



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL –
UFERSA/UFRN**

**POTENCIAL TÓXICO, CITOTÓXICO E MUTAGÊNICO DE EXTRATOS
AQUOSOS DE *Licania rigida* (CHRYSOBALANACEAE) EM CÉLULAS *IN VIVO***

NAAMA JESSICA DE ASSIS MELO

MOSSORÓ / RN – BRASIL
Fevereiro / 2015

NAAMA JESSICA DE ASSIS MELO

**POTENCIAL TÓXICO, CITOTÓXICO E MUTAGÊNICO DE
EXTRATOS AQUOSOS DE *Licania rigida* (CHRYSOBALANACEAE) EM
CÉLULAS *IN VIVO***

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi Árido – 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
Fevereiro – 2015

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

Melo, Naama Jessica De Assis.

. Potencial tóxico, citotóxico e mutagênico de extratos aquosos de
Licania rigida (Chrysobalanaceae) em células in vivo/ Naama Jessica
De Assis Melo. – Mossoró, 2015.
68f.: il.

1. Plantas tóxicas. 2. Allium cepa. 3. Mus musculus. 4. Medula
óssea. I. Título.

CDD 581 M527p

RN/UFERSA/BCOT/367

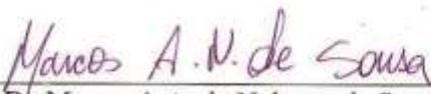
NAAMA JESSICA DE ASSIS MELO

**POTENCIAL TÓXICO, CITOTÓXICO E MUTAGÊNICO DE
EXTRATOS AQUOSOS DE *Licania rigida* (CHRYSOBALANACEAE) EM
CÉLULAS *IN VIVO***

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

APROVADA EM 11 / 02 / 15

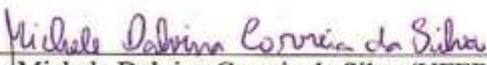
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marcos Antonio Nobrega de Sousa (UFERSA)
Orientador



Prof. Dra. Liz Carolina da Silva Lagos Cortês Assis (UFERSA)
Primeiro Membro (Co-orientador)



Prof. Dra. Michele Dalvina Correia da Silva (UFERSA)
Segundo Membro (Primeiro Tutor)

Dedico este trabalho aos
meus pais, Heráclito e
Marcília.

Grandes coisas fez o Senhor por nós, e por isso
estamos alegres.

Salmos, 126:3

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo maravilhoso dom da vida e por sempre estar comigo, dando-me força e esperança em todos os momentos da minha vida;

Aos meus pais, Heráclito e Marcília, e à minha irmã, Naara, por todo apoio, paciência, dedicação, amor e carinho dados a mim;

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Antonio Nobrega de Sousa, mestre e amigo por todos os ensinamentos, ajuda e conversas nesses 6 anos de convivência no Laboratório de Genética e Evolução. Sentirei muita falta da nossa convivência no LAGENE, das crises de riso no meio do laboratório que diminuía a minha ansiedade e dos seus conselhos. O senhor será sempre meu orientador. Muito obrigada por tudo;

À minha co-orientadora Profa. Dra. Liz Carolina da Silva Lagos Cortês Assis, pela co-orientação e atenção;

À Profa. Dra. Michelle Dalvina Correia da Silva, pela disponibilidade em integrar a banca e contribuições nas correções;

Ao meu namorado e colega de laboratório Eliezer, por estar em realmente todos os momentos comigo, me ajudando e incentivando e que proporcionou momentos de alegrias e me ensinou coisas simples e valiosas. Seu amor me impulsiona a seguir em frente;

À minha amiga e colega de laboratório Edigleyce, por ter sido minha parceira desde o início da graduação em Biotecnologia e durante toda a jornada no Laboratório de Genética e Evolução. Você sempre estará no meu coração;

Ao meu amigo Carlos Silveira, por toda ajuda concedida ao longo do desenvolvimento deste trabalho e por sempre estar disposto a me ouvir e me auxiliar;

Às alunas de iniciação científica do laboratório de Genética e Evolução, Mayra Joyce (futura médica), Giliane Duarte e Renata Keli, pela amizade e, sobretudo, pela grande ajuda na realização deste trabalho;

Aos meus amigos do laboratório de Fitopatologia II Ana Paula, Andréia, Ângela, Antônio, Claudinha, Deyse, Hailton, Kaline e Pedro, pelo grande incentivo dado;

Aos meus amigos do laboratório de Pós-colheita Clara, Darcio, Felipe, Paula, Rydley e Terezinha pelo apoio me dado em todos os momentos;

Aos professores Dra. Patrícia Lígia Dantas de Moraes e Dr. Rui Sales Júnior, coordenadores dos laboratórios de Fitopatologia II e Pós-colheita, por todo o apoio e incentivo;

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido, pelo espaço concedido para a realização deste trabalho e por ter me permitido ingressar no programa de pós-graduação;

Ao Programa de Pós-graduação em Produção Animal, pela seriedade na pesquisa e pela oportunidade de fazer parte desta pós-graduação;

Aos funcionários do Biotério da Universidade Federal da Paraíba, pela disponibilidade de fornecimento dos animais;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida e por ter viabilizado financeiramente através de recursos de materiais;

À todos que ajudaram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Planta inteira da oiticica (a) e detalhe da folha e da flor (b).....	27
Figura 2	Ovino com abdômen distendido devido à compactação do rúmen.....	28
Figura 3	Célula policromática com micronúcleo, corado pelo método de Giemsa, aumento de 1000 x.....	31
Figura 4	Classificação dos cometas em células do sangue periférico de camundongos <i>Swiss</i> no ensaio do cometa. A, classe 0; B, classe 1; C, classe 2; D, classe 3.....	33

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1 Células de *Allium cepa* em intérfase (A) e em mitose, nas fases de prófase (B), metáfase (C), anáfase (D) e telófase (E)..... 45

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO III

Figura 1	Dose letal mediana do extrato aquoso de <i>Licania rigida</i> administrado intraperitonealmente em camundongos, obtida por regressão linear.....	58
Figura 2	Camundongo fêmea do grupo 300 mg/kg com lesão (indicada pela seta) após 14 dias da injeção intraperitoneal do extrato aquoso de <i>Licania rigida</i>	59
Figura 3	Interação entre o peso médio dos machos e das fêmeas dos grupos controle (0 mg/kg) e tratados com diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas de <i>Licania rigida</i>	60
Figura 4	Micronúcleo em eritrócito de medula óssea de camundongo exposto ao extrato aquoso de folhas secas de <i>L. rigida</i>	62
Figura 5	Eritrócito binucleado de medula óssea de camundongo exposto ao extrato aquoso de folhas secas de <i>L. rigida</i>	63

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1	Inibição relativa do crescimento das raízes de bulbos de <i>Allium cepa</i> L. expostas ao controle negativo e às diferentes concentrações dos extratos aquosos de folhas secas (EAFS) e frescas (EAFF). Os valores foram expressos em médias \pm desvio padrão. * ($p < 0,05$) corresponde à diferença significativa entre as concentrações dos extratos e o controle negativo. Método de Análise de Variância (ANOVA).....	43
Tabela 2	Índice mitótico (%) \pm desvio padrão (SD), número de células nas diferentes fases do ciclo celular \pm Desvio padrão e valor limite de citotoxicidade (VLC %) de células de raiz de bulbos de <i>Allium cepa</i> após exposição ao controle negativo e diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas secas e frescas.....	46

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Tabela 1	Toxicidade aguda do extrato aquoso de <i>Licania rigida</i> de acordo com o número de mortes.....	57
Tabela 2	Peso médio dos machos e das fêmeas dos grupos controle (0 mg/kg) e tratados com diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas de <i>Licania rigida</i> . *Valores estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Tukey, $p < 0,05$).....	60
Tabela 3	Avaliação da frequência de micronúcleos e de células binucleadas em eritrócitos de camundongos expostos ao controle negativo (0 mg/kg) e as diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas secas de <i>L. rigida</i> . Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnett.....	61

POTENCIAL TÓXICO, CITOTÓXICO E MUTAGÊNICO DE EXTRATOS AQUOSOS DE
Licania rigida (CHRYSOBALANACEAE) EM CÉLULAS *IN VIVO*

Melo, Naama Jessica de Assis. Potencial tóxico, citotóxico e mutagênico dos extratos aquosos de *Licania rigida* (Chrysobalanaceae) em células *in vivo*. 2015. 68f . Dissertação (Mestrado em Produção Animal: Caracterização, Conservação e Melhoramento Genético de Recursos Locais) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

RESUMO: Plantas tóxicas de interesse pecuário ocasionam prejuízos relevantes aos produtores. No Nordeste brasileiro, essas plantas causam perdas econômicas diretas e indiretas por prejudicarem a saúde dos animais. Entre estas plantas está incluída a espécie *Licania rigida*, popularmente denominada oiticica. É encontrada na maioria dos estados do Nordeste e suas folhas podem ser utilizadas na alimentação de caprinos e ovinos na região do semiárido. Foram avaliados os efeitos tóxico, citotóxico e mutagênico de extratos aquosos de folhas de *L. rigida* em *Allium cepa* (cebola) e em camundongos *Swiss* (*Mus musculus*). Para avaliações em bulbos de cebola (crescimento de raízes e índice mitótico) foram utilizadas folhas secas e frescas, no seguinte delineamento experimental: controle negativo: (água destilada); concentração de 5 mg/L, 50 mg/L e 300 mg/L do extrato. E para camundongos foram utilizadas apenas o extrato de folhas secas para avaliação comportamental, de mortalidade (DL50), mutagenicidade (teste do micronúcleo) e citotoxicidade (células binucleadas). Não houve citotoxicidade, mas sim efeito subletal na concentração de 300 mg/L do extrato de folhas frescas e pode ter ocorrido efeito alelopático dos dois tipos de extratos sobre os bulbos de cebola. Em camundongos, o extrato de folhas secas ocasionou mudanças comportamentais e apresentou toxicidade (DL50=502,76 mg/kg). Não foram evidenciadas mutagenicidade e citotoxicidade, pois os resultados entre os tratamentos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($\alpha=0,05$).

PALAVRAS-CHAVE: Alelopatia, *Allium cepa*, Medula óssea, *Mus musculus*.

TOXIC, CYTOTOXIC AND MUTAGENIC POTENTIAL OF THE AQUEOUS EXTRACTS
OF *Licania rigida* (CHRYSOBALANACEAE) IN CELLS *IN VIVO*

Melo, Naama Jessica de Assis. Toxic, cytotoxic and mutagenic potential of the aqueous extracts of *Licania rigida* (Chrysobalanaceae) in cells *in vivo*. 2015. 68f. Dissertation (Master Science Degree in Animal Science: Characterization, Conservation and Genetic Improvement of Local Resources) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2015.

ABSTRACT: Toxic plants of livestock interest cause relevant damages to producers. In Brazilian Northeast, these plants cause direct and indirect economic losses by causing the health of animals. Among these plants is including *Licania rigida*, popularly called oiticica. It is found in most states of the Northeast and its leaves are fed to goats and sheep in the semiarid region. We evaluated the toxic effects of cytotoxic and mutagenic aqueous extracts of *L. rigida* leaves in *Allium cepa* (onion) and Swiss mice (*Mus musculus*). For evaluations in onion bulbs (root growth and mitotic index) dried and fresh leaves are used in the following experiment: negative control: (distilled water); 5 mg/L, 50 mg/L and 300 mg/L of the extract. And for mice were only used the extract of dried leaves for behavioral assessment of mortality (LD50), mutagenic (micronucleus test) and cytotoxicity (binucleated cells). There was no cytotoxicity but sublethal effect on the concentration of 300 mg/L of the layer of fresh leaves may have occurred and allelopathic effect of the two types of extracts on the onion bulbs. In mice, the extract of dried leaves caused behavioral changes and presented toxicity (LD50 = 502.76 mg/kg). Mutagenicity and cytotoxicity were not evident because the results between treatments showed no statistically significant differences ($\alpha = 0.05$).

KEYWORDS: Allelopathy, *Allium cepa*, Bone marrow, *Mus musculus*.

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	17
2. CAPÍTULO I – REFERENCIAL TEÓRICO	22
INTRODUÇÃO.....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
O BIOMA CAATINGA	25
PLANTAS TÓXICAS PARA ANIMAIS DE PRODUÇÃO.....	26
<i>Licania rigida</i> (Benth.).....	26
TOXICIDADE	28
GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE.....	29
Teste de micronúcleo.....	30
Ensaio do cometa.....	31
CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
3. CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICO E CITOTÓXICO DE EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Licania rigida</i> BENTH. EM SISTEMA <i>Allium cepa</i>	38
INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS	47
4. CAPÍTULO III – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICO E MUTAGÊNICOS DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Licania rigida</i> BENTH. EM CAMUNDONGOS <i>Mus musculus</i>	51
INTRODUÇÃO.....	53
MATERIAL E MÉTODOS.....	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS	63
ANEXO	67

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A toxicologia envolve o estudo qualitativo e quantitativo dos efeitos adversos de substâncias químicas ou outros materiais sobre organismos expostos. Os testes de toxicidade consistem em se expor organismos representativos durante um período determinado a várias concentrações de uma ou mais substâncias e avaliar os efeitos causados. Os efeitos tóxicos vão desde a mortalidade até efeitos chamados subletais, tais como mudanças no crescimento, na reprodução, no comportamento, entre outros (ABRAHÃO; SILVA, 2002).

Os efeitos deletérios podem ser de dois tipos, agudo ou crônico. O efeito agudo é definido como uma resposta severa e rápida a um estímulo, a qual se manifesta num intervalo curto, variando de 0 a 96 horas. Para se avaliar efeitos agudos utiliza-se, em geral, o parâmetro DL50, que é a concentração do agente tóxico que causa letalidade ou outro efeito em 50% dos organismos em teste, principalmente camundongos da espécie *Mus musculus*. O efeito crônico é normalmente resultado de exposições repetidas ou de longa duração, geralmente com baixas concentrações de exposição (ABRAHÃO; SILVA, 2002).

Além dos estudos dos efeitos tóxicos, camundongos também podem ser utilizados em testes de mutagenicidade, ou seja, avaliações que identificam quebras cromossômicas devido a uma substância ou um grupo de substâncias mutagênicas. Uma das metodologias bastante utilizada para avaliação de possíveis danos mutagênicos é o teste de micronúcleos, desenvolvido em eritrócitos de medula óssea ou do sangue periférico de camundongos. Este teste possui capacidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), e/ou agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal) (CELIK; KANIK, 2006).

Os testes biológicos de mutagenicidade também podem ser realizados com plantas. Neste material, a análise consiste em verificar a frequência de micronúcleos, aberrações cromossômicas e alterações no índice mitótico nas células do meristema radicular. O resultado fornece a informação se a substância estudada é citotóxica. Esses testes fornecem parâmetros significantes para avaliar a toxicidade de substâncias e misturas complexas sem se ter conhecimento sobre sua composição, podendo servir como primeiro indicador de dano e ação tóxica (CHANDRA et al., 2005).

Entre os sistemas de testes adequados para o monitoramento da toxicidade, o teste *Allium cepa* é muito conhecido e comumente utilizado em muitos laboratórios. A mitose no meristema do ápice radicular de *A. cepa* foi material pioneiro para estudos de clastogênese, resultado da ação de agentes físicos e químicos (FISKESJO, 1985).

As cebolas são fáceis de serem armazenadas, manuseadas e as células da raiz constituem um sistema conveniente tanto para parâmetros macroscópicos (crescimento, deformidade), quanto para parâmetros microscópicos (índice mitótico). Os resultados com o teste *Allium cepa* têm mostrado um bom desempenho em comparação com outros sistemas, tanto para eucariotos quanto para procariotos (FISKESJO, 1988). Vários autores consideram este teste um bioensaio simples, sensível, rápido e barato. Além disso, *A. cepa* apresenta muitas células em divisão, com crescimento rápido da raiz, e disponibilidade durante o ano todo. Dessa forma, o teste *Allium* é capaz de prever a ocorrência de toxicidade (FISKESJO, 1993).

Quando o material a ser estudado quanto à sua toxicidade e citotoxicidade em *Allium cepa* possui origem vegetal, como por exemplo, extratos vegetais, e quando eles exercem efeitos sobre a cebola diz-se que o extrato é alelopático. A alelopatia pode ser definida como um processo onde os produtos do metabolismo secundário de um determinado vegetal são liberados, influenciando na germinação e no desenvolvimento de outras plantas (GOLDFAR et al., 2009).

Os efeitos alelopáticos são mediados por substâncias que pertencem a diferentes categorias de compostos secundários (GOLDFAR et al., 2009). A espécie *Licania rigida* Benth., popularmente conhecida como oiticica possui diversos compostos secundários, como tocoferóis, esteroides e flavonoides (BEZERRA, 2011), que podem ser potencialmente alelopáticos.

L. rigida está incluída na família Chrysobalanaceae, que compreende aproximadamente 20 gêneros e 500 espécies, onde é representada por árvores e arbustos. O gênero *Licania* é composto por 250 espécies (SOUSA et al., 2005). *Licania rigida* é endêmica do Nordeste brasileiro e é uma árvore de copa densa e tronco curto, podendo atingir até 15 m de altura, com folhas simples e frutos de forma oblongas ou às vezes, arredondadas, contendo uma única semente rica em óleo (DINIZ et al., 2008).

A oiticica apresenta grande importância para a região por preservar as margens dos rios e riachos temporários na região da caatinga e por produzir óleo com propriedade secante. Atualmente o óleo é empregado na indústria de tintas de automóvel e de impressoras a jato de tinta, além de vernizes e outros afins. É uma planta que tem se destacado entre as oleaginosas com potencial para a sustentabilidade do biodiesel no semiárido, constituindo uma fonte de renda e de absorção de mão de obra para muitas famílias rurais (VIEIRA, 2010).

A espécie *L. rigida* também está incluída na categoria de plantas tóxicas de interesse pecuário, ou seja, plantas capazes de causar danos aos animais de produção com reflexos na

saúde e vitalidade dos mesmos, ocasionando um desequilíbrio no animal com sintomas de intoxicação. Animais de produção, como caprinos e ovinos, costumam consumir as folhas desta espécie, lhes causando um quadro de compactação ruminal (COSTA et al., 2011).

Diante disso, os estudos dos efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos de *L. rigida* podem auxiliar em um melhor manejo da alimentação dos animais de produção no semiárido nordestino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, A. J.; SILVA, G. A. Influência de alguns contaminantes na toxicidade aguda de efluentes da indústria têxtil. **Química Têxtil**, v. 67, p. 8-34, 2002.

BEZERRA, J. N. S. **Estudo fitoquímico de *Licania rigida* Benth (Chrysobalanaceae)**. 2011. 158 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CELIK, A.; KANIK, A. Genotoxicity of occupational exposure to wood dust. Micronucleus frequency and nuclear changes in exfoliated buccal cells. **Environ. Mol. Mutagen**, v. 47, n. 9, p. 693-8, 2006.

CHANDRA, S.; CHAUHAN, L. K. S.; MURTHY, R. C.; SAXENA, P. N.; PANDE P. N.; GUPTA, S. K. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using Allium test. **Sc. Total Environ.**, v. 346, p. 56-59, 2005.

COSTA, A. M. D.; SOUZA, D. P. M.; CAVALCANTE, T. V.; ARAÚJO, V. L.; RAMOS, A. T.; MARUO, V. M. Plantas tóxicas de interesse pecuário em região de ecótono Amazônico e Cerrado. Parte II: Araguaína, Norte do Tocantins. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 3, p. 317-324, 2011.

DINIZ, F. O.; MOREIRA, F. J. C.; SILVA, F. D. B.; MEDEIROS FILHO, S. Influência da luz e temperatura na germinação de sementes de oiticica (*Licania rigida* Benth). **Ver. Cienc. Agron.**, v. 39, n. 3, p. 476-480, 2008.

FISKESJÖ, G. The Allium test in wastewater monitoring. **Environ. Toxicol. Water**, v. 8, p. 291-298, 1993.

FISKESJÖ, G. The Allium test - a alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Res.**, n. 197, p. 243-260, 1988.

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

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

SOUSA, M. F. V.; SILVA, D. A.; COSTA, D. A.; SILVA, D. F.; AGRA, M. F.; MEDEIROS, I. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R. Flavonóides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol-3,7-di-O- α -L-ramnopiranosideo. **Braz. J. Pharm.**, v. 15, n. 1, p. 23-29, 2005.

VIEIRA, J. M. A.; FILHO, J. G. A. P.; STRAGEVITCH, L.; SILVA, K. C. L.; BRITO, J. Z. **Caracterização físico-química e reológica do óleo de oiticica para produção de biodiesel.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010.

2. CAPÍTULO I – REFERENCIAL TEÓRICO

Trabalho publicado em anais de evento:
I SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS DO
SEMIÁRIDO - 2014
Regras de submissão de acordo com a Revista Saúde & Ciência On-line - ISSN: 2317-
8469
Página eletrônica:
<http://www.sengebbio.com.br/>

LICANIA RIGIDA: POTENCIAL PARA ESTUDOS DE TOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE NA PRODUÇÃO ANIMAL

Marcos Antonio Nobrega de Sousa^{1*}, Naama Jessica de Assis Melo², Edigleyce de Lima Costa², Eliezer Fernandes da Silva Filho²

¹Docente 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: marcosousa@ufersa.edu.br

²Discente de Mestrado em Produção Animal–PPGPA-UFERSA.

RESUMO

Algumas espécies de plantas possuem toxinas que podem ocasionar danos físicos e genéticos nos animais de produção, principalmente através da alimentação. Com isso, o agronegócio sofre diminuição no número de animais saudáveis e perdas econômicas. Muitas dessas espécies de plantas tóxicas são encontradas e utilizadas na região semiárida do estado do Rio Grande do Norte, por exemplo, *Licania rigida* (oiticica). O objetivo desse trabalho foi realizar uma revisão de literatura sobre o estudo potencial dos efeitos tóxicos, genotóxicos e mutagênicos de *L. rigida*. Foram realizadas buscas nas bases de dados LILACs, Scielo, Google Acadêmico, Periódico CAPES, Pubmed e livros, acerca de estudos sobre a toxicidade dessa planta utilizando descritores em português e inglês. Foi observado que os efeitos tóxicos conhecidos produzidos pela *L. rigida* nos animais de produção são principalmente físicos e fisiológicos, ocasionando a condição de compactação ruminal. Entretanto, não se tem conhecimento sobre os efeitos tóxicos no nível celular. Também foi verificado que para estudo de citotoxicidade pode ser utilizado o teste de alongamento de raízes, com *Allium cepa*, como organismo modelo e para os testes genotóxicos, os mais utilizados são: o ensaio do cometa, para avaliação da genotoxicidade, e teste do micronúcleo, para mutagenicidade, fazendo uso de camundongos, como bioindicadores. Denota-se a necessidade de pesquisas sobre a genotoxicidade da espécie citada, para melhor avaliar as consequências nos animais de produção.

Descritores: genotoxicidade, plantas tóxicas, semiárido

LICANIA RIGIDA: POTENTIAL FOR TOXICITY, GENOTOXICITY AND MUTAGENICITY STUDIES IN ANIMAL PRODUCTION

ABSTRACT

Some plant species have toxins that can cause physical and genetic damage in animal production, mainly through diet. With this, the agribusiness suffers decrease in the number of healthy animals and economic losses. Many of these toxic species of plants are found and used in the semiarid region of the state of Rio Grande do Norte, for example, *Licania rigida* (oiticica). The aim of this study was to review the literature on the potential study of the toxic, genotoxic and mutagenic effects of *L. rigida*. Searches were conducted in the LILACs, SciELO, Google Scholar, Journal CAPES, Pubmed data and books about studies on the toxicity of this plant using descriptors in Portuguese and English. It was observed that produced by the known toxic effects of *L. rigida* in animals production are primarily physical

and physiological, causing the condition of rumen compression. However, there is no knowledge about the toxic effects at the cellular level. It was also found that to study the cytotoxicity test elongation of roots, with *Allium cepa*, and as a model organism for genotoxic tests can be used, the most used are: the comet assay to assess the genotoxicity, and micronucleus test for mutagenicity, using mice, as bioindicators. The need for research on the genotoxicity of species cited is demonstrated, to better assess the consequences in livestock.

Keywords: genotoxicity, toxic plants, semiarid

INTRODUÇÃO

A Caatinga é um bioma composto por vegetação com arbustos espinhosos e florestas sazonalmente secas que cobre a maior parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e o norte de Minas Gerais, no vale do Jequitinhonha. Muitas espécies vegetais são utilizadas na medicina popular, para tratamento de tosses, gripes, coqueluche, enxaqueca, dentre outras enfermidades. Contudo, outras espécies possuem toxinas prejudiciais aos seres humanos e aos animais, principalmente, de produção, pois podem se alimentar constantemente dessas plantas (1).

As toxinas presentes nas plantas podem influenciar diretamente na produção animal, sendo capazes de promover importantes prejuízos ao agronegócio. Uma interessante forma de classificar estes prejuízos é em perdas diretas (morte, perda de peso ou redução do crescimento, distúrbios reprodutivos) e indiretas (custo médicos, construção de cercas, alterações no manejo) (2).

Com relação aos prejuízos diretos, a mortalidade de animais promovida por plantas tóxicas é, sem dúvida alguma, o que mais chama a atenção, especialmente quando afeta uma grande porcentagem do rebanho. O número de bovinos mortos por plantas tóxicas no Brasil foi estimado, em 2001, entre 800.000 e 1.120.000 (3). Entretanto, como este número foi obtido a partir da extrapolação da mortalidade por plantas ocorrida nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, provavelmente esteja subestimado, uma vez que a taxa de mortalidade por plantas é maior nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte do que nas regiões Sul e Sudeste (2). Diversos outros fatores contribuem diretamente para o prejuízo causado pelas plantas tóxicas, tais como a redução no ganho de peso ou mesmo a perda de peso e distúrbios reprodutivos (por exemplo, abortamentos, malformações e menor taxa de concepção) (4,3). No entanto, é extremamente difícil fazer este cálculo para a pecuária nacional (5).

No semiárido, a pecuária é geralmente extensiva, com exceção de algumas áreas com desenvolvimento econômico, principalmente grandes centros urbanos. A bovinocultura de

leite é ainda a principal atividade econômica da região. No entanto, a criação de caprinos e ovinos teve um significativo crescimento nos últimos anos, principalmente pela criação de ovinos de corte Santa Inês, que está trazendo para a região alto retorno financeiro e a oportunidade de melhorar geneticamente o rebanho. Um dos principais fatos limitantes à pecuária do semiárido é a ocorrência de doenças e, dentre essas, as intoxicações por plantas, que em algumas regiões são pouco conhecidas (6).

Para isso foi realizada uma revisão de literatura com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a espécie *Licania rigida* e seu potencial estudo de efeitos tóxicos, genotóxicos e mutagênicos na produção animal.

MATERIAL E MÉTODOS

As bases de dados utilizadas para a elaboração do presente artigo foram: SciELO, PubMed, Google Acadêmico e Periódicos CAPES. A pesquisa bibliográfica incluiu artigos originais e de revisão, teses e dissertações, nos idiomas inglês e português. Os descritores utilizados isolados e em várias combinações foram: caatinga, plantas tóxicas, genotoxicidade, mutagenicidade, *Licania rigida* e organismos bioindicadores.

Em relação aos periódicos foram considerados os estudos publicados entre 1957 e 2014 (brasileiros e internacionais) e foram excluídos os textos que desviavam do propósito do estudo.

O BIOMA CAATINGA

O termo “caatinga” é de origem Tupi e significa “mata branca”, referindo-se ao aspecto da vegetação durante a estação seca, quando a maioria das árvores perde as folhas e os troncos esbranquiçados e brilhantes dominam a paisagem (7). Caatinga é um bioma onde dominam dois tipos de vegetação: um constituído de arvoretas e arbustos decíduos durante a seca, frequentemente armados de espinhos (acúleos), e outro de cactáceas, bromeliáceas e ervas quase todas anuais (8-9).

A caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro e engloba os Estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais (10). O Rio Grande do Norte é um dos Estados que possui maior diversidade de espécies vegetais pertencentes à Caatinga devido às suas características de solo, clima e formações geológicas. O diagnóstico florestal do Rio Grande do Norte realizado pelo projeto PNUD/FAO/IBAMA (11) informa que a Caatinga compreende um número

elevado de comunidades vegetais tipicamente compostas por espécies xerófilas. Entre estas se encontram algumas espécies tóxicas (12).

PLANTAS TÓXICAS PARA ANIMAIS DE PRODUÇÃO

Plantas tóxicas de interesse pecuário, são consideradas tóxicas apenas, quando sob condições naturais, causam danos à saúde, produzem quadros clínico-patológicos ou mesmo a morte do animal (2). Algumas plantas apresentam toxicidade apenas no nível experimental, em condições de laboratório. Portanto, elas são tóxicas, mas não são consideradas plantas tóxicas de interesse pecuário.

Em diversas ocasiões, as plantas tóxicas são consumidas por animais de interesse pecuário. Os principais fatores que ocasionam a ingestão dessas plantas são a falta de pastagens adequadas e escassez de alimento. Mesmo quando não são palatáveis, elas são ingeridas, gerando intoxicações e morte dos animais (5, 13).

No Brasil, devido à carência de dados sobre a frequência das causas de mortalidade em alguns Estados, é difícil definir o impacto econômico causado pelas perdas por morte de animais devido às plantas tóxicas. O prejuízo econômico causado pela intoxicação por plantas na exploração dos animais de produção, nem sempre se faz de forma direta, pela simples ingestão da planta tóxica, com consequentes perdas e mortes de animais, diminuição da produção (carne, leite ou lã) e custos das medidas de controle e profilaxia (3). Também ocorre indiretamente, por meio da contaminação acidental de alimento e produtos agrícolas contaminados por plantas tóxicas usadas na composição de rações (5).

- ***Licania rigida* (Benth.)**

A oiticica (*Licania rigida* Benth.) (Figura 1), pertencente à família Chrysobalanaceae, é uma espécie endêmica do Nordeste brasileiro, encontrada dos sertões até o litoral, preferindo solos aluviões (neossolos flúvicos) às margens dos cursos d'água. Ela pode ser encontrada nos Estados da Bahia, Ceará, Paraíba, Piauí e Rio Grande do Norte. É uma árvore de copa densa e tronco curto, podendo atingir até 15 metros de altura com folhas simples, coriáceas e esbranquiçadas na face inferior. A inflorescência é paniculada, os frutos são drupas de forma oblonga e, às vezes, arredondados contendo uma única semente rica em óleo (14).

É uma planta perene, de grande porte e longevidade, oriunda do Brasil, encontrada de 50 até 500 m de altitude, nos aluviões marginais dos rios e riachos. Ramifica-se pouco acima do chão e a copa pode atingir até 15-20 m de circunferência, armazenando nutrientes no caule e nas raízes na forma de água, hidratos de carbono, ácidos orgânicos e outras substâncias, a

fim de sobreviver os anos de seca. A inflorescência se dá em espigas racemosas, situadas nas pontas dos ramos, aparecendo no mês de junho até outubro com flores amareladas pequenas e hermafroditas. A floração é contínua até 100 dias desde a primeira até a última flor. Quando as últimas flores são fecundadas, os primeiros frutos apresentam-se com cerca de três cm (14).

O florescimento desta espécie ocorre nos meses mais quentes do ano, de julho a dezembro, e a maturação dos frutos durante os três primeiros meses do ano. As sementes são dispersas por pássaros, morcegos e, principalmente, pela água. A sua germinação é tida como tardia e desuniforme (15).

Além da extração industrial do óleo de suas sementes, importante fonte de renda, entre as décadas de 1930 e 1950, para os sertanejos, é também utilizada como planta medicinal, sendo as folhas usadas no tratamento de diabetes e inflamações (16-17). O óleo das sementes também pode ser empregado na indústria de tintas automotivas e na indústria de tintas para impressoras a jato, bem como vernizes e outros devido ao elevado efeito de secagem (18).

As folhas de *L. rigida* embora, por muitas vezes, utilizadas na alimentação bovina no Sertão Paraibano possuem ação tóxica ocasionando compactação ruminal (6) (Figura 2). Essa doença afeta no semiárido animais alimentados com forragens secas com pouca digestibilidade, ricos em lignina, com baixos níveis de energia e proteína digeríveis, e frequentemente está associada à ingestão de pouca água (19).



Figura 1. Planta inteira da oiticica (a) e detalhe da folha e da flor (b) (20).



Figura 2. Ovino com abdômen distendido devido à compactação do rúmen (21).

TOXICIDADE

Bioensaios de ecotoxicidade são metodologias analíticas que permitem caracterizar a toxicidade de substâncias químicas em geral. A exposição de organismos vivos (bioindicadores) a estas substâncias é uma ferramenta valiosa de análise ambiental (22).

Os testes com plantas podem ser utilizados em cinco categorias diferentes: biotransformação, transformação de compostos causados pelas plantas; captação da cadeia alimentar, quantidade e concentração de elementos tóxicos que podem entrar na cadeia alimentar através da captação das plantas; sentinela, monitoramento de poluentes observando os sintomas de toxicidade exibidos pelas plantas; indicadoras, plantas que indicam as características do solo, tanto físicas, quanto químicas; toxicidade, indicativo de efeitos tóxicos. Dentre todos estes testes, este último tem recebido maior atenção nos últimos anos. (23)

Os testes de toxicidade podem ser classificados de acordo com o tempo de exposição (agudo ou crônico), o modo do efeito (morte, crescimento, reprodução) ou a resposta do efeito (letal ou subletal) (22).

Em plantas a toxicidade pode ser determinada pela germinação das sementes, crescimento da raiz e da muda (24). O teste de crescimento de raízes é um dos mais utilizados com as espécies vegetais, pois é simples, rápido, de fácil execução e tem sido aplicado em estudos de toxicidade para a verificação dos efeitos tóxicos causados pela exposição de meristemas das raízes dos bulbos a substâncias a serem testadas.

O crescimento de raízes pode também ser verificado através da exposição de sementes, verificando a toxicidade de substâncias ou de efluentes. Que consiste na exposição de sementes, em substrato sólido umedecido com a substância que se deseja testar para verificar porcentagem de germinação, e/ou vigor no crescimento da raiz das plântulas (25).

A espécie *Allium cepa* (cebola) tem sido indicada como um eficiente organismo para testes de toxicidade, devido à sua cinética de proliferação celular, crescimento rápido de suas raízes, grande número de células em divisão, alta tolerância a diferentes condições de cultivo, disponibilidade durante o ano todo e fácil manuseio (26).

GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

Mutação é o processo pelo qual um gene sofre mudança estrutural. O ácido desoxirribonucleico (DNA) sofre alterações, que podem ser causadas por erros durante a sua duplicação, ou na divisão celular, de maneira espontânea ou induzida por agentes genotóxicos ou mutagênicos (27).

Muitas das mutações não implicam em mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo. Como por exemplo, as que determinam a morte celular. Entretanto, outras mutações podem determinar vantagens ou um crescimento desordenado das células (27). Estas alterações genéticas no DNA são eventos significativos no processo de carcinogênese e de outras doenças degenerativas.

Vários trabalhos sugerem que as alterações nucleares (por exemplo, micronúcleos) são consequências de manifestações diretas de dano ao DNA ou de defeitos no mecanismo de reparo genético (27).

Os estudos genotóxicos analisam a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações no material genético de organismos. Já os mutagênicos dizem respeito ao estudo da indução de alterações da quantidade ou da estrutura do material genético transmissíveis permanentemente. Os testes de genotoxicidade visam detectar mutágenos e carcinógenos, estudar os mecanismos de mutagênese e carcinogênese química e avaliar os perigos de compostos químicos mutagênicos e carcinogênicos para os organismos (28).

Existem organismos mais sensíveis aos ensaios para avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade, chamados organismos bioindicadores. Os bioindicadores são espécies, grupos de espécies, ou comunidades biológicas cuja presença, quantidade e distribuição indicam a magnitude de impactos ambientais nos ecossistemas. Também, são definidos como organismos ou comunidades que respondem à poluição ambiental alterando suas funções vitais ou acumulando substâncias químicas nocivas (32).

Camundongos ou ratos são frequentemente utilizados para avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade em testes *in vivo*, em sistemas celulares de mamíferos (33). Além disso, apresentam outras vantagens, como: facilidades de manuseio, de alimentação, da execução de procedimentos técnicos e de custo operacional (34).

- **Teste de micronúcleo**

Um teste muito utilizado, denominado teste do micronúcleo (MN) é um bioindicador de efeito clastogênico ou aneugênico, que revela a instabilidade genômica (30). Este teste mostra os micronúcleos, que são formados, espontaneamente ou após a exposição celular a agentes mutagênicos, a partir de pequenos fragmentos de cromossomos acêntricos que não foram incorporados no núcleo ou por cromossomos inteiros que se atrasaram na anáfase durante a divisão celular (31). Os micronúcleos depois de formados ficam localizados no citoplasma das células, sem qualquer conexão estrutural com núcleo principal (35).

O teste de micronúcleo (MN) é um ensaio que avalia alterações nucleares, resultantes da perda de informação genética do núcleo principal. Estão diretamente relacionados à perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou no aparelho mitótico (35). São considerados micronúcleos apenas os corpúsculos de massa de cromatina que em relação ao núcleo apresentaram aproximadamente 1/3 do seu tamanho, estando nitidamente separados, com bordas distinguíveis, mesma cor e refringência durante a visualização no microscópio (36).

A maior vantagem dessa análise de mutagenicidade, em relação ao teste tradicional de aberrações cromossômicas (AC), é que o teste de micronúcleo pode detectar danos e mutações causados por processos clastogênicos (aqueles que quebram cromossomos) que não foram reparados pelos mecanismos enzimáticos de reparo da informação genética contida no material nuclear (37). Também é capaz de detectar agentes aneugênicos (aqueles que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal, podendo conter cromossomos inteiros) (38).

Em roedores, após a substância a ser avaliada ser administrada, o efeito pode ser observado em esfregaços de células da medula óssea ou de sangue periférico (39). Na medula óssea, durante o processo de divisão celular, os eritroblastos sofrem duplicação final dos cromossomos, diferenciando-se em eritrócitos jovens, ricos em ribossomos. Nestes eritrócitos policromáticos, o micronúcleo permanece no citoplasma onde pode ser facilmente visualizado. Tal fato permite sua diferenciação dos eritrócitos maduros ou normocromáticos onde já ocorreu a extrusão do núcleo (40).

Além disso, o micronúcleo possui grande probabilidade de ter sido gerado a partir de danos cromossômicos induzidos recentemente, na presença de uma substância que causou este dano, pois o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto (40,41) (Figura 3).

Se forem contados os micronúcleos apenas nesse tipo de célula, haverá a segurança de que eles se formaram na mitose anterior, na presença do agente mutagênico. Como o período entre a última divisão e a formação do eritrócito policromático (EP) é de 8 a 12 horas, só serão encontrados micronúcleos induzidos pelo agente cerca de 10 horas após o tratamento. Além disso, o intervalo mínimo no qual os micronúcleos podem ser detectados corresponde à duração do estágio de policromático, entre 10 a 24 horas (41,40).

Os eritrócitos policromáticos de sangue periférico de camundongos também podem ser utilizados no teste, uma vez que as células micronucleadas não são eliminadas pelo baço, como ocorre nos ratos. Dessa forma, deve-se ter o cuidado de coletar essas células após, no mínimo, 36 horas após a administração da substância teste, que é quando os eritrócitos micronucleados começam a aparecer na corrente circulatória (42).

Os resultados positivos obtidos com o teste do micronúcleo fornecem fortes evidências de mutagenicidade sistêmica do extrato avaliado. Sob condições experimentais apropriadas, os resultados negativos suportam a conclusão de que a substância teste não é mutagênica *in vivo* (43).



Figura 3. Célula policromática com micronúcleo, corado pelo método de Giemsa, aumento de 1000 x (44).

- **Ensaio do cometa**

O potencial genotóxico de um composto pode ser avaliado por meio de ensaios que investiguem o dano genômico, como o ensaio do cometa, por exemplo. Que é um ensaio simples, rápido, sensível e eficiente, usado para quantificar as lesões e detectar os efeitos do

reparo no DNA em células individualizadas de mamíferos baseado na medida de fragmentos de DNA que migram em um campo elétrico (29).

Seu princípio básico é o da lise de membranas celulares, seguida pela indução da migração eletroforética do DNA liberado em uma matriz de agarose, sendo possível observar após coloração, os fragmentos de DNA provindos da quebra causada pelo agente genotóxico. Quando vista ao microscópio, a célula migrada adquire a forma aparente de um cometa, com cabeça, região nuclear e cauda, que contém fragmentos ou fitas de DNA que migraram na direção do ânodo (45).

A análise dos cometas baseia-se no grau de fragmentação do DNA e sua migração pela microeletroforese. Medidas como o comprimento total da “cauda” e a densidade de DNA fornecem dados indiretos sobre o estado do DNA da amostra. Atualmente, esse método é amplamente utilizado como ensaio de genotoxicidade de produtos industriais, farmacêuticos e agroquímicos e em biomonitoramento aquático e terrestre. É um método rápido, de baixo custo, seguro e de execução relativamente fácil (45).

As células resultantes deste ensaio em lâmina são classificadas de acordo com o tamanho da cauda em quatro classes (Figura 4): Classe 0 – sem dano, sem cauda; Classe 1 – dano pequeno, com cauda menor que o diâmetro da cabeça; e Classe 3 – dano máximo, com cauda duas vezes maior que o diâmetro da cabeça. Cometas sem cabeças ou com cauda muito extensa devem ser excluídos da avaliação devido à probabilidade de representarem células apoptóticas, ou seja, células mortas (46).

As lesões genômicas causadas pelos compostos genotóxicos podem, após serem processadas intracelularmente, resultar em mutação. Diferente das mutações cromossômicas, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção. Uma vez que danos no DNA são frequentemente em uma célula ou tecidos específicos, esta metodologia que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula e, em determinada subpopulação celular, é de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos (27).

Este teste vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido às suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substância genotóxicas. A sensibilidade demonstrada por este ensaio permite o uso de uma ferramenta potente para o estudo da genotoxicidade, sendo que, aproximadamente 85% dos estudos realizados nesta área encontraram um resultado positivo. (43).

Uma grande variedade de células de diferentes tecidos pode ser utilizada no teste do cometa, desde que possam ser isoladas adequadamente. Os eritrócitos periféricos e provenientes da medula óssea são as células mais comumente utilizadas em estudos de

genotoxicidade em roedores, pois já se encontram em suspensão e não necessitam da ação de enzimas ou de processo mecânico para seu isolamento, pois tais processos podem causar danos adicionais ao DNA (47).

O ensaio do cometa ganhou popularidade por ser um teste capaz de detectar baixos níveis de danos e reparos no DNA e por ser aplicável em diversos tecidos e/ou tipos celulares (48). Outra vantagem que o diferencia dos métodos citogenéticos convencionais é que esta técnica requer um pequeno número de células e não necessita que estas estejam em divisão, podendo então, ser aplicada em qualquer fase do ciclo celular. Além disso, uma parte dos danos que ocorrem nas células pode ser reparada, dependendo do estágio do ciclo celular e/ou do tipo de agente mutagênico testado. Somente uma pequena quantidade de danos não são reparados, e se tornam uma mutação fixa (49).

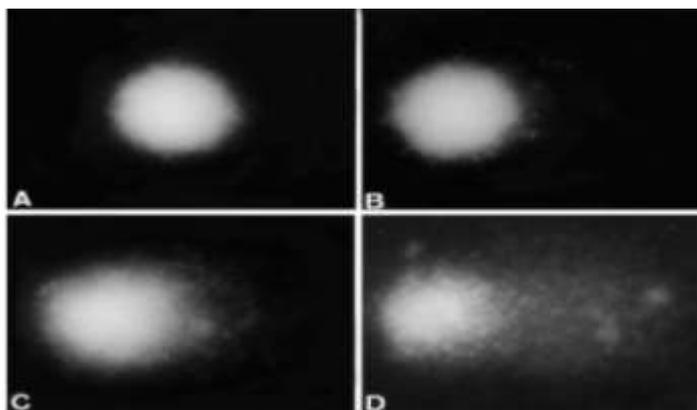


Figura 4. Classificação dos cometas em células do sangue periférico de camundongos *Swiss* no ensaio do cometa. A, classe 0; B, classe 1; C, classe 2; D, classe 3 (50).

CONCLUSÕES

A espécie *Licania rigida*, popularmente denominada como oiticica, é comprovadamente conhecida como planta tóxica para animais de produção, ocasionando a condição de compactação ruminal. Os sintomas e efeitos físicos já são devidamente estudados, mas o mesmo não ocorre com os efeitos a nível celular e genético. São necessárias mais pesquisas para saber se ocorrem e quais são os danos genéticos nos organismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agra MF, Baracho GS, Basílio IJD, Nurit K, Coelho VP, Barbosa DA. Sinopse da flora medicinal do Cariri paraibano. *Oecl. Bras.* 2007; 11 (3): 323-330.

2. Tokarnia CH, Döbereiner J, Peixoto PV. Plantas Tóxicas do Brasil. Rio de Janeiro: Helianthus; 2000.
3. Riet-Correa F, Medeiros RMT. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2001. 21 (1): 38-42.
4. James LF, Nielsen DB, Panter KE. Impact of poisonous plants on the livestock industry. J. Range Manag. 1992. 45: 3-8.
5. Barbosa RR, Ribeiro Filho MR, Silva IP, Soto-blanco B. Plantas tóxicas de interesse pecuário: importância e formas de estudo. Acta Veterinaria Brasília. 2007. 1 (1): 1-7.
6. Assis TS, Medeiros RMT, Araújo JAS, Dantas AFM, Riet-correa F. Intoxicações por plantas em ruminantes e equídeos no Sertão Paraibano. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2009. 29 (11): 919-924.
7. Prado D. As caatingas da América do Sul. In: Leal IR, Tabarelli M, Silva JMC. Ecologia e conservação da Caatinga. Recife: Editora Universitária, 2003. p. 3-73.
8. Leal IR, Silva JMC, Tabarelli M, Lacher JRTE. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. Megadiversidade. 2005. 1 (1): 139-146.
9. Rizzini CT. Tratado de Fitogeografia do Brasil. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 1976.
10. MMA (Ministério do Meio Ambiente). Caatinga. 2014. Cited 2014 Jul 16. Available from: <http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>.
11. Rio Grande do Norte. PNUD/FAO/IBAMA. Diagnóstico florestal do Rio Grande do Norte. Natal – RN; 1993. p. 3, 11, 13, 17-19.
12. Mosca VP, Loiola MIB. Uso popular de plantas medicinais no Rio Grande do Norte, nordeste do Brasil. Revista Caatinga. 2009. 22 (44): 225-234.
13. Pott A, Pott VJ, Souza TW. Plantas daninhas de pastagem na região dos cerrados. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte; 2006.
14. Maia GN. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D & Z; 2004.
15. Duque JG. O nordeste e as lavouras xerófilas. 4. ed. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil; 2004.
16. Bayma C. Oiticica. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola do Ministério da Agricultura; 1957.
17. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum; 2002.

18. Dennis YCL, Xuan W, Leung MKH. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Appl Energy*. 2010. 87: 1083-1095.
19. Afonso JAB, Borges JRJ. Compactação do rúmen. In: Riet-correa F, Schild AL, Mendez MC, Lemos RAA. (Eds). *Doenças de Ruminantes e Equinos*. Santa Maria: Editora Palloti, 2007.
20. Banco de Dados de Plantas do Nordeste (BNPD). *Licania rigida* Benth. 2014. Cited 2014 Oct 01; Available from: http://www.cnip.org.br/banco_img/Oiticica/licaniarigidabenth.html.
21. Oliveira LGL, Afonso JAB, Mendonça CL, Costa NA, Souza MI, Vieira ACS. Compactação do rúmen e abomaso por coco catolé (*Syagrus olearacea*) em ovelha da raça Dorper. *Ciênc. Vet. Tróp.* 2007. 10 (1): 36-41.
22. Kapanen A, Itavaara M. Ecotoxicity tests for compost applications. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2001. 49: 1-16.
23. Fletcher JA. Brief overview of plant toxicity testing. In: Goruch JW, Lower WR, Lewis MA, Wang W. *Plants for toxicity Assessment*. Astm, Philadelphia, PA. ASTM Publication code number (PCN) 04011150-16. pp. 1-11; 1991.
24. OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). *Guideline 208: Terrestrial Plants, Growth Test*. OECD Guidelines for testing of chemical. OECD Paris; 1984.
25. Chandra S. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. *Science of Total Environment*. 2005. 347: 46-52.
26. Ma, TH. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*. 1995. 334 (2): 185-195.
27. Tice R. The Single Cell/ Comet Assay: A microgel eletroforetic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cell. In: Phillips DH, Vennit S. (Eds.). *Environmental Mutagenesis*. Oxford: Bios Scientific Publishers Ltd.; 1995. p. 315-339.
28. Wasson GR, Mckelvey-Martin J, Downes CS. The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis*. 2008. 23 (3): 153-162.
29. Mughal A, Vikram A, Ramarao P, Jena GB. Micronucleus and comet assay in the peripheral blood of juvenile rat: Establishment of assay feasibility, time of sampling and the induction of DNA damage. *Mutation Research*. 2010. 700 (1-2): 86-94.

30. Terredas, M.; Martín, M.; Tusell, L.; Genescà, A. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?. *Mutation Research*. 2010. 705 (1): 60-67.
31. Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mutation Research*. 2010. 705 (1): 11-19.
32. Franzle O. Bioindicators and environmental stress assessment. In: Markert BA, Breure AM, Zechmeister HG. *Bioindicators and biomonitors*. 2003: 41- 84.
33. Antunes LMG, Araújo MCP. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. *Rev. Nutr.* 2000. 13 (2): 81-88.
34. Schnaider TB, Souza C. Aspectos éticos da experimentação animal. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 2003. 53 (1): 278-285.
35. Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*. 2000. 455: 81-95.
36. Al-Sabti K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*. 1995. 343: 121-135.
37. Joseph LJ, Patwardhana UN, Samuel AM. Frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes from subjects occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Mutation Research*. 2004. 564: 83-88.
38. Hayashi M, Macgregor JT, Gatehouse DG, Blakey DH, Dertinger SD, Abramsson-Zetterberg L, Krishna G, Morita T, Russo A, Asano N, Suzukim H, Ohyamal W, Gibson D. *In vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. *Mutation Research*. 2007. 627: 10-30.
39. Ribeiro JC. Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) e do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) *in vivo*. [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2010.
40. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Bridges BA. *Chemical mutagens. Principles and methods for their detection*. New York: Ed. A. Hollaender Plenum Press; 1976. p. 31-53.
41. Heddle JA. A rapid *in vivo* test for chromosome damage. *Mutation Research*. 1973. 18: 187-190.
42. Hayashi M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*. 1999. 245 (4): 245-249.

43. Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK. Mutagênese Ambiental. Ed. ULBRA; 2003.
44. Terra Junior ON. Estudo do potencial genotóxico de um extrato aquoso de *Schinus terebinthifolius* Raddi: uma análise in vivo com ensaio de micronúcleo. [Monografia]. Rio de Janeiro: Centro Universitário Estadual da Zona Oeste; 2012.
45. Brianezi G, Camargo JLV, Miot HA. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise para avaliação do teste do cometa corado pela prata. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2009. 45 (4): 325-334.
46. Hartmann A, Speit G. The contribution of cytotoxicity to DNA – effects in the single cell gel test (comet assay). Toxicol. Lett. 1997. 90 (2-3): 183-188.
47. Collins AR. The comet assay: topical issues. Mutagenesis. 2008. 23 (3): 143- 151.
48. Speit G, Vasquez M, Hartmann A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. Mutation Research. 2009. 681: 3-12.
49. Pavlica M, Klobucar GI, Mojas N, Erben, R, Papes D. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay. Mutation Research. 2001. 490: 209–214.
50. Freitas PS. Investigação do potencial mutagênico do extrato de frutos de *Vaccinium corymbosum* (mirtilo) em células do sangue periférico de camundongos *Swiss in vivo*. [Dissertação]. Alfenas: Universidade José do Rosário Vellano; 2007.

**3. CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICO E CITOTÓXICO DE
EXTRATOS AQUOSOS DE *Licania rigida* BENTH. EM SISTEMA *Allium cepa***

Trabalho submetido à Revista:
REVISTA CAATINGA
Página eletrônica:
<http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/sistema/index>
ISSN: 1983-2125 (on-line)
0100-316X (impresso)

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICO E CITOTÓXICO DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Licania rigida* BENTH. EM SISTEMA *Allium cepa*¹

Naama Jessica de Assis Melo^{2*}, Edigleyce de Lima Costa³, Eliezer Fernandes da Silva Filho³,
José Carlos da Silveira Pereira³, Liz Carolina da Silva Lago Cortês Assis⁴, Marcos Antonio
Nobrega de Sousa⁴.

RESUMO: A espécie *Allium cepa* é bastante utilizada em estudos como bioindicador de toxicidade, podendo ser afetada por extratos de outras plantas por meio da alelopatia. Muitas plantas tóxicas de interesse pecuário possuem compostos alelopáticos e ocasionam danos à saúde animal. Dentre estas plantas está a *Licania rigida* (oiticica). O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos tóxicos e citotóxicos de extratos de *L. rigida* em bulbos de *A. cepa*. Os bulbos foram incubados em água destilada (controle negativo) e nas concentrações de 5 mg/L, 50 mg/L e 300 mg/L dos extratos aquosos de folhas secas e frescas. Foram avaliados o crescimento das raízes e a inibição relativa. Nos bulbos foram feitas lâminas das células meristemáticas das raízes para a avaliação de citotoxicidade. Os extratos de folhas secas e frescas nos bulbos ocasionaram inibição nas concentrações de 5 mg/L e 300 mg/L, enquanto que a concentração de 50 mg/L estimulou. Não foi evidenciada atividade citotóxica dos extratos aquosos de folhas secas e frescas, pois não houve diferenças estatisticamente significantes.

Palavras-chave: Alelopatia; Citotoxicidade; Crescimento.

*Autor para correspondência.

¹ Trabalho de dissertação do primeiro autor.

² Biotecnologista, Discente do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN. e-mail: naama.jessica@gmail.com

³ Biotecnologistas, Discentes do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN.

⁴ Docente Doutor. Departamento de Ciências Animais – DCAn. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

EVALUATION OF TOXIC AND CYTOTOXIC EFFECTS OF THE AQUEOUS EXTRACTS OF *LICANIA RIGIDA* BENTH. IN *ALLIUM CEPA* SYSTEM

ABSTRACT: The species *Allium cepa* is widely used in studies such as biological indicator of toxicity and can be affected by other plant extracts through allelopathy. Many toxic plants of livestock interest have allelopathic compounds and cause damage to animal health. Among these plants is *Licania rigida* (oiticica). The objective of this study was to evaluate the toxic and cytotoxic effects of *L. rigida* extracts in bulbs of *A. cepa*. The bulbs were incubated in distilled water (negative control) and at concentration 5 mg/L, 50 mg/L and 300 mg/L of aqueous extracts of dried and fresh leaves. It was evaluated the root growth and relative inhibition. With the bulbs blades were made of meristematic root cells for the evaluation of cytotoxicity. The extracts of the dry and fresh leaves in bulbs caused inhibition at concentrations of 5 mg/L and 300 mg/L, while the concentration of 50 mg/L stimulated. It was not observed cytotoxic activity of the aqueous extracts of dried and fresh leaves, because there were no statistically significant differences.

Keywords: Allelopathy; Cytotoxicity; Growth.

INTRODUÇÃO

Algumas plantas produzem compostos do metabolismo secundário que atuam inibindo ou favorecendo o progresso germinativo, bem como o processo de divisão celular. Estes compostos são conhecidos como alelopáticos. O termo alelopatia refere-se à capacidade que as plantas têm de interferir no desenvolvimento de outras plantas por meio de substâncias que liberam na atmosfera ou, quase sempre, no solo (MEDEIROS, 1990; FERREIRA; BORGUETTI, 2004). A ação alelopática se dá através do efeito destas substâncias aliado às condições ambientais. A alelopatia pode ser um fator determinante do sucesso ou insucesso no cultivo de plantas (FERREIRA; BORGUETTI, 2004).

A ação visível dos aleloquímicos sobre as plantas é somente uma sinalização secundária de mudanças anteriores. Assim, os estudos referentes ao efeito de aleloquímicos sobre a germinação e/ou desenvolvimento de planta são manifestações secundárias de processos ocorridos inicialmente a nível molecular e celular (FERREIRA; AQUILA, 2000). A maioria dos estudos com alelopatia refere-se apenas ao efeito do aleloquímico sobre a germinação e o crescimento da planta-teste, sem considerar os eventos celulares relacionados às mudanças fisiológicas e genéticas (PIRES et al., 2001).

O uso de ensaios biológicos para avaliação da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas tem sido frequentemente incorporado a identificação e monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas (NOLDIN et al., 2003).

Sistemas testes vegetais, como o de *Allium cepa* L., têm sido utilizados para o estudo dos efeitos de extratos vegetais, visando a detecção de toxicidade e citotoxicidade (FACHINETTO et al., 2007). Esse sistema também tem importância no monitoramento da poluição ambiental e avaliação do potencial mutagênico de muitos compostos químicos (MA et al., 1995).

Além de sua grande utilização nos testes de citotoxicidade/mutagenicidade de compostos químicos e monitoramento da poluição ambiental, o sistema vegetal de *A. cepa* pode ser utilizado para estudos de extratos de plantas medicinais e plantas tóxicas de interesse pecuário. As células meristemáticas de raízes de *A. cepa* são indicadores apropriados para a detecção destes efeitos (MA et al., 1995).

As pesquisas com plantas tóxicas de interesse pecuário (vegetais que sob condições naturais causam danos à saúde animal, produzindo sintomas clínico-patológicos e, possivelmente, morte) no Brasil, tem-se limitado, principalmente, à identificação das espécies tóxicas e à determinação dos sinais clínicos, da patologia e alguns aspectos da epidemiologia das intoxicações (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001; TOKARNIA et al., 2000). Poucos esforços têm sido realizados para determinar os seus efeitos citotóxicos nas células.

Uma das plantas tóxicas presentes na região do semiárido brasileiro é a *Licania rigida*, comumente conhecida como oiticica. O seu consumo por caprinos e ovinos ocasiona uma ação tóxica denominada compactação ruminal (ASSIS et al., 2009). Contudo, não se tem conhecimento sobre seus efeitos citotóxicos e tóxicos a nível celular.

Este trabalho objetivou avaliar o efeito dos extratos aquosos de folhas secas e frescas de *Licania rigida*, sobre o crescimento das raízes de bulbos e sementes de *Allium cepa* (cebola) e índice mitótico de células meristemáticas de bulbos, com o intuito de identificar a existência de efeito tóxico e citotóxico destes extratos sobre o desenvolvimento do organismo bioindicador escolhido.

MATERIAL E MÉTODOS

No município de Angicos, na fazenda Vista Bela, foram coletadas amostras de folhas de *Licania rigida* durante a estação seca. A identidade botânica da espécie foi obtida no Herbário Dardano de Andrade-Lima da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), sob o código 14523 (em anexo imagem do material vegetal identificado). As folhas foram

armazenadas à temperatura ambiente em sacos plásticos para o transporte posterior ao laboratório de Genética e Evolução, localizado na UFERSA.

Para a obtenção do extrato aquoso do material vegetal seco, folhas frescas de *Licania rigida* foram desidratadas em bancada à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e depois de secas foram trituradas em liquidificador até sua transformação em um pó fino. O extrato aquoso foi obtido a partir deste pó, pela adição de água destilada (10g de pó em 100 ml de água destilada), seguida de descanso por 24 horas. A mistura obtida foi filtrada em tecido organza, o material foi centrifugado a 2000 rpm por cinco minutos e estocado a 5°C para uso posterior (TORRES et al., 2006).

Para a preparação do extrato aquoso do material vegetal fresco de *L. rigida*, folhas frescas (100 g) foram lavadas e homogeneizadas em 1000 mL de água destilada em liquidificador, por cerca de 10 minutos. O material foi filtrado em tecido organza e em seguida centrifugado por 30 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi retirado e estocado a 5°C até o momento da sua utilização (BARBOSA, 2008).

Os ensaios de toxicidade com bulbos de *Allium cepa* para a avaliação do extrato aquoso de folhas secas e do extrato aquoso de folhas frescas de *L. rigida* seguiram a metodologia descrita por Fiskesjo (1988), com algumas modificações. Os bulbos de cebola foram obtidos comercialmente de supermercados na cidade de Mossoró-RN e mantidos em local livre de umidade e ao abrigo da luz. Foram lavados em água corrente durante duas horas para a retirada de impurezas. As raízes velhas e secas foram removidas cuidadosamente para que a área radicular não fosse danificada.

Posteriormente, os bulbos foram colocados em recipientes plásticos com capacidade para 50 ml de extrato. Para cada grupo avaliado foram incubadas seis cebolas em iguais condições. Cada ensaio (extrato seco e extrato fresco) foi composto por: controle negativo: (água destilada); grupo com concentração de 5 mg/L do extrato; grupo com concentração de 50 mg/L do extrato; e grupo com concentração de 300 mg/L do extrato.

Após 72 horas, o comprimento das três maiores raízes de cada cebola foi medido utilizando um paquímetro digital. Foi calculado o Índice de Crescimento Relativo (ICR), por meio da divisão entre o comprimento da radícula na amostra e o comprimento da radícula no controle negativo, de acordo com Young et al. (2012), dado este utilizado para obter a inibição relativa (%).

A avaliação de citotoxicidade pelo índice mitótico foi realizada com bulbos de cebola (extrato de folhas secas e extrato de folhas frescas). Para a determinação do índice mitótico foi utilizada a técnica de esmagamento (GUERRA; SOUZA, 2002), com modificações.

Foram coletadas as radículas das cebolas, que foram fixadas em Carnoy (3:1, álcool etílico: ácido acético) por um período de 24 horas e acondicionadas em geladeira. Em seguida procedeu-se: lavagem com água destilada por cinco minutos; ácido clorídrico 0,1N por 11 minutos em banho-maria à 60°C; e três lavagens com água destilada. Após, as radículas foram transferidas para lâmina, onde em lupa binocular foi retirada a coifa para a obtenção do meristema apical que foi corado com Orceína acética 2%. As lâminas foram observadas em microscópio óptico.

Foram contadas, em teste cego, 1000 células por bulbo. O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose, pelo número total de células observado e multiplicando-se por 100 (KUMARI et al., 2009). Neste cálculo, foram identificadas e analisadas células em prófase, metáfase, anáfase e telófase. Pois as células em intérfase não estão no processo de divisão celular. Já o Valor Limite de Citotoxicidade foi calculado a partir da divisão do índice mitótico da amostra pelo índice mitótico do controle negativo e multiplicando-se por 100 (MIGID et al., 2007).

Para os dados de crescimento de raízes foi realizada Análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$) e para a avaliação do índice mitótico, foi realizada (ANOVA) ($p < 0,05$), seguido do teste de Dunnett ($p < 0,05$). As avaliações estatísticas foram realizadas com o auxílio do software R (versão 3.2.0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de toxicidade dos extratos aquosos de folhas secas e frescas sobre o crescimento de raízes de bulbos de *A. cepa* L. e do teste de inibição estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Inibição relativa do crescimento das raízes de bulbos de *Allium cepa* L. expostas ao controle negativo e às diferentes concentrações dos extratos aquosos de folhas secas (EAFS) e frescas (EAFF). Os valores foram expressos em médias \pm desvio padrão. * ($p < 0,05$) corresponde à diferença significativa entre as concentrações dos extratos e o controle negativo. Método de Análise de Variância (ANOVA).

Concentração	EAFS		EAFF	
	Média do crescimento de raízes (mm)	Inibição relativa (%)	Média do crescimento de raízes (mm)	Inibição relativa (%)
Controle -	6,9 \pm 9,0	100	21,0 \pm 15,0	100
5 mg/L	1,6 \pm 2,6	76,8	14,0 \pm 12,0	33,3
50 mg/L	8,9 \pm 6,7	-29	28,0 \pm 12,0	-33,3
300 mg/L	2,64 \pm 3,0	62,3	4,6 \pm 4,0	78,1

No crescimento das raízes dos bulbos de cebola expostas às concentrações do extrato de folhas secas de *L. rigida* não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações testadas e o controle negativo. Dessa forma, não se pode afirmar que o extrato preparado com as folhas secas é tóxico nessas concentrações para o crescimento de raízes de *A. cepa*. Entretanto, na concentração de 50 mg/L, não houve inibição do crescimento, mas sim um estímulo, diferentemente do que ocorreu nas concentrações de 5 mg/L e 300 mg/L.

Na análise do crescimento das raízes expostas às concentrações do extrato de folhas frescas, observou-se também uma estimulação do crescimento das raízes na concentração de 50 mg/L. Nas concentrações de 5 mg/L e 300 mg/L (menor valor entre os tratamentos) houve uma redução do crescimento.

Com relação aos valores do teste de inibição relativa, resultados semelhantes foram encontrados para ambos os extratos. As concentrações de 5 mg/L e 300 mg/L inibiram o crescimento das raízes de *A. cepa* em relação ao crescimento do controle negativo, enquanto que a concentração de 50 mg/L estimulou, o que gerou valores negativos de inibição relativa. Tabela 1.

Assim, devido aos extratos de folhas secas e frescas terem exercido influência sobre o crescimento de raízes de bulbos de *A. cepa* sugere-se possivelmente, que, existe a presença de substâncias alelopáticas, que quando liberadas em quantidades suficientes causam inibição ou estimulação (dependendo da concentração) da germinação, crescimento e/ou desenvolvimento de plantas já estabelecidas (CARVALHO, 1993; CHON et al., 2005).

As alterações também podem ser causadas por substâncias do metabolismo secundário de *L. rigida* como: flavonoides, principalmente miricetina (CHAFFAUD; EMBERGER, 1960), dipertenos (1 β , 16 α , 17-trihidroxicaurano), tripertenos (lupeol, ácido betulínico e esqualeno), esteroides (β -sitosterol e estigmasterol livres e glicosilados), tocoferóis (α -tocoferol e α -tocotrienol), ácido graxo (ácido licânio) e a licanolina (4,6-dicumaroil-1-metoxiciclopiranose) (BEZERRA, 2011).

Nos ensaios de citotoxicidade foram avaliados dois parâmetros: o índice mitótico (IM) de células meristemáticas de raízes de bulbos de *A. cepa* (Figura 1); e o valor limite de toxicidade (%) (tabela 2).

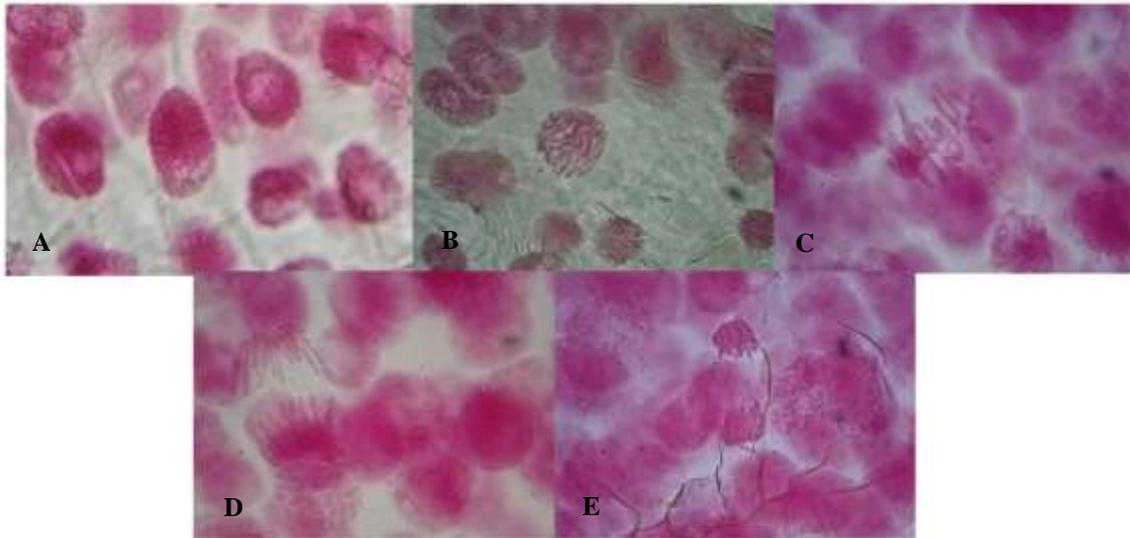


Figura 1. Células de *Allium cepa* em intérfase (A) e em mitose, nas fases de prófase (B), metáfase (C), anáfase (D) e telófase (E).

As diferenças observadas no índice mitótico não foram estatisticamente significativas em relação ao controle negativo, a 5% de probabilidade. Contudo, foi observado que as concentrações de 5 mg/L e 50 mg/L do extrato aquoso de folhas secas não dificultaram a divisão celular, diferentemente da concentração de 300 mg/L.

Já as concentrações do extrato de folhas frescas reduziram o índice mitótico, prejudicando a divisão celular, demonstrado pelos valores limite de citotoxicidade de cada grupo. Tabela 2.

Tabela 2. Índice mitótico (%) \pm desvio padrão (SD), número de células nas diferentes fases do ciclo celular \pm Desvio padrão e valor limite de citotoxicidade (VLC %) de células de raiz de bulbos de *Allium cepa* após exposição ao controle negativo e diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas secas e frescas.

Extrato	Concentração	IM (%)	Fases				VLC (%)
			Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	
Aquoso de folhas secas	0 mg/L	4,4 \pm 1,27	27,5 \pm 6,36	13 \pm 5,65	3,5 \pm 0,7	0 \pm 0	100
	5 mg/L	4,8 \pm 0 ^{ns}	32 \pm 0 ^{ns}	9 \pm 0 ^{ns}	5 \pm 0 ^{ns}	2 \pm 0 ^{ns}	109,1
	50 mg/L	6,1 \pm 1,27 ^{ns}	50,5 \pm 10,6 ^{ns}	6,5 \pm 0,7 ^{ns}	3 \pm 1,41 ^{ns}	1 \pm 0 ^{ns}	138,6
	300 mg/L	4,05 \pm 0,49 ^{ns}	28 \pm 8,48 ^{ns}	8 \pm 8,48 ^{ns}	2,5 \pm 2,12 ^{ns}	2 \pm 2,82 ^{ns}	92
Aquoso de folhas frescas	0 mg/L	5,3 \pm 0,28	34,5 \pm 2,12	11 \pm 4,24	7 \pm 4,24	0,5 \pm 0,7	100
	5 mg/L	3 \pm 0,84 ^{ns}	22 \pm 2,82 ^{ns}	4,5 \pm 2,12 ^{ns}	3 \pm 2,82 ^{ns}	0,5 \pm 0,7 ^{ns}	56,6
	50 mg/L	4,05 \pm 0,49 ^{ns}	23 \pm 4,24 ^{ns}	11,5 \pm 3,53 ^{ns}	5,5 \pm 4,94 ^{ns}	0,5 \pm 0,7 ^{ns}	76,4
	300 mg/L	2,15 \pm 1,06 ^{ns}	17 \pm 5,65 ^{ns}	4 \pm 4,24 ^{ns}	0,5 \pm 0,7 ^{ns}	0 \pm 0 ^{ns}	40,6 ^a

ns = não significativo, a=efeito subletal.

Migid et al. (2007) afirmam que uma redução do índice mitótico para valores limite de citotoxicidade abaixo de 22% em relação ao controle negativo, causa efeito letal nos organismos testes, enquanto que uma redução abaixo de 50% tem efeito subletal. Este efeito subletal foi observado nos bulbos da concentração de 300 mg/L do extrato aquoso de folhas frescas (Tabela 2)

Os testes de citotoxicidade realizados pelo sistema teste de *A. cepa* baseiam-se em diversos parâmetros de análise, como por exemplo, padrões nucleolares atípicos, como células binucleadas. A diminuição do índice mitótico é a consequência de compostos tóxicos nas células, evidenciando claramente a manifestação de distúrbios do processo mitótico (BAGATINI et al., 2007).

Segundo Fernandes et al. (2007), o nível de citotoxicidade de um composto teste pode ser determinado com base no aumento ou na redução do índice mitótico, o qual pode ser usado como parâmetro de citotoxicidade em estudos de avaliações de toxicidade de extratos de plantas.

Valores de índices mitóticos (IM) menores que os do controle negativo podem indicar que o crescimento e o desenvolvimento dos organismos bioindicadores estão sendo afetados pelos compostos avaliados. Em contrapartida, valores de IM acima do encontrado no controle

negativo é resultado do aumento da divisão celular, o qual pode caracterizar um evento prejudicial para as células, pois pode culminar em uma proliferação descontrolada ou, até mesmo, a formação de tumores (HOSHINA, 2002).

Ambas as situações foram observadas neste trabalho, nas concentrações de 5 mg/L e 50 mg/L dos ensaios com extrato de folhas secas foram constatados índices mitóticos maiores que o do controle negativo e nas três concentrações do extratos de folhas frescas foram observados índices menores que o do controle.

De acordo com Hoshina (2002), o aumento ou a redução do índice mitótico pode ser um importante bioindicador de toxicidade de extratos de plantas, principalmente aqueles com potenciais compostos citotóxicos. Smaka-Kincl et al. (1997) relataram que a redução do índice mitótico em células meristemáticas de *A. cepa* pode ser considerado um método seguro para determinar a presença de compostos citotóxicos.

Diante disso, é possível observar pelo valor limite de citotoxicidade que extrato aquoso de folhas frescas de *L. rigida* possui maior efeito citotóxico que o extrato de folhas secas. A possível ausência dos compostos do metabolismo secundário no extrato de folhas secas pode ter estimulado as células a se dividirem, aumentando então o índice mitótico em relação ao ensaio com o extrato de folhas frescas (BAGATINI et al., 2007).

CONCLUSÃO

Os bulbos de *Allium cepa* foram sensíveis aos extratos aquosos de folhas secas e frescas de *Licania rigida*, com efeito subletal na concentração de 300 mg/L desta última.

A ação dos extratos aquosos de folhas secas e frescas de *L. rigida* provoca efeito alelopático sobre bulbos de cebola, de acordo com a concentração aplicada.

Estudos mais aprofundados e possíveis mudanças no manejo da alimentação dos animais de produção com as folhas de *L. rigida* podem ser realizadas, a fim de minimizar os possíveis efeitos tóxicos nos animais.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, T. S. et al. Intoxicações por plantas em ruminantes e equídeos no Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 919-924, 2009.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.

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.

BEZERRA, J. N. S. **Estudo fitoquímico de *Licania rigida* Benth (Chrysobalanaceae).** 2011. 158 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CARVALHO, S. I. C. **Caracterização dos efeitos alelopáticos de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no estabelecimento das plantas de *Stylosanthes guianensis* var . *vulgaris* cv. Bandeirante.** 1993. 72 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1993.

CHAFFAUD, M; EMBERGER, L. **Traité de Botanique Systematique** Vol. II. Paris: Masson, p. 1338-1340. 1960.

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

FACHINETTO, J. M. et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Rev Bras Farmacognosia**, v. 17, p. 49-54, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pestic. Biochem. Phys.**, v. 88, p. 252–259, 2007.

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

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

FISKESJO, G. The *Allium* Test II: Assesmente of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environ Toxicol Water Qual**, v. 9, p. 234-241, 1994.

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

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

HOSHINA, M. M. **Evaluation of a possible contamination of the waters of the Claro River – municipality of Rio Claro, part of the Corumbataí River Basin, with the mutagenicity tests using *Allium cepa***. 2002. 52 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, 2002.

KNOKE, K. L. et al. A comparison of five bioassays to monitor toxicity during bioremediation of Pentachlorophenol contaminated soil. **Water Air Soil Pollut.**, v. 110, p. 157–169, 1999.

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

MA, T. H. et al. The improved *Allium Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutat Res.**, v. 334, p. 185-195, 1995.

MEDEIROS, A. R. M. Alelopatia: importância e suas aplicações. **Horti Sul**, v.1, n.3, p.27-32, 1990.

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.

NOLDIN, V. F.; MONACHE, F. D.; YUNES, R. A. Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L. cultivada no Brasil. **Química Nova**, v.26, n.3, p.331-334, 2003.

PIRES, N. M. et al. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, n.1, p.55-65, 2001.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21, n. 1, 2001.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; TOMAN, M. J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium cepa* test procedure. **Mutat. Res.**, v. 368, 171–179, 1997.

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

TORRES, A. L. et al. 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.

YOUNG, B. J.; RIERA, N. I.; BEILY, M. E.; BRES, P. A.; CRESPO, D. C.; RONCO, A. E. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n.76, p.182-186, 2012.

**4. CAPÍTULO III – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICO E MUTAGÊNICO
DO EXTRATO AQUOSO DE *Licania rigida* BENTH. EM CAMUNDONGOS
*Mus musculus***

Trabalho submetido à Revista:

REVISTA CAATINGA

Página eletrônica:

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

ISSN: 1983-2125 (on-line)

0100-316X (impresso)

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICO E MUTAGÊNICO DO EXTRATO AQUOSO DE *Licania rigida* BENTH. EM CAMUNDONGOS *Mus musculus*¹

Naama Jessica de Assis Melo², Eliezer Fernandes da Silva Filho³, Edigleyce De Lima Costa³, José Carlos da Silveira Pereira³, Carlos Campos Camara⁴, Marcos Antonio Nobrega de Sousa⁴.

RESUMO – A espécie vegetal *Licania rigida*, popularmente denominada oiticica, é típica do bioma Caatinga e está presente em diversos estados da região Nordeste, incluindo o Rio Grande do Norte. *L. rigida* está incluída no grupo de plantas tóxicas de interesse pecuário, ocasionando danos fisiológicos em animais de produção. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade tóxica aguda e mutagênica do extrato aquoso de folhas secas de *L. rigida* sobre células da medula óssea de camundongos *Swiss*. O estudo para DL50 e *screening* hipocrático seguiu diretrizes do *Guideline 423* da OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*). Para avaliação de mutagenicidade, foi realizado teste do micronúcleo em células da medula óssea. Para DL50 foi encontrada concentração = 502,76 mg/kg e houve alterações dos parâmetros do *screening* hipocrático, indicando toxicidade. O número de micronúcleos nos grupos tratados com as concentrações do extrato foi maior que o grupo controle negativo, mas não houve significância estatística. O mesmo foi observado no número de células binucleadas. Dessa forma, o extrato aquoso de folhas secas de *L. rigida* apresentou toxicidade aguda e não demonstrou atividade mutagênica neste ensaio.

Palavras-chave: Extratos. Mutagenicidade. Plantas. Toxicidade.

*Autor para correspondência.

¹ Trabalho de dissertação do primeiro autor.

² Biotecnologista, Discente do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN. e-mail: naama.jessica@gmail.com

³ Biotecnologistas, Discentes do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN.

⁴ Docente Doutor. Departamento de Ciências Animais – DCAn. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

EVALUATION OF TOXICITY AND MUTAGENIC EFFECTS OF AQUEOUS EXTRACT OF *LICANIA RIGIDA* IN MICES *MUS MUSCULUS*

ABSTRACT – The plant species *Licania rigida*, popularly called oiticica, is typical of the Caatinga biome and is present in several states in the Northeast, including Rio Grande do Norte. The *L. rigida* is included in the group of toxic plants of livestock interest, the physiological damage in farm animals. Thus, the main objective of this study was to evaluate the acute toxic and mutagenic capacity of the aqueous extract of *Licania rigida* on the bone marrow cells of Swiss mice. The study for LD50 and hippocratic screening followed the Guideline 423 of OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development). To assess the mutagenicity, micronucleus test was carried out on bone marrow cells. For LD50 concentration was found 502,76 mg/kg and it was changes in hippocratic screening parameters, indicating toxicity. The number of micronuclei in the groups treated with the concentrations of the extract was higher than the negative control group, but there was no statistical significance. The same was observed in the number of binucleated cells. Thus, the aqueous extract of dried leaves of *L. rigida* had acute toxicity and showed no mutagenic activity on this experiment.

Keywords: Extracts. Mutagenicity. Plants. Toxicity.

INTRODUÇÃO

Plantas tóxicas de interesse pecuário ocasionam prejuízos relevantes aos produtores em todo o mundo. No Brasil, essas plantas causam perdas econômicas diretas e indiretas. As diretas podem ser: a morte de animais, baixo índice reprodutivo (abortos, malformações e infertilidade), baixa produtividade nos animais sobreviventes e outras alterações devidas a doenças transitórias, enfermidades subclínicas com diminuição da produção de leite, lã ou carne, e aumento da susceptibilidade a outras doenças devido à depressão imunológica. Já as perdas indiretas, incluem os custos para o controle das plantas tóxicas nas pastagens, as medidas de manejo para evitar as intoxicações como a utilização de cercas e o pastoreio alternativo, a redução do valor da forragem devido ao atraso na sua utilização, a redução do valor da terra, a compra de novos animais para substituir aqueles mortos, e os gastos associados ao diagnóstico das intoxicações e ao tratamento dos animais afetados (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001; RIET-CORREA et al., 2007).

O número de plantas tóxicas para ruminantes no Brasil vem crescendo o conhecimento consideravelmente. Atualmente, são conhecidas 117 plantas tóxicas pertencentes a 70 gêneros (RIET-CORREA et al., 2007). *Pteridium aquilinum* é uma das plantas tóxicas de grande importância no país, com maior impacto econômico nas regiões sul e sudeste (ANJOS et al., 2008). No Rio Grande do Norte, na região do Seridó Ocidental e Oriental, *Ipomea asarifolia* e *Aspidosperma pyrifolium* são as plantas mais importantes como causa de intoxicação para ruminantes (SILVA et al., 2006). A espécie *Licania rigida*, também presente nesta região, apesar de não ser apontada como uma das principais plantas tóxicas, também ocasiona efeitos prejudiciais aos animais, especialmente caprinos e ovinos (LEAL et al., 2005). O consumo de suas folhas ocasiona compactação ruminal (ASSIS et al., 2009).

Pouco se conhece sobre os efeitos fisiológicos decorrentes do consumo de *L. rigida* e não há evidências de estudos em relação às consequências tóxicas e mutagênicas. Existem ensaios que detectam componentes mutagênicos e tóxicos permitem identificar substâncias com risco potencial aos animais (ANDREASSI et al., 2000).

As substâncias mutagênicas têm em comum propriedades químicas e físicas que permitem suas interações com os ácidos nucléicos. Devido à sua alta reatividade, podem levar a defeitos hereditários através de mutações em células germinativas, e quando a mutação ocorre em células somáticas, a consequência mais comum é a formação de tumores benignos ou malignos (ARUOMA, 2003). Além disso, foi proposto que as mutações em células somáticas podem também estar envolvidas na patogênese de algumas doenças crônicas degenerativas, como cardiovasculares, neurodegenerativas em adição ao processo de carcinogênese (ROSS; MARGOLIS, 2005).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade tóxica aguda e mutagênica do extrato aquoso obtido das folhas de *Licania rigida* sobre células da medula óssea de camundongos albinos *Swiss*, da espécie *Mus musculus*.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de folhas de *Licania rigida* foram coletadas no município de Angicos, RN durante a estação de estiagem, na fazenda Vista Bela. A identidade botânica foi obtida no Herbário Dardano de Andrade-Lima da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), sob o código 14523 (em anexo fotografia do material vegetal identificado). As amostras de folhas foram armazenadas à temperatura ambiente em sacos plásticos para o transporte ao laboratório de Genética e Evolução, localizado na UFERSA, onde foi realizado o extrato aquoso do material vegetal coletado.

Para a obtenção do extrato aquoso do material vegetal, as amostras de folhas frescas de *Licania rigida* foram coletadas, desidratadas em bancada a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e depois trituradas em liquidificador até sua transformação em um pó fino. O extrato aquoso foi obtido a partir deste pó pela adição de água destilada (10g de pó em 100 ml de água destilada), deixando a mistura em descanso por 24 horas. A mistura obtida foi filtrada em tecido organza, centrifugado a 2000 rpm por cinco minutos e estocados a 5°C para uso posterior (TORRES et al., 2006).

54 camundongos da linhagem *Swiss* (*Mus musculus*) (25-40g), 27 machos e 27 fêmeas, foram obtidos no biotério da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e mantidos no biotério do laboratório de Farmacognosia e Farmacologia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) para utilização na avaliação da DL50 (dose letal mediana) e nas análises de mutagenicidade.

O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) (Parecer N° 27/2014, em anexo). Todos os animais foram tratados em conformidade com os princípios definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), obedecendo, também, aos preceitos da legislação brasileira (Lei Arouca - Lei n° 11794, de 8 de outubro de 2008).

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno adequadas a sua manutenção com controle da temperatura a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e manutenção de ciclo diário claro/escuro natural, recebendo ração padrão e água filtrada à vontade tanto para o período de adaptação (96 horas) quanto durante a experimentação.

Os camundongos ficaram em jejum de ração por 12 horas anteriores ao período de experimentação, com restituição da mesma logo após a administração do extrato da planta ou do controle (LUCIO *et al.*, 2000).

A toxicidade aguda foi estabelecida por meio da estimativa da DL50 (dose letal mediana). Foi realizada de acordo com *Acute Toxic Class Method* (OECD, 2001) para teste de dose aguda tóxica (*Guideline* 423). De acordo com o guia da OECD, os três primeiros níveis de doses estabelecidas foram: 5, 50 e 300 mg/kg. Além disso, também foi utilizada mais uma dose de 600 mg/kg.

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados com 30 camundongos *Swiss*, (15 machos e 15 fêmeas divididos em cinco grupos.: controle negativo, com solução salina 0,9% (m/v), i.p., no volume de 10 ml/kg de peso corporal, segundo Lucio *et al.* (2000); e quatro grupos tratamento com doses de 5, 50, 300 e 600 mg/kg do extrato aquoso de *Licania rigida*,

respectivamente. Tanto a solução salina quanto o extrato aquoso foram administrados intraperitonealmente uma única vez.

Os parâmetros de toxicidade aguda foram monitorados através do registro do número de mortes de animais por grupo. E o *Screening* Hipocrático através da observação do comportamento dos animais dos grupos experimentais.

As observações foram realizadas no momento logo após a aplicação do extrato, por 24 horas, 48 horas e diariamente até o 14º dia, com o objetivo de avaliar os efeitos sobre os parâmetros: a) Atividade geral; b) Estado consciente e disposição (resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, endireitamento, força para agarrar, tônus do corpo); c) Atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular (auricular, corneal); d) Reflexos (tremores, convulsões, straub); e) Atividade do sistema nervoso central (lacrimação, respiração, salivação, micção, defecação, piloereção) (OECD, 2001). Para cada parâmetro foram utilizados os seguintes *scores* numéricos: 4 - normal; 3 - levemente reduzido; 2 - moderadamente reduzido; 1- intensamente reduzido; 0 - ausente (BRITO, 1994).

Para a avaliação da mutagenicidade foram utilizados 24 camundongos distribuídos em quatro grupos, constituídos cada um por seis animais (três machos e três fêmeas). Para testar três doses do extrato, conforme descrito a seguir: controle negativo (solução salina 0,9%, 10 ml/kg); extratos aquosos de *L. rigida* na concentração de 5 mg/kg; 50 mg/kg; e 200 mg/kg, respectivamente. As soluções foram injetadas intraperitonealmente. Após 24 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para a coleta do material da medula óssea do fêmur, segundo BONA (2011) com modificações.

Para cada exemplar de camundongo, foram preparadas duas lâminas, nas quais foram analisados 2000 eritrócitos para cada animal, onde foram contados o número de micronúcleos e o número de células binucleadas, segundo BONA (2011). A análise foi realizada e as imagens foram fotografadas em microscópio da marca Nikon, modelo Eclipse E-200, em objetiva de imersão, com aumento de 1000x acoplado a uma câmera digital com resolução de 12 megapixels.

Para a análise estatística do teste de toxicidade aguda, com cálculo da dose letal mediana (DL50) foi realizado o método clássico de regressão linear segundo descrito Litchifield e Wilcoxon (1949). Para a avaliação dos pesos dos machos e das fêmeas durante o *screening* hipocrático foi utilizada Análise de Variância (ANOVA), $p < 0,05$ com auxílio do teste de Tukey. Para a análise estatística do teste do micronúcleo foi realizada uma comparação entre a frequência de micronúcleos e as diferentes concentrações (tratamentos)

com uso da Análise de Variância (ANOVA), $p < 0,05$ e posterior aplicação do teste de Dunnett. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software R (versão 3.2.0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No cálculo da toxicidade aguda a maior concentração aplicada (600 mg/kg) ocasionou o maior número de mortes. Tabela 1. O que indica uma intensidade no efeito do extrato nesta concentração sobre a população em questão, tanto em machos quanto em fêmeas. No entanto, a partir da concentração de 300 mg/kg já foi possível registrar início de mortalidade nos machos, enquanto que nas fêmeas só ocorreu a partir da concentração 600 mg/kg.

As mortes ocorreram de 24 a 48 horas após o tratamento. Isso indica que o extrato deve ter uma absorção bastante rápida nos tecidos dos animais, levando à morte prematuramente (MARIZ *et al.*, 2006).

Tabela 1. Toxicidade aguda do extrato aquoso de *Licania rigida* de acordo com o número de mortes.

Dose (mg/kg)	n ^a	Mortes/Total
5	6	0/6
50	6	0/6
300	6	1/6
600	6	4/6

n^a: número de animais utilizados em cada nível de dose.

Os resultados para a DL50 indicaram que a concentração de extrato aquoso de *L. rigida* letal para 50% da população é 502,76 mg/kg, como observado pela regressão linear, a partir da equação $Y = 0,09945X - 0,0$ (Figura 1).

De acordo com o guia 423 da OECD (2001), o extrato aquoso de *L. rigida* se enquadra na Classe 4, com toxicidade média (substância com DL50 superior a 300 mg/kg e menor que 2000 mg/kg).

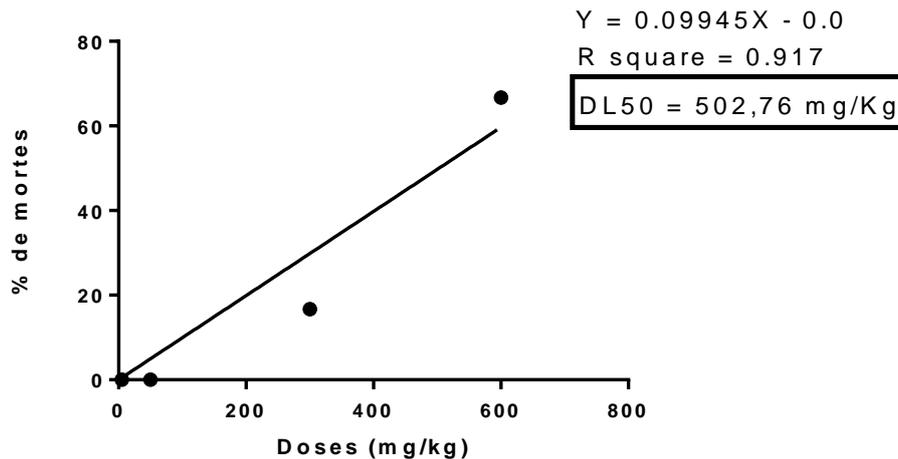


Figura 1. Dose letal mediana do extrato aquoso de *Licania rigida* administrado intraperitonealmente em camundongos, obtida por regressão linear.

A partir do sétimo dia de avaliação dos parâmetros do *screening* hipocrático foram observadas lesões nos locais de aplicação dos extratos (Figura 2) nos grupos de animais que receberam 300 mg/kg e 600 mg/kg do extrato de *L. rigida*. Tal efeito indica um intenso processo de necrose nas células dessa região. As lesões permaneceram durante todos os dias subsequentes de avaliações.

Estas lesões podem ter sido ocasionadas devido a um intenso processo inflamatório provocado pelo extrato de *L. rigida*. O processo inflamatório agudo consiste de uma liberação sequencial de mediadores e do recrutamento de leucócitos circulantes, os quais se tornam ativos da injúria e liberam mais mediadores pró-inflamatórios. A inflamação aguda pode ser dividida em três fases, cada qual mediada por diferentes mecanismos: uma fase inicial, caracterizada principalmente por vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular; uma fase tardia, com a infiltração de leucócitos e células fagocitárias e a fase proliferativa, na qual ocorre degeneração tecidual e fibrose (MURI et al., 2009). Esta última visualizada na figura 2.



Figura 2. Camundongo fêmea do grupo 300 mg/kg com lesão (indicada pela seta) após 14 dias da injeção intraperitoneal do extrato aquoso de *Licania rigida*.

O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (JAHN; GUNZEL, 1997). Tendo isso em vista, foi verificado o peso médio dos machos e das fêmeas de todos os grupos tratados.

Nas médias de peso de machos (Tabela 2; Figura 3), houve diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância em relação ao grupo controle (0 mg/kg) e as concentrações de 5 mg/kg e 300 mg/kg. Os animais tratados com estas concentrações do extrato aquoso de folhas secas de *L. rigida* demonstraram peso menor que o grupo controle. Tal fato indica possíveis efeitos tóxicos, dificultando a digestão dos alimentos e absorção dos nutrientes, afetando o ganho de peso dos animais (MARIZ *et al.*, 2006).

Com relação às médias de peso das fêmeas (Tabela 2; Figura 3), o comportamento entre os indivíduos deste mesmo sexo foi semelhante em todos os grupos tratados. E quando foi comparado os resultados entre machos e fêmeas, não houve diferenças estatisticamente significantes. Estes resultados de acordo com González e Silva (2003), que verificaram que o ganho de peso dos machos é semelhante ao das fêmeas. Mas, que a toxicidade sistêmica em camundongos e ratos pode ser avaliada por meio da alteração no peso dos animais.

Tabela 2. Peso médio dos machos e das fêmeas dos grupos controle (0 mg/kg) e tratados com diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas de *Licania rigida*. *Valores estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Tukey, $p < 0,05$).

Concentração	Peso médio					
	Fêmeas	npf	Machos	npm	Total	npt
Controle	35,57±0,68	3	42,90±0,3	3	39,23±4,04	6
5 mg/Kg	34,13±1,94 ^{ns}	3	30,43±3,84 ^{ns}	3	32,28±3,39 ^{ns}	6
50 mg/Kg	33,23±0,61 ^{ns}	3	41,30±0,5 ^{ns}	3	37,26±4,44 ^{ns}	6
300 mg/Kg	31,37±1,96 ^{ns}	3	34,30±1,57 ^{ns}	3	32,83±2,25 ^{ns}	6
600 mg/Kg	34,80±2,46 ^{ns}	3	37,83±0,59 ^{ns}	3	36,31±2,30 ^{ns}	6

ns=não significante

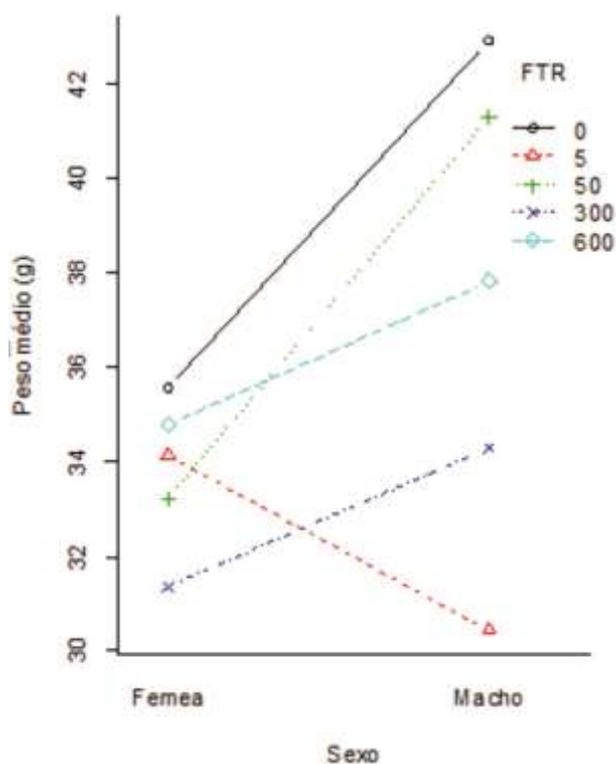


Figura 3. Interação entre o peso médio dos machos e das fêmeas dos grupos controle (0 mg/kg) e tratados com diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas de *Licania rigida*.

Na análise do *screening* hipocrático, durante as primeiras 24 horas após a administração intraperitoneal do extrato aquoso de *L. rigida*, houve redução na atividade geral e na resposta ao toque dos grupos de animais tratados com 300 mg/kg e 600 mg/kg. Foram observadas alterações em ambos os sexos, principalmente nos animais nos quais foram injetadas as concentrações de 300 mg/kg e 600 mg/kg, como: resposta ao aperto de cauda,

endireitamento, força para agarrar, tônus do corpo, atividade e coordenação do sistema motor (auricular e corneal) e na respiração.

Os resultados acima reportados estão de acordo com González e Silva (2003), que afirmam que a toxicidade sistêmica de determinada substância ou grupo de substâncias pode se manifestar por meio da redução no consumo de água e ração, alteração comportamental, apatia e má condição de pelagem.

Na avaliação da frequência de micronúcleos (Figura 4) foi observado que os grupos avaliados demonstraram resultados diferentes. Nas concentrações de 5 mg/kg e 200 mg/kg houve um estímulo na produção de micronúcleos em relação ao controle negativo, enquanto que na concentração de 50 mg/kg houve uma pequena redução.

Entretanto, as diferenças entre os tratamentos e os grupos controle não foram estatisticamente significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Dunnett. O número de células binucleadas também foi analisado nos grupos com as concentrações do extrato aquoso de folhas secas de *L. rigida*, mas, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) com a Análise de Variância seguida pelo teste de Dunnett (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação da frequência de micronúcleos e de células binucleadas em eritrócitos de camundongos expostos ao controle negativo (0 mg/kg) e as diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas secas de *L. rigida*. Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnett.

Concentração	Total de células	MN±SD	BN±SD
Controle	6000	4,7±2,7	3,66±1,96
5 mg/Kg	6000	6,5±2,0 ^{ns}	5,5±1,76 ^{ns}
50 mg/Kg	6000	3,7±1,9 ^{ns}	5,83±2,13 ^{ns}
200 mg/Kg	6000	6,7±4,0 ^{ns}	5,0±2,68 ^{ns}

MN=micronúcleos, SD=Desvio Padrão, BN=binucleadas, ns=não significativo.

Na análise de mutagenicidade, a avaliação da indução de micronúcleos é o principal teste *in vivo* dentre outros testes e é recomendado por agências fiscalizadoras em todo mundo como parte da avaliação de segurança dos produtos químicos e naturais. O ensaio detecta efeitos clastogênicos (quebras cromossômicas) e aneugênicos (perda de cromossomos inteiros). Um aumento na frequência de micronúcleos em testes com animais tratados com diferentes substâncias e concentrações é uma indicação de dano cromossômico induzido por toxicidade (WAHNSCHAFFE et al., 2005).

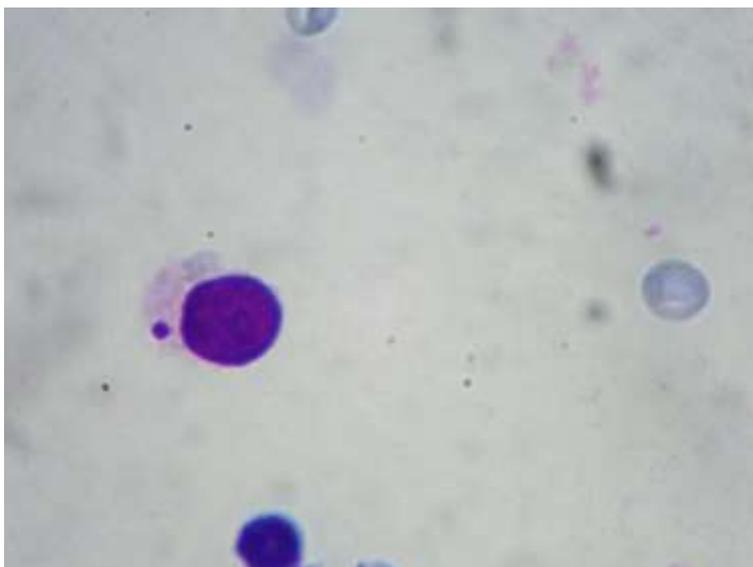


Figura 4. Micronúcleo em eritrócito de medula óssea de camundongo exposto ao extrato aquoso de folhas secas de *L. rigida*.

As células binucleadas (Figura 5) são indicativas de citotoxicidade, decorrente de uma falha no processo de citocinese. O aumento na sua incidência pode prever uma falha no mecanismo de diferenciação celular ou ser secundária a agentes mutagênicos (HOLLAND et al., 2008).

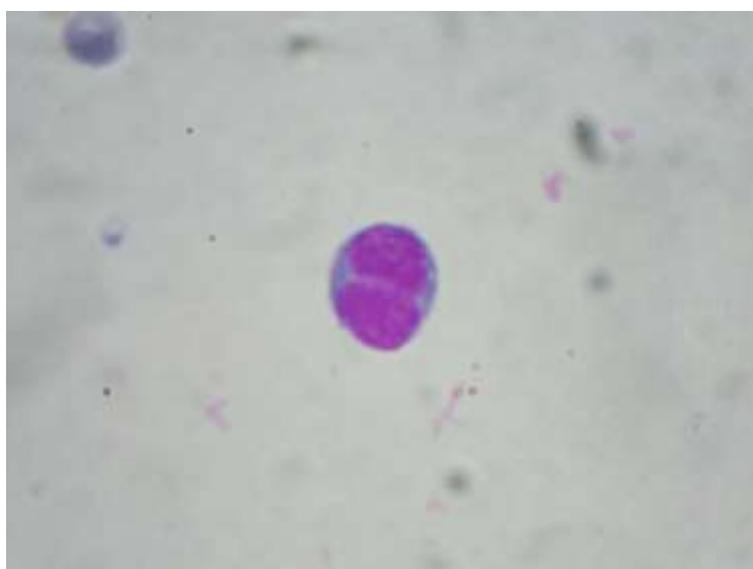


Figura 5. Eritrócito binucleado de medula óssea de camundongo exposto ao extrato aquoso de folhas secas de *L. rigida*.

A espécie *L. rigida* possui diversos metabólitos secundários, como diterpenos, esteroides e flavonoides (BEZERRA, 2011). Provavelmente estes compostos secundários presentes nas folhas podem ter sido responsáveis pela mutagenicidade e citotoxicidade observada nos eritrócitos de medula óssea dos animais bioindicadores utilizados. Os flavonoides são considerados potencialmente mutagênicos, pois a ação de alguns deles em animais está associada a interações com o ácido desoxirribonucleico (DNA) (SANCHEZ-LAMAR et al., 2008).

CONCLUSÃO

O extrato aquoso de folhas secas de *Licania rigida* possui efeito tóxico em camundongos, ocasionando mudanças comportamentais e, dependendo da dose, causa a morte.

Não houve citotoxicidade, mas sim efeito subletal na concentração de 300 mg/L e não houve ação mutagênica sobre os eritrócitos da medula óssea de camundongos nas concentrações estudadas.

Estudos posteriores são necessários para confirmar estes resultados para a população de animais de produção do semiárido que consomem as folhas de *L. rigida* na alimentação, a fim de melhorar o manejo e evitar perdas econômicas para os produtores.

REFERÊNCIAS

ANDREASSI, M. G. et al. Genetic instability and atherosclerosis: can somatic mutations account for the development of cardiovascular diseases. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 265-269, 2000.

ANJOS, B. L. et al. Intoxicação aguda por samambaia (*Pteridium aquilinum*) em bovinos na Região Central do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 10, p. 501–507, 2008.

ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidante actions of bioactive components in plant foods. **Mutat. Res.**, v. 523, p. 9-20, 2003.

ASSIS, T. S. et al. Intoxicações por plantas em ruminantes e equídeos no Sertão Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 919-924, 2009.

BEZERRA, J. N. S. **Estudo fitoquímico de *Licania rigida* Benth (Chrysobalanaceae).** 2011. 158 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

BONA, A. P. **Estudos fitoquímico, alelopático, tóxico e mutagênico de *Erythrina mulungu* Mart. ex. Benth. utilizando bioensaios.** 2009. 73 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo.** Campinas: Ed. Unicamp, 1994. 116p.

GONZALEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à Bioquímica Clínica Animal.** Porto Alegre: Gráfica de Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. 198 p.

HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMAN Project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutation Research**, v. 659, p. 93-108, 2008.

JAHN, A. I.; GÜNZEL, P. K. H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment. **Reprod Toxicol.**, v. 11, n. 2-3, p. 171-178, 1997.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e Conservação da Caatinga.** 2^o Ed. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2005. 822 p.

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

LUCIO, E. M. R. A. et al. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocráticoda epilsopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Rev Bras Farmacogn**, v. 9, n. 10, p. 23-25, 2000.

MARIZ, S. R. et al. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 3, p. 372-378, 2006.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. M.; METSAVAHT, L. Antiinflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia. **Acta Fisiatrica**, v. 16, n. 4, p. 186-190, 2009.

ORGANISATION 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.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21, n. 1, p. 38-42, 2001.

RIET-CORREA, F. et al. Toxic plants for livestock in Brazil: Economic impact, toxic species, control measures and public health implications. In: PANTER, K. E.; WIERENGA, T. L.; PFISTER, J. A. (Eds). **Poisonous Plants: Global research and solutions**. Wallingford: CAB International, 2007. p. 2-14.

ROSS, C. A.; MARGOLIS, R. L. Neurogenetics: insights into degenerative diseases and approaches to schizophrenia. **Clin. Neurosc. Res.**, v. 5, p. 3-14, 2005.

SÁNCHEZ-LAMAR, A. et al. Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v.115, n.3, p.416-422, 2008.

SILVA, D. M. et al. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Seridó Ocidental e Oriental no Rio Grande do Norte. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 26, n. 4, p. 223-236, 2006.

TORRES, A. L. et al. 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.

WAHNSCHAFFE, U.; BITSCH, A.; KIELHORN, J. Mutagenicity testing with transgenic mice. Part 1: Comparison with the mouse bone marrow micronucleus test. **Carcinogenesis**, v. 4, n. 3, 2005.

ANEXO

1. PARECER DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO



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 bioindicadores

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 animais
CEUA / UFERSA

Emanuelle Fontenele Rabelo
Presidente CEUA

2. EXEMPLAR DO MATERIAL VEGETAL COLETADO IDENTIFICADO PELO HERBÁRIO DARDANO DE ANDRADE-LIMA (UFERSA)

