste estatístico ( $p < 0,05$ ) mostrou-se não significativo para os extratos, revelando que o efeito das diferentes concentrações não alterou o processo de divisão celular em raízes de *Allium cepa*.

**Tabela 2** Índice Mitótico (IM%) e Valor Limite de Toxicidade de células de raiz de *Allium cepa* após exposição ao extrato aquoso de folhas secas (EFS) e frescas (EFF) de *Ipomoea asarifolia*.

Extrato	Concentração	IM (%)	Total de Células por fase de Divisão Celular				Valor Limite de citotoxicidade (%)
			Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	
Folhas Secas	Controle -	$2,35 \pm 0,68^{ns}$	$6,5 \pm 2,12$	$8,0 \pm 1,41$	$5,5 \pm 3,54$	$3,0 \pm 2,83$	-
	5 mg/L	$1,40 \pm 0,64^{ns}$	$7,75 \pm 9,90$	$0,50 \pm 0,71$	$0,5 \pm 0,71$	$0,5 \pm 0,71$	44,3 es
	50 mg/L	$2,14 \pm 1,68^{ns}$	$7,50 \pm 4,95$	$5,5 \pm 4,95$	$6,0 \pm 8,49$	$5,5 \pm 6,36$	91,1
	300 mg/L	$0,90 \pm 1,04^{ns}$	$5,0 \pm 1,41$	$4,5 \pm 4,94$	$4,5 \pm 2,12$	$4,5 \pm 3,53$	38,3 es
Folhas Frescas	Controle -	$1,9 \pm 0^{ns}$	$1,5 \pm 0,71$	$3,5 \pm 2,12$	$1,5 \pm 0,71$	$3,0 \pm 1,41$	-
	5 mg/L	$2,60 \pm 0,75^{ns}$	$8,0 \pm 2,83$	$5,5 \pm 3,54$	$10,5 \pm 3,54$	$5,5 \pm 2,12$	137
	50 mg/L	$2,05 \pm 0,78^{ns}$	$5,5 \pm 4,95$	$3,5 \pm 0,71$	$2 \pm 1,41$	$1 \pm 1,41$	108
	300 mg/L	$2,20 \pm 0,36^{ns}$	$8,5 \pm 0,70$	$6 \pm 1,41$	$4 \pm 2,82$	$3 \pm 1,41$	116

ns = não significante, es = efeito subletal

Para a avaliação dos Valores Limites de Citotoxicidade, os percentuais abaixo de 50% denotam efeito subletal e inferiores a 22% letal (MIGID; AZAB, 2007).

Foi observado que não houve efeito letal em nenhum tipo de extrato (EFS e EFF). Entretanto, foi demonstrado efeito subletal em bulbos expostos ao extrato de folhas secas (5 mg/L com percentual de 44,3 e 300 mg/L com percentual de 38,3).

Em contato com produtores da região em conversas informais foi observado que os mesmos indicam que se for feito o feno de folhas secas, a salsa pode ser servida aos animais de produção, os resultados obtidos neste trabalho são contrários a esta informação.

A figura 5 mostra as fases de divisão celular (interfase, profase, metáfase, anáfase e telófase) estudadas neste trabalho obtidas em células de raízes de *Allium cepa* expostas ao extrato aquoso de folhas secas e frescas de *Ipomoea asarifolia*.

**Figura 5** Células em Intérfase (A), Prófase (B), Metáfase (C), Anáfase (D) e Telófase (E) de células de raízes de *Allium cepa* expostas ao extrato aquoso de folhas de *Ipomoea asarifolia*.



### 3.1 CONCLUSÕES

- Os extratos aquosos de folhas secas (EFS) e frescas (EFF) de *I. asarifolia* não apresentaram efeitos tóxicos nem citotóxicos em raízes de bulbos de *Allium cepa*.
- Foram observados efeitos alelopáticos nos crescimentos de raízes.
- Os extratos aquosos de folhas secas apresentaram efeitos subletais nas concentrações de 5mg/L e 300mg/L. E o das folhas frescas apresentaram efeitos estimulatórios em todas as concentrações estudadas.
- Os resultados vão de encontro ao conhecimento dos produtores no qual as folhas secas não prejudicam o animal de produção.
- Estudos posteriores são necessários para verificar se existe uma relação dose-resposta entre as concentrações e os efeitos observados.

### 3.2 REFERÊNCIAS

ARAUJO, J. A. S. et al. Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* (*Convolvulaceae*) em caprinos e ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 28(10):488-494, outubro, 2008.

ARRAES, A. I. O.; LONGHIN, S. R. Otimização de ensaio de toxicidade utilizando o bioindicador *Allium cepa* como organismo teste. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p.1958. 2012.

BARBOSA, D. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae)**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

BARBOSA, J. D. et al. Intoxicação experimental e natural por *Ipomoea asarifolia* (*Convolvulaceae*) em búfalos e outros ruminantes. Rio de Janeiro: **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.4, p.231-234, 2005.

BRAINE, J. W. Germinação de sementes de alface na presença de acículas de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae). **Estud. Biol.**, v. 32-33, n. 76-81, p. 67-72, 2010.

CHON, S. U. et al. Allelopathic potential in lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants. **Scientia Horticulture**. v.106, p. 309-317. 2005.

CONFORTI, N. P.; SCERBAKO, V. K. Control of natural mutation process by means of cysteamine and streptomycin. **Proc. Acad. Sci. USSR.**, 145: 427-429. 1962.

CUCHIARA, C.C.; BORGES, C.S.; BOBROWSKI, V.L. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v .6, n.1, p.33-38, mar. 2012.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p. 175-204. 2000.

FISKEJO, G. The *Allium* test: An alternative in environmental studies: The relative toxicity of metal ions. **Mutat. Res.**, v. 197, p. 243-269, 1988.

GHANI, A. Medicinal Plants of Bangladesh (Chemical Constituents and Uses). **Dhaka: Asiatic Society of Bangladesh**, pp: 201-204. 1998.

GOLDFARB, M.; PIMENTEL, L. W.; PIMENTEL, N. W. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. **Tecnol. & Cienc. Agropec.**, João Pessoa, v.3, n.1, p. 23-28, fev. 2009.

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

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.

KIILL, L. H. P.; RANGA, N. Ecologia da polinização de *Ipomoea asarifolia* (ders.) Roem. & schult. (Convolvulaceae) na região semi-árida de Pernambuco. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 17, n. 3, p. 355-362, 2003.

KUMARI, M.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. **Science of the Total Environment**, n.407, p.5243–5246, 2009.

LONGHIN, S. R. **Estudo da degradação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampicilina e avaliação da toxicidade e biodegradabilidade dos seus produtos**. Tese de Doutorado submetida ao Programa de Doutorado em Química, do Instituto de Química da Universidade de Brasília. 2008.

LOPES, J. R. G. et al. Administração de diferentes concentrações de folhas de *Ipomoea asarifolia* na ração de camundongos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.5, p. 872-877, mai, 2014.

MIGID, H. M. A.; 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.6, n.1, p.57-64. 2007.

MIGID, H. M. A.; 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.6, n.1, p. 57-64. 2007.

OLIVEIRA, C. A. et al. Intoxicação por *Ipomoea carnea subsp. Fistulosa* (Convolvulaceae) em caprinos na Ilha do Marajó, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 7, p. 583-588, 2009.

RODRÍGUEZ, J. L. R. **Expressão da proteína Fos em cérebro de ratos expostos ao labirinto em cruz elevado na presença e ausência de iluminação**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

SCHWARZ, A. et al. Identificação de princípios ativos presentes em *Ipomoea carnea* brasileira. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 40, n.2, abr./jun., 2004.

TEWARI, J. P.; DATTA, K. C.; MISHRA, S. S. Phytochemical and Pharmacological investigations of *Ipomoea carnea* leaves. **Sci. Technol.** 1964.

TIRKEY, K. et al. Pharmacological study of *Ipomoea carnea*. **Indian Veterinary Journal**. v.65, p. 206-210, 1988.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Plantas Tóxicas do Brasil. Rio de Janeiro: **Helianthus**, 320 p. 2000.

TORRES, A. L.; BOIÇA, J. R. A. L.; MANFRÉ, C. A. M.; BARROS, R. Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. **Bragantia**, v. 65, p. 447-457, 2006.

TORTELLI, F. P. Y. Intoxicação por *Ipomoea asarifolia* em ovinos e bovinos na Ilha de Marajó. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 12, p. 622-626, 2008.

#### **4 CAPÍTULO III - Avaliação Mutagênica e Citotóxica de Extrato Aquoso de *Ipomoea asarifolia* (SALSA) em Camundongos (*Mus musculus*).**

Trabalho submetido a revista:

REVISTA CAATINGA

Página eletrônica:

<http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/sistema>

ISSN: 1983-2123

# AVALIAÇÃO MUTAGÊNICA E CITOTÓXICA DE EXTRATO AQUOSO DE *Ipomoea asarifolia* (SALSA) EM CAMUNDONGOS (*Mus musculus*).

Eliezer Fernandes da Silva Filho<sup>1</sup>, Naama Jessica de Assis Melo<sup>2</sup>, Edigleyce De Lima Costa<sup>2</sup>, José Carlos da Silveira Pereira<sup>2</sup>, Carlos Campos Camara<sup>3</sup>, Marcos Antonio Nobrega de Sousa<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Biotecnologista, Discente do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN. \*Correspondência: Rua Raimundo Cabral, N°33, Abolição, Mossoró-RN. e-mail: fernandes.eliezer@gmail.com

<sup>2</sup> Biotecnologistas, Discentes do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN.

<sup>3</sup> Docente Doutor. Departamento de Ciências Animais – DCAn. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

## RESUMO

A *Ipomoea asarifolia*, (*Convolvulaceae*), popularmente conhecida como salsa, batata salsa, salsa brava é uma liana perene de hábito rasteiro. Encontrada por toda América do Sul, é caracterizada por permanecer sempre verde, mesmo em época de estiagem. Após ingestão por animais, pode causar distúrbios de ordem nervosa e morte. A avaliação de toxicidade aguda é utilizada para verificar e classificar substâncias quanto à sua capacidade de provocar danos agudos aos organismos vivos. O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos citotóxicos e mutagênicos do extrato aquoso de folhas frescas de *I. asarifolia* em camundongos swiss (*Mus musculus*) através da avaliação da frequência de micronúcleos e células binucleadas. Também foi avaliada a dose letal mediana (DL50), a variação do peso entre os gêneros e a análise de screening hipocrático comportamental. Os resultados revelaram que a DL50 para o extrato de folhas frescas foi 754,26 mg/Kg; O extrato de *I.asarifolia* não provocou efeitos mutagênicos e citotóxicos; As concentrações de 300 mg/Kg e 600 mg/Kg de extrato de *I. asarifolia* promoveram significativa perda de peso.

**Palavras chaves:** Mutagenicidade, citotoxicidade, micronúcleo, salsa.

## ABSTRACT

The *Ipomoea asarifolia* (*Convolvulaceae*), popularly known as salsa, parsley potatoes, salsa brava is a perennial vine in a prostrate habit. Found throughout South America, is

characterized by always remain green even in the dry season. After animals if swallowed, can cause nervous disorders and death order. The assessment of acute toxicity is used to identify and classify substances for their ability of causing acute damage to living organisms. The objective of this study was to determine the cytotoxic and mutagenic effects of aqueous extract of fresh leaves of *I. asarifolia* in swiss mice (*Mus musculus*) by evaluating the frequency of micronuclei and binucleated cells. The results revealed that the LD50 for the extract of fresh leaves was 754.26 mg/kg; The *I.asarifolia* extract did not cause mutagenic and cytotoxic effects; The concentrations of 300 mg/kg and 600 mg/kg of *I.asarifolia* extract caused significant weight loss.

**Keywords:** Mutagenicity, cytotoxicity, micronucleus, salsa.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

A *Ipomoea asarifolia*, da família *Convolvulaceae*, popularmente conhecida como salsa, batata salsa, salsa brava é uma liana perene de hábito rasteiro (KILL, 2003). É uma planta nativa da América tropical, principalmente encontrada nas regiões da América do Sul e Central (ARAÚJO 2008). No Brasil, esta espécie é encontrada nas regiões da Amazônia e por todo litoral Norte, Nordeste e Sudeste (KISSMAN; GROTH, 1992). Segundo Tokarnia (2000), são encontradas facilmente às margens de rios, lagoas, praias, terrenos abandonados e margens das estradas.

A *I. asarifolia* é conhecida por causar a síndrome tremorgênica em ovinos (GUEDES, 2007), caprinos (MEDEIROS, 2003; ARAUJO, 2008), bovinos e bubalinos (BARBOSA, 2005). Esta intoxicação, comum nas regiões Nordeste (MEDEIROS, 2003) e Norte (BARBOSA, 2005) é caracterizada por tremores na cabeça e pescoço, inicialmente finos e discretos, com balançar da cabeça; com tempo prolongado de intoxicação pode promover ataxia cerebelar com tremores severos, andar incoordenado com rigidez dos membros e membros abertos (LOPES, 2014). A maioria dos casos não apresenta lesões histológicas, embora algumas manifestações clínicas prolongadas apresentem degeneração e perda das células de Purkinje com presença de esferoides axonais na camada granular do cerebelo (GUEDES, 2007).

A metodologia para a avaliação de toxicidade aguda é utilizada para verificar e classificar substâncias quanto à sua capacidade de provocar danos agudos aos organismos vivos quando administrados em altas doses, tais como distúrbios anatomopatológicos e

letalidade. Tais metodologias podem estabelecer ainda parâmetros de segurança juntamente com dados de toxicidade (VALADARES, 2006; ZATTA et al., 2009).

É útil a identificação de efeitos tóxicos que os vegetais possam causar e assim desmistificar o equívoco da população em acreditar que os produtos naturais são desprovidos de efeitos tóxicos ou adversos (MARLIÉRE et al., 2008; SILVEIRA et al., 2008; CUNHA et al., 2009).

Os estudos epidemiológicos e laboratoriais vêm demonstrando que produtos vegetais podem exercer efeitos tóxicos pela produção de metabólitos secundários, causando desde resistência vascular até teratogenicidade em embriões de roedores (LATHER, 2011; OUEDRAOGO, 2012; CUNHA, 2013).

O objetivo deste trabalho foi verificar os possíveis efeitos citotóxicos e mutagênicos do extrato aquoso de folhas frescas de *Ipomoea asarifolia* em camundongos swiss (*Mus musculus*) através da avaliação da frequência de micronúcleos e células binucleadas, estabelecer a Dose Letal Mediana (DL50) e avaliar o screening hipocrático comportamental.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Coleta e obtenção do extrato aquoso de *Ipomoea asarifolia*.**

O material vegetal da espécie *Ipomoea asarifolia* foi coletado na fazenda Vista Bela, município de Angicos-RN, no período seco de 2014. Foi acondicionado à temperatura ambiente em sacos plásticos e armazenado no laboratório de Genética e Evolução - LAGENE/UFERSA. A espécie foi identificada pelo Herbário Dardano de Andrade-Lima da Universidade Federal Rural do Semiárido, sob código 14524 (Ver anexo 1).

Para obtenção do extrato aquoso fresco foi utilizada metodologia conforme Barbosa (2008) com modificações. Foram utilizadas amostras de folhas frescas (100g), lavadas e homogeneizadas (liquidificador comum) em 1000 mL de água destilada por 10 minutos. O material em seguida foi filtrado em tecido organza e centrifugado (30 minutos; 2000 rpm). O sobrenadante final retirado foi estocado a 5°C.

### **4.2.2 Utilização dos animais.**

Foram utilizados 60 camundongos da linhagem Swiss (*Mus musculus*) com peso entre 25-50g, subdivididos entre machos e fêmeas, com 30 exemplares cada. Todos os animais foram obtidos do biotério da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e mantidos no biotério

do laboratório de Farmacognosia e Farmacologia da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) em caixas de polipropileno, com temperatura controlada ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro/escuro natural, além de alimentação com ração padrão e água mineral disponível à vontade no período de adaptação (94h) e experimentação.

Os preparativos para período pré-experimentação foram realizados conforme Lucio (2000). O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) (Nº Parecer 27/2014), ver anexo II. Os animais foram tratados conforme os princípios definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e em conformidade aos preceitos da legislação brasileira (Lei Arouca - Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008).

### **4.2.3 Obtenção da Dose Letal Mediana (DL50)**

A dose letal mediana (DL50) foi obtida conforme *Acute Toxic Class Method* (OECD, 2001) pelo teste de dose aguda tóxica (Guideline 423), utilizando-se três níveis de dose (5, 50 e 300 mg/kg de extrato) além de uma dose extra de 600 mg/Kg.

30 animais, 15 machos e 15 fêmeas foram divididos em cinco grupos.: controle negativo (C-) com animais que receberam solução salina 0,9% (m/v), i.p., com volume de 10 ml/kg de peso corporal, conforme Lucio et al. (2000); e mais os quatro grupos que receberam doses de 5mg/L (5), 50mg/L (50), 300mg/L (300) e 600 mg/kg (600) do extrato aquoso de *Ipomoea asarifolia*, respectivamente.

A solução salina e o extrato aquoso foram administrados intraperitonealmente em dose única para todos os tratamentos. Os parâmetros para toxicidade aguda foram monitorados pelo registro do número de mortes de animais em cada grupo.

### **4.2.4 Avaliação de mutagenicidade**

#### **4.2.4.1 Grupos experimentais**

O desenho experimental foi constituído de cinco grupos de animais, com seis animais (três machos e três fêmeas), cada um, totalizando 30 camundongos. Foram testadas três doses do extrato, com os grupos tratados da seguinte forma: controle negativo (solução salina a 0,9% por 10 ml/Kg); 5 (concentração de 5 mg/kg de extrato aquoso de *I. asarifolia*); 50 (concentração de 50 mg/Kg de extrato aquoso de *I. asarifolia*); e 300 (concentração de 300

mg/Kg de extrato aquoso de *I. asarifolia*). A administração das soluções foi realizada intraperitonealmente. Os animais foram sacrificados, 24 horas após aplicação dos tratamentos.

#### 4.2.4.2 Análise de Micronúcleo e Células Binucleadas

Foram preparados esfregaços de material da medula óssea em duas lâminas de microscopia por animal, que foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa, conforme técnica de Schmid (1976), modificada por Zambrano et al. (1982). Em seguida foi realizada a análise em teste cego de 2000 eritrócitos por animal. A análise foi realizada em microscópio óptico da marca Nikon com lente de imersão (1000X) e com uso de câmera digital Sony (com resolução de 12 megapixels).

#### 4.2.5 Screening Hipocrático

Os animais foram observados ao longo do tempo do experimento. Nos períodos pós-aplicação, por 24 horas, 48 horas e diariamente até o 14º dia, objetivando quantificar os efeitos dos seguintes parâmetros: a) Atividade geral b) Estado consciente/disposição; c) Atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular; d) Reflexos; e) Atividade do sistema nervoso central (OECD, 2001).

#### 4.2.6 Análises estatísticas

A estatística para avaliação da dose letal mediana (DL50) foi realizada pelo método clássico de regressão linear segundo descrito por Litchifield e Wilcoxon (1949).

A análise estatística para o teste do micronúcleo e células binucleadas foi realizada através da comparação entre a frequência de micronúcleos e as diferentes concentrações (tratamentos) com o uso da Análise de Variância (ANOVA),  $p < 0,05$  e posterior aplicação do teste Kruskal-Wallis e Dunnet utilizando o software R 3.2.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

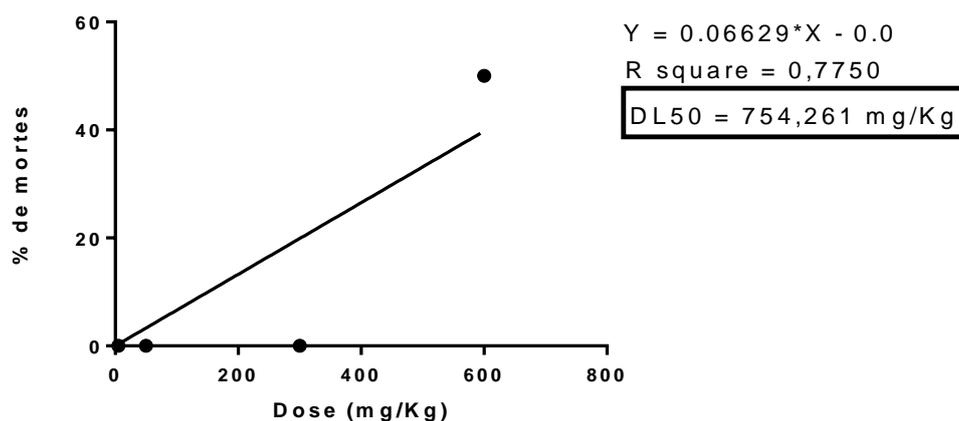
A tabela 3 mostra a quantidade de camundongos mortos durante o teste de dose letal mediana, estes dados estão expressos pela quantidade de machos e fêmeas mortos de acordo as respectivas concentrações.

**Tabela 3** Número de mortes de camundongos expressos pela quantidade de mortes por sexo de animais durante o teste de Dose Letal Mediana (DL50).

Concentração (mg/Kg)	Machos	Fêmeas	Total
Controle	0/3	0/3	6
5	0/3	0/3	6
50	0/3	0/3	6
300	0/3	0/3	6
600	2/3	1/3	6

Observa-se que não houve mortes no grupo controle e nas concentrações de 5, 50 e 300 mg/Kg. Entretanto na concentração de 600 mg/Kg ocorreu toxicidade letal provocando a morte de 50% do total de animais deste grupo (machos e fêmeas). Foi realizada a análise de variância ANOVA seguida do teste de Tukey para múltiplas comparações ( $p < 0,05$ ) e o resultado confirma elevado índice de mortes na concentração de 600 mg/Kg.

**Figura 6** Dose letal mediana de extrato aquoso de folhas frescas de *Ipomoea asarifolia* administrado intraperitonealmente a camundongos nas concentrações 5 mg/Kg, 50 mg/Kg, 300 mg/Kg e 600 mg/Kg. Regressão linear da dose-resposta:  $r = 0,7750$  e  $y = 0,06629 * X - 0,0$ .  $n = 4$ .



Pelo resultado da análise de regressão linear foi determinado o valor da DL<sub>50</sub> para *I. asarifolia* como 754,26 mg/Kg (Figura 6). Esses dados se aproximam dos resultados obtidos por Lawal (2010), que apresentou DL<sub>50</sub> no valor de 774.6 mg/Kg<sup>-1</sup> em camundongos utilizando extrato aquoso de *I. asarifolia*, obtido da parte aérea de plantas coletadas na Nigéria.

As diferenças referentes à Dose Letal Mediana podem ser devidas as características inerentes às plantas como sua composição química, influências biogeográficas, pela parte da planta utilizada para o preparo do extrato, e entre outros fatores, como o solvente utilizado na preparação do extrato (HURST, 1942; OELRICHS, 1985).

Também foi avaliada a diferença de peso entre os sexos dos camundongos (Tabela 4) para verificar se o extrato aquoso fresco de *I. asarifolia* pode ser influenciado pelo fator sexo.

A estatística foi realizada pelo método Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunnett para múltiplas comparações ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4** Peso (g) médio de camundongos submetidos ao extrato de folhas frescas de *Ipomoea asarifolia*.

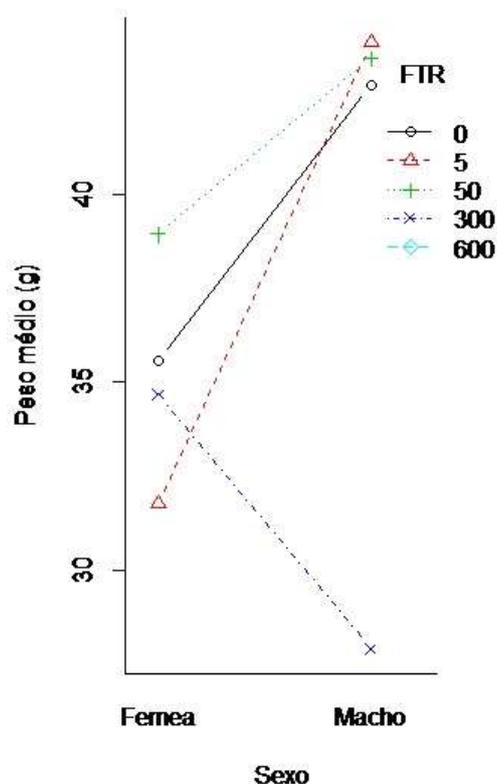
-	Animal	Peso (g) - Fêmeas	Peso (g) - Machos	Média por Tratamento	
				Fêmeas	Machos
<b>Tratamento Controle</b>	AI	36,1	42,9	35,6	42,9
	AII	34,8	43,2		
	AIII	35,8	42,4		
<b>Tratamento 5 mg/Kg</b>	AI	28,7	45,2	32	43,6
	AII	35,5	43,2		
	AIII	31,7	42,6		
<b>Tratamento 50 mg/Kg</b>	AI	38,1	43,6	38,6	43,5
	AII	41,9	42,8		
	AIII	35,8	44,2		
<b>Tratamento 300 mg/Kg</b>	AI	35,9	28,7	34,4	30,9
	AII	32,4	31		
	AIII	34,8	33		
<b>Tratamento 600 mg/Kg</b>	AI	31,3	35	32,9	39,2
	AII	36,1	40,3		
	AIII	31,2	42,5		

A análise estatística ( $p < 0,05$ ) mostra que não há influência do gênero (macho ou fêmea) na toxicidade perante a exposição dos animais a diferentes concentrações de extrato aquoso fresco de *Ipomoea asarifolia*.

A Figura 7 mostra a interação entre os pesos médios de camundongos machos e fêmeas submetidos ao extrato aquoso de folhas frescas de *I. asarifolia*, revelando que houve interação entre os gêneros somente na concentração de 50 mg/Kg, embora o resultado não seja estatisticamente significativo.

Foi realizada a avaliação da frequência de micronúcleos. A análise estatística realizada pela Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ), revelou que não houve diferenças estatísticas significativas em nenhuma concentração.

**Figura 7** Interação entre pesos médios de camundongos machos e fêmeas expostos ao extrato aquoso de folhas frescas de *Ipomoea asarifolia*.



A análise da Tabela 5 revela que a presença de micronúcleos foi maior em exemplares machos nas concentrações de 50 mg/Kg e 400 mg/Kg, o que pode indicar maior sensibilidade à exposição do extrato aquoso de folhas frescas de *I.asarifolia* sob condições experimentais.

**Tabela 5** Média de Micronúcleos em células de camundongos expostos ao extrato aquoso de folhas frescas de *Ipomoea asarifolia* em diferentes concentrações.

Média de Micronúcleos			
Tratamento	Macho	Femea	Total
Controle -	2,5 ± 2,1 <sup>ns</sup>	3,5 ± 1,4 <sup>ns</sup>	3 ± 1,8
5	2,2 ± 2,4 <sup>ns</sup>	1,75 ± 1,2 <sup>ns</sup>	2,2 ± 1,8
50	3,8 ± 2,2 <sup>ns</sup>	3,5 ± 1,2 <sup>ns</sup>	3,6 ± 2,4
400	2,8 ± 1,7 <sup>ns</sup>	2,6 ± 1,0 <sup>ns</sup>	2,7 ± 1,4

ns = não significante.

A análise de micronúcleo é o principal teste *in vivo* em uma bateria de testes genotóxicos, sendo recomendado por agências fiscalizadoras em todo mundo como parte da avaliação de segurança de compostos químicos e naturais (MAGALHÃES et al., 2010).

Os micronúcleos em eritrócitos jovens surgem geralmente a partir de fragmentos acêntricos ou cromossomos que são incapazes de migrar seguindo o fuso mitótico ao longo da divisão celular do tecido hematopoiético (OUANES et al., 2003). Um aumento na frequência de micronúcleos em testes com animais tratados com diferentes substâncias é uma clara indicação de dano cromossômico induzido (HAYASHI et al., 2000).

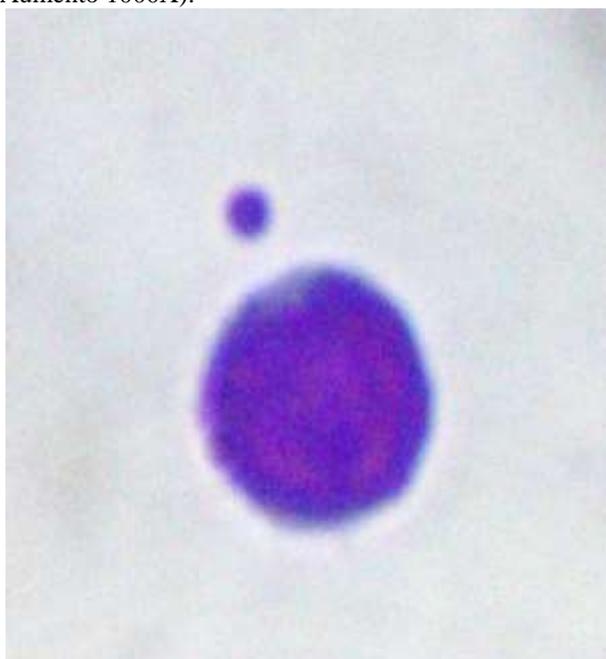
A figura 8 mostra um eritrócito apresentando micronúcleo de camundongo exposto ao extrato aquoso fresco de *I. asarifolia*. No entanto, os resultados deste trabalho indicam que os componentes encontrados nestes extratos não causaram, estatisticamente, um aumento significativo no número médio de células com micronúcleos quando administradas as doses de 5 mg/Kg, 50 mg/Kg e 400 mg/Kg nas condições experimentais utilizadas.

Ghani (1998) revela que na espécie *Ipomoea batatas* existe presença de substâncias do tipo alcaloides. Schwarz (2004), por sua vez, aponta que em *Ipomoea carnea*, os alcaloides swainsonina e calesteginas são os principais princípios ativos e, certamente, responsáveis pelos efeitos tóxicos que as mesmas produzem. A swainsonina inibe a atividade da  $\alpha$ -manosidase de forma intensa quando consumida de maneira contínua e prolongada (BALOGH et al., 1999). O acúmulo desta substância pode ser responsável por lesões histológicas, onde é comum a vacuolização das células de Purkinje e esferoides axonais na camada granular do cerebelo (DORLING et al., 1980). Estas lesões estão relacionadas à sintomas como alterações de equilíbrio associadas à ataxia e dismetria características de lesões cerebelares (SEITZ et al., 2005).

A ingestão de plantas contendo o alcaloide swainsonina quando constituir cerca de 50% da dieta diária durante 6 a 8 semanas pode induzir a doenças neurológicas em ovinos, bovinos e equinos (DORLING, 1980).

Apesar de o extrato aquoso de folhas frescas de *Ipomoea asarifolia* não causar efeitos mutagênicos em camundongos, esta planta pode causar toxicidade em animais devido a presença de compostos como swainsonina. São necessários estudos fitoquímicos para melhor compreensão dos danos para avaliar a composição química do extrato e seus efeitos em animais.

**Figura 8** Eritrócito de camundongo tratado com extrato aquoso de folhas frescas de *Ipomoea asarifolia* apresentando micronúcleo (Aumento 1000X).



A avaliação da frequência de células binucleadas foi realizada através da Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ). Os dados revelaram que não houve diferenças estatísticas significativas. Estes dados indicam que o extrato aquoso de folhas frescas de *Ipomoea asarifolia* não apresentou efeitos citotóxicos nos camundongos estudados.

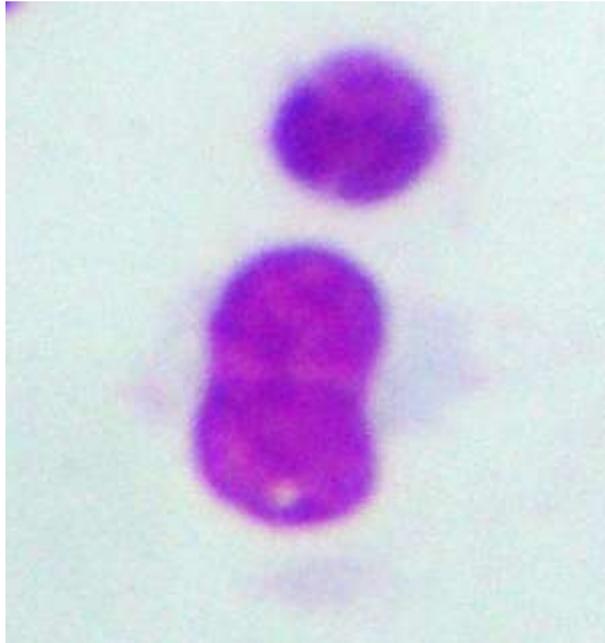
A tabela 6 mostra que embora não tenham ocorrido diferenças estatísticas significativas há aumento no número de células binucleadas (Figura 9) tanto em machos quanto em fêmeas nas diferentes concentrações em relação ao controle negativo. Revelando assim maior sensibilidade à formação destas anormalidades celulares. Os dados mostraram ainda que as fêmeas mostraram-se bem mais suscetíveis à formação de células binucleadas.

**Tabela 6** Média do número de células binucleadas presentes em amostras de sangue de medula de camundongos expostos ao extrato aquoso de folhas frescas de *Ipomoea asarifolia*.

<b>Média de Células Binucleadas</b>			
<b>Tratamento</b>	<b>Macho</b>	<b>Fêmea</b>	<b>Total</b>
<b>Controle -</b>	<b>3,3 ± 3,0<sup>ns</sup></b>	<b>4,3 ± 3,0<sup>ns</sup></b>	<b>3,8 ± 2,9</b>
<b>5</b>	<b>3,7 ± 2,7<sup>ns</sup></b>	<b>7,1 ± 4,2<sup>ns</sup></b>	<b>5,4 ± 3,8</b>
<b>50</b>	<b>2,7 ± 1,5<sup>ns</sup></b>	<b>4,8 ± 4,4<sup>ns</sup></b>	<b>3,8 ± 3,4</b>
<b>400</b>	<b>5,3 ± 2,1<sup>ns</sup></b>	<b>6,3 ± 5,9<sup>ns</sup></b>	<b>5,8 ± 4,2</b>

ns = não significante.

**Figura 9** Eritrócito de camundongo tratado com extrato aquoso de folhas frescas de *Ipomoea asarifolia* apresentando-se como célula binucleada



A avaliação do screening hipocrático também não demonstrou alterações comportamentais nos camundongos submetidos às concentrações de 5 mg/Kg e 50 mg/Kg. No entanto, para a concentração de 300 mg/Kg houve alterações no parâmetro - Sistema Nervoso Autônomo, cujos indivíduos apresentaram dificuldade nos movimentos, com descontrole corporal. Nos indivíduos expostos a concentração de 600 mg/Kg, houve alterações nos parâmetros: atividade geral e estado consciente disposição, onde os animais, de maneira geral, apresentaram-se, mais agitados e sensíveis ao toque. Além disso, detectou-se a presença de lesões na região abdominal fruto de processos inflamatórios no local de aplicação (Figura 10).

**Figura 10** Camundongo utilizado para avaliação de micronúcleo e células binucleadas, apresentando lesão.



#### 4.4 CONCLUSÕES

- A Dose Letal Mediana (DL50) foi 705,31 mg/Kg para extrato aquoso de folhas frescas de *Ipomoea asarifolia*, em camundongos Swiss.
- O extrato aquoso fresco de *I. asarifolia* provoca efeitos tóxicos nas doses de 300 mg/Kg e 600 mg/Kg, provocando redução de peso.
- Não há influência do gênero (Macho e fêmea) sobre o efeito tóxico.
- O extrato aquoso de folhas frescas da espécie *Ipomoea asarifolia* (salsa) não provoca efeitos mutagênicos e citotóxicos em eritrócitos de camundongos.

#### 4.5 REFERÊNCIAS

ARAUJO, J.A.S. et al. Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) em caprinos e ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 28(10):488-494, outubro, 2008.

ARAÚJO, J. A. S. et al. Intoxicação experimental por *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) em caprinos e ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28 n.10, p. 488-494. 2008.

BALOGH, K. K. I. M. et al. A lisosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. **J. Vet. Diagn. Invest.** 11:266-273. 1999.

BARBOSA, D. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae).** 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

BARBOSA, J.D. et al. Intoxicação experimental e natural por *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) em búfalos e outros ruminantes. Rio de Janeiro: **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.4, p.231-234, 2005.

CUNHA, L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tibourbou* Aubl (*Tiliaceae*), em camundongos e ratos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** 34(3):357-362. 2013.

CUNHA, L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Rev Bras Farmacogn.** 19(2A):403-11. 2009.

DORLING, P. R.; HUXTABLE, C. R.; COLEGATE, S. M. Inhibition of lysosomal alpha-mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens*. **Biochem. J.** 191(2): 649-651. 1980.

GHANI, A. Medicinal Plants of Bangladesh (Chemical Constituents and Uses). **Dhaka: Asiatic Society of Bangladesh**, pp: 201-204. 1998.

GUEDES, K.M.R. et al. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semi-árido. Rio de Janeiro: **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.1, p.29-38, 2007.

HAYASHI, M. KRISHNA, G. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutat. Res.** 455:155-166. 2000.

HURST, E. **Poisonous plants of New South Wales.** Plants Committee, New South Wales., 324 p. 1942.

KILL, L. H.; RANGA, N. Ecologia da polinização de *Ipomoea asarifolia* (ders). Roem & schult. (*Convolvulaceae*) na região semi-árida de Pernambuco. **Acta Botânica Brasílica**, Porto Alegre, v. 17, n.3, p. 355-362. 2003.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas.** São Paulo: Basf Brasileira, v.2. 1992.

LATHER, A. et al. World wide potential of plants causing teratogenicityan overview. **Spatula DD.** 1(2):101-6. 2011.

LAWAL, U. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of water extract from *Ipomoea asarifolia* Desr (*Convolvulaceae*). **African Journal of Biotechnology.** Vol. 9(51), pp. 8877-8880. 2010.

LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. Simple method of fitting dose-effect curve. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 95, p. 99-113, 1949.

LOPES, J. R. G. et al. Administração de diferentes concentrações de folhas de *Ipomoea asarifolia* na ração de camundongos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.5, p. 872-877, mai, 2014.

LUCIO, E. M. R. A; ROSALEN, P. L.; SHARAPIN, N.; SOUZA BRITO, A. R. M. Avaliação toxicológica aguda e creening hipocráticoda epilsopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Rev Bras Farmacogn**, v. 9, n. 10, p. 23-25, 2000.

MAGALHÃES, E. A. et al. Avaliação do potencial genotóxico do extrato bruto de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, *Bignoneaceae*, em médula óssea de camundongos. **Rev. Bras. Farmacogn.** 20(1):Jan./Mar. 2010.

MARLIÈRE, L. D. P. et al. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.** 18(Supl.): 754-60. 2008.

MEDEIROS, R.M.T. et al. Tremorgenic syndrome in goats caused by *Ipomoea asarifolia* in northeastern Brazil. **Toxicon**. V. 41, p. 933-935, 2003.

OELRICHS, P. B. et al. The chemistry and pathology of meliatoxins A and B constituents from the fruit of *Melia azedarach* L. var. *australasica*. In: Seawright A.A., Hegarty M.P. & James L.F. (Eds). **Plant Toxicology**. Queensland Poisonous Committee, Yeerongpilly, p. 387-394. 1985.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris: Organisation for Economic Cooperation and Development; 2001.

OUANES, Z. et al. Induction od micronuclei by Zearolenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of Vitamin E. **Mutat Res.** 538: 63-70. 2003.

OUEDAOGO, M. et al. Review of current and "omics" method for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. **J. Ethnopharmacol.** 140(3):492-512. 2012.

SCHIMID, W. THE MICRONUCLEUS TEST FOR CYTOGENETIC ANALYSIS. IN: **CHEMICAL MUTAGENS. PRINCIPLES AND METHODS FOR THEIR DETECTION.** NEW YORK: ED. A. HOLLAENDER PLENUM PRESS, 1976. P. 31-53.

SCHWARZ, A. et al. Identificação de princípios ativos presentes em *Ipomoea carnea* brasileira. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** vol. 40, n.2, abr./jun., 2004.

SEITZ, A. L. et al. Intoxicação experimental por *Sida carpinifolia* (*Malvaceae*) em ovinos. **Pesq. Vet. Bras.** 25(1):15-20, jan.mar. 2005.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Rev. Bras. Farmacogn.** (18):618-26. 2008.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas tóxicas do Brasil.** Rio de Janeiro: Helianthus, 320 p. 2000.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: Estratégias após a "Era do Teste DL50". **Rev. Eletr. Farm.** 3(2):93-8. 2006.

ZAMBRANO, M. A.; TARGA, H. J.; RABELLO-GAY, M. N. Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleus and metaphase slide preparations. **Stain Technology**, v. 57, p. 48-49, 1982.

ZATA, D. T. et al. Estudo da atividade antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da toxicidade aguda das folhas da *Jacaranda decurrens*. **Latin Am J Pharm.** 28 (4): 485-9. 2009.

## 5 ANEXOS

### 5.1 Anexo 1 - Identificação botânica (*Ipomoea asarifolia*).



## 5.2 Parecer de Projeto Encaminhado a CEUA-UFERSA



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### PARECER DE PROJETO ENCAMINHADO A CEUA-UFERSA

Parecer N° 27/2014 PROCESSO N° 23091.003280/2014-45

Data de Entrada: 13/08/2014 Aprovado: 04/11/2014

1. **Responsável:**  
Marcos antonio Nobrega de Sousa

2. **Título do Projeto**

*Avaliação citotóxica, genotóxica e mutagênica de extratos de plantas em organismos biôndicadores*

**Considerações:**

*Após apreciação pelos membros, a comissão julgou que o projeto encontra-se dentro das especificações exigidas pela CEUA e conforme a legislação vigente em relação ao bem-estar animal. O procedimento de eutanásia dos animais está de acordo com a resolução N° 1000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, o qual dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências. Todo o procedimento de manipulação do material será realizado com acompanhamento técnico especializado e com o uso de material adequado.*

3. **Parecer final:**

**FAVORÁVEL** à aprovação do projeto

Mossoró, 12 de novembro de 2014.

Atenciosamente,

  
Profª Emanuelle Fontenele Rabelo  
Presidente  
Comissão de Ética no uso de anim:  
CEUA/UFERSA

**Emanuelle Fontenele Rabelo**  
Presidente CEUA