



BIOENSAIO CITOGÊNÉTICO PARA A CARACTERIZAÇÃO DA MUTAGENICIDADE E CITOTOXICIDADE DA ESPÉCIE *CHOCHLOSPERMUM REGIUM*.

BIOASSAY CYTOGENETIC FOR CHARACTERIZATION OF MUTAGENICITY AND CYTOTOXICITY OF SPECIES *CHOCHLOSPERMUM REGIUM*.

^{1,2}Igor Godinho Portis*; ³Flávia Rodrigues Gomes Figueiredo*; ¹Rafael Veloso Pena; ¹Alex Lucas Hanusch; ³Lidiane Penha de Sousa; Rafael Cosme Machado; ²Cláudio Carlos de Silva; ²Aparecido Divino da Cruz.

Resumo

Introdução: A espécie *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilger é consideravelmente utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças infectoparasitárias e carcinogênicas, porém ainda não se tem conhecimento do risco em utiliza-la, sendo necessário avaliações de mutagenicidade. A espécie vegetal *Allium cepa* tem sido amplamente observada e utilizada para avaliar o potencial de mutagenicidade e citotoxicidade de plantas medicinais e isolados devido sua alta sensibilidade e sua excelente correlação com variados marcadores farmacogenéticos. Com a utilização crescente de plantas medicinais pela população, é de grande importância a avaliação dos efeitos de mutagenicidade e citotoxicidade dessas substâncias para manter a integridade da saúde das pessoas. Objetivo: O objetivo deste trabalho foi de avaliar o potencial mutagênico e citotóxico de diferentes concentrações do extrato de *C. regium*. Metodologia: Para a análise foi utilizado o sistema teste *Allium cepa* (Asparaginales, Alliaceae). Para realização da técnica de *Allium cepa* utilizou-se o protocolo segundo Fieskejo & Grant (1985). Resultados e discussão: O extrato de *C. regium*, nas concentrações utilizadas, exibiu efeito citotóxico paralisando as células em profase e não mostrou efeito mutagênico. Conclusão: Concluindo que a planta *C. regium* utilizada como planta medicinal pela comunidade, apresenta efeito citotóxico, podendo causar efeitos colaterais e maléficos para quem fizer o uso indiscriminado do extrato para o tratamento de alguns tipos de doenças, porém para a confirmação destes efeitos necessita-se de maior investigação.

Palavras- chaves: *Allium cepa*, Mutagenicidade, Citotoxicidade, Alterações cromossômicas.

¹ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, Brasil.

² **Autor correspondente:** Rua Serra Grande Quadra 11 Lote 07, Conjunto Residencial Sonho Verde, Goiânia, Goiás, Brasil. CEP: 74730-570. igorportis@gmail.com

³ Laboratório Replicon, Departamento de Biologia, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia – GO, Brasil.

* Autoria compartilhada

Data do recebimento: 10/02/2016

Data da aprovação: 25/03/2016

Abstract

Introduction: The species *Cochlospermum regium* (Mart & Schr) Pilger is considerably used in folk medicine for the treatment of infectious and parasitic diseases and carcinogenic, but we do not know the risk of using. The plant species *Allium cepa* has been widely observed and used to evaluate the potential for mutagenicity and cytotoxicity of medicinal plants and isolates due to its high sensitivity and excellent correlation with varying pharmacogenetic markers. With the growing use of medicinal plants by the population, it is of great importance to assess the effects of mutagenicity and cytotoxicity of these substances to maintain the integrity of public health. **Objective:** The objective of this study was to evaluate the mutagenic and cytotoxic potential of different concentrations of *C. regium* extract. **Methodology:** For the analysis we used the *Allium cepa* test system (Asparaginales, Alliaceae). To perform the technique *Allium cepa* used the protocol according Fieskejo & Grant (1985). **Results and discussion:** The *C. regium*, extract at the concentrations used, exhibited cytotoxic effect paralyzing the cells in prophase and showed no mutagenic effect. **Conclusion:** In conclusion the plant *C. regium* used as a medicinal plant by the community, has a cytotoxic effect, may cause side effects and harmful to those who make indiscriminate use of the extract for treating some kinds of diseases, but to confirm these effects need If further investigation.

Keywords: *Allium cepa*, Mutagenicity, Cytotoxicity, Chromosomal Abnormalities.

INTRODUÇÃO

Cerrado

O clima do Cerrado é estacional, representado por um período chuvoso, que dura de outubro a março, e seguido por um período seco, de abril a setembro (KLINK & MACHADO, 2005). O bioma brasileiro abriga as principais nascentes das bacias hidrográficas da América do Sul: Araguaia/Tocantins, São Francisco e Bacia do Prata (MYERS *et al.*, 2000).

O cerrado é segundo maior bioma brasileiro, sendo superado em área apenas pela Amazônia. O cerrado brasileiro ocupa cerca de 21% do território nacional e possui uma das mais diversas faunas e floras do mundo (BORLAUG, 2002). A diversidade do bioma Cerrado é relativa aos táxons mais elevados (gênero, família e ordem), o que demonstra a importância do Cerrado para pesquisas como, por exemplo, em plantas medicinais (GUARIM e MORAIS, 2003).

A diversidade vegetal do Cerrado é estimada em 10 mil espécies, entre arbóreas, arbustivas e herbáceas. No cerrado foram encontradas 4.400 espécies endêmicas, pelo menos 6 mil espécies de plantas lenhosas e mais de quinhentas espécies de gramíneas, com elevado grau de endemismo, BRASIL (2004).

As áreas do Cerrado já não possuem mais a cobertura vegetal original, sendo ocupada por paisagens antrópicas (SILVA et al., 2002). Imagens do satélite MODIS do ano de 2002, demonstraram que 55% do Cerrado foi desmatado ou modificado (MACHADO et al., 2004). Há a necessidade de considerar que os recursos naturais oferecidos pelo Cerrado, uma vez extintos, estarão indisponíveis às futuras gerações e que entre estes, pode-se considerar o recurso terapêutico oferecido pelas plantas medicinais. (GUARIM NETO & MORAIS, 2003).

O cerrado, apesar de sua grande importância ecológica, atualmente é um dos que mais sofre com as atividades antrópicas, apresenta cerca de 50% de sua área original convertidas geralmente em pastagens e agricultura, levantando assim uma atenção especial para uma área de extrema importância (SANO et al., 2010).

Plantas Medicinais

A utilização de plantas medicinais na fabricação de medicamentos e também as suas possibilidades terapêuticas é uma prática milenar na medicina tradicional (LOPES et al., 2000; JORGE et al., 2009). A organização mundial da saúde relatou que os medicamentos com plantas tradicionais são incorporados no sistema de saúde de vários países, cerca de 60% da população mundial utiliza plantas com finalidade terapêutica (WHO, 2013).

No Brasil mesmo com a grande quantidade de medicamentos industrializados e incentivo da indústria farmacêutica para a utilização destes medicamentos, grande parte da população utiliza como práticas complementares para cuidar da saúde as plantas medicinais (BADKE, 2011).

No Brasil a diversidade de espécies de plantas é uma fonte potencial de compostos biologicamente ativos, cujos efeitos para a saúde humana ou sobre o material genético são, na grande maioria, desconhecidos (BERHOW et al., 2000). Sabe-se que no Brasil as preparações usuais de plantas medicinais rotineiramente usadas pela população são os chás ou as infusões (LORENZI & MATOS 2002).

Apesar desta utilização de plantas medicinais muitas vezes serem benéficas, é preciso ter o controle para a utilização dessas plantas, pois em diversos estudos foi verificado

que diversas delas podem apresentar substâncias malélicas podendo ser nocivo à saúde (FRESCURA, 2012).

São muitas as espécies de plantas utilizadas com fins medicinais sendo relevante o conhecimento popular dos usos terapêuticos para iniciar uma investigação científica acerca de determinado vegetal (BARBOSA, 2008)

Algo muito importante para a manutenção da saúde é o rastreamento de plantas medicinais para análise de sua mutagenicidade, pois, as plantas que apresentam propriedades mutagênicas requerem precauções quanto ao seu uso. Por outro lado, as plantas com potencial antimutagênico podem ser consideradas interessantes para uso terapêutico (VERSCHA EVE & VAN STADEN, 2008).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta e controla o uso de todos os medicamentos no território nacional. Para o registro de fitoterápicos há a Resolução nº 90/04 ANVISA/MS de 1/2004 (Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica) que serve para comprovação da eficácia e testes de toxidade (ANVISA, 2004).

***Cochlospermum regium* (algodãozinho-do-cerrado)**

O *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilger, é uma espécie medicinal endêmica do Cerrado (INÁCIO, 2010), integrando a família Cochlospermaceae Engler que está distribuída pelas regiões tropicais do mundo, principalmente, das Américas e da África (JOLY, 2002; LIMA, 2002). O *C. regium* é uma planta medicinal frequentemente utilizada pela população como método alternativo para o tratamento de diversas infecções. Apesar de sua frequente utilização, não há registro de normas para a dosagem adequada conforme verificação (ANVISA, 2010).

A espécie *C. regium* é decídua e heliófita, a planta adulta tem porte arbustivo podendo atingir até 2 m de altura (GUARIM NETO & MORAIS, 2003). O período reprodutivo se inicia em abril com a perda das folhas e o aparecimento de botões florais, e no mês de julho ocorre à abertura das flores e o início da frutificação (SALES et al., 2002). O *C. regium* apresenta raiz axial profunda e carnosa, atingindo cerca de 3 m de comprimento e 20 cm de diâmetro podendo apresentar xilopódio. O caule é ferrugíneo e nodoso (SÓLON, 2009).

No Brasil, nas regiões do Cerrado, dados etnofarmacológicos registram o uso medicinal da raiz do *C. regium*, onde é popularmente conhecido como algodão do campo, algodãozinho do cerrado, algodãozinho, algodãozinho-do-campo, algodão-cravo, algodão-do-mato, algodoeiro-do-campo, butuá-do-corvo, pacote e periquiteira-do-campo (GUARIM NETO, 2006).

Foram isolados flavonóides e o ácido graxo 1-hidroxitetradecanona-3 da raiz do *C. regium* (RITTO, 1996). Na região de Cerrado, a diversidade de animais pastadores é grande, dessa forma, as plantas produzem por diferentes rotas metabólicas, uma quantidade maior de metabólitos secundários, tais como alcalóides, terpenóides, flavonóides, entre outros, que exercem importante papel na proteção das mesmas contra o meio em que vivem (SKORUPA & VIEIRA, 2005; IGNANCI et al., 2006).

A análise fitoquímica e farmacológica do extrato das raízes do *C. regium* revelaram flavonóide kaempferol (F-52) que possui propriedades analgésica e antidermatogênica, antibacteriana e antioxidante (LIMA et al., 1995; OLIVEIRA et al., 1996; NUNES & CARVALHO 2003; CASTRO et al., 2004). Com o chá obtido das raízes de *C. regium* podem-se tratar infecções intestinais, uterinas, ovarianas, gastrites, úlceras, artrites e dermatites. Da casca se faz compressas contra abscessos e reumatismos (CASTRO et al., 2004; ANDRADE et al., 2008).

A elevada utilização de componentes essenciais das plantas, como flores, frutos, sementes e raízes, o extrativismo predatório é uma prática que pode provocar o desaparecimento dessas espécies e dos ecossistemas envolvidos (INÁCIO, 2010).

Mutagenicidade

Mutação refere-se a qualquer modificação repentina e hereditária no conjunto gênico de um organismo, que não pode ser justificada pela recombinação da variabilidade genética preexistente, tais modificações abrangem mudanças no número de cromossomos (euploidia, poliploidia e aneuploidia), mudanças grosseiras na estrutura cromossômica (aberrações cromossômicas) e alterações nos genes individuais (ZAHA et al., 2003). Uma única mutação pode não ser suficiente para converter uma célula normal em uma célula tumoral, sendo, necessário à ocorrência de várias alterações para causar neoplasias (ALBERTS et al., 2002).

Com a descoberta de produtos que pudessem diminuir a taxa de mutações, possivelmente poderia diminuir a incidência de câncer e outras doenças degenerativas, e poder-se-ia aumentar a exposição a determinados agentes antimutagênicos efetivos como medida preventiva para o ser humano (HAYATSU et al., 1988). A citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade englobam o estudo de substâncias que podem causar alterações no processo de divisão celular, conseqüentemente causam mutações cromossômicas pelos seus efeitos tóxicos (FREITAS, 2014).

Os estudos de toxicidade e mutagenicidade, são necessários por possibilitarem a compreensão dos efeitos biológicos decorrente do uso de plantas medicinais (FACHINETTO, 2007).

Em um estudo foi descrito que muitos compostos químicos que compõe as plantas utilizadas como medicinais, podem ser mutagênicos e até carcinogênicos, quando ingeridos de forma indiscriminada. Os autores descrevem ainda que erroneamente a cultura popular acredita que fazer o uso exagerado de determinada planta não causa mal algum, pelo simples fato desta ser de origem natural (PERON et al., 2008).

A maioria dos testes realizados para detecção de substâncias mutagênicas baseia-se na demonstração de erros cromossômicos, tais como alterações cromossômicas estruturais, formação de micronúcleos, trocas entre cromátides irmãs, avaliação de genes mutantes ou de danos no DNA, utilizando diferentes organismos testes como bactérias, insetos, plantas e animais, tanto em ensaios realizados *in vitro*, como *in vivo* (PEÑA, 1996).

Modificações no índice de divisão celular e/ou na estrutura do DNA podem prejudicar os processos vitais das células, tais como a duplicação do DNA e a transcrição gênica. Os autores relatam também que elas podem causar mutações gênicas e aberrações cromossômicas, eventos estes que podem levar ao desenvolvimento de processos cancerosos ou morte celular (apoptose) (PERON et al., 2009).

Allium cepa

A espécie *Allium cepa* (Asparaginales, Alliaceae) vem sendo utilizada como organismo-teste desde meados de 1920 (FISKEJO, 1985; RANK & NIELSEN 1993). Os testes realizados com *A. cepa* são confiáveis por permitir biomonitoramentos do potencial de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade (MA et al., 1995). De acordo com Fiskejo (1985), dentre o gênero de *Allium*, a espécie mais indicada como material-teste padrão pela “Royal Swedish Academy of Science” e pelo “Gene-Tox Program” é a *Allium cepa* (Asparaginales, Alliaceae) (GRANT, 1982).

O método de organismos-teste com *A. cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e de biomonitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (MOROSINI, 2008). Muitas plantas são úteis de forma medicinal, porém é necessário realizar avaliações de toxicidade com o índice mitótico, para a verificação do desenvolvimento normal das células do organismo, para isto pode ser utilizado o teste *A. cepa* (TEIXEIRA, 2014).

Durante o desenvolvimento do meristema apical da raiz da *A. cepa* ocorre à divisão mitótica (RAVEN et al., 2001). O índice mitótico e o índice de replicação podem ser usados como indicadores de proliferação adequada das células o que pode ser medido no sistema *A. cepa* (GADANO et al., 2002). Para a avaliação dos efeitos ou danos que os agentes mutagênicos podem causar, faz-se necessário que a amostra esteja em constante divisão mitótica (BIANCHI, 2008).

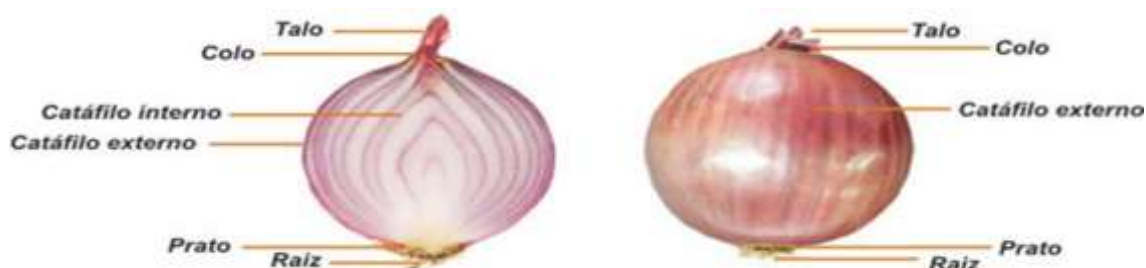
Testes utilizando como organismo teste *Allium cepa* tem apresentado uma alta correlação com outros resultados obtidos em outros sistemas-testes animais como testes realizados em roedores, isso se deve pelo seguinte motivo mesmo os metabolismos sendo diferentes ambos apresentam mesmos eventos respectivos nas fases de divisão celular mitótica Células somáticas (GRANT, 1982).

A confiabilidade do teste *Allium cepa* apresenta probabilidade de 82 % como sendo superior aos resultados mostrados em roedores, portanto considera-se o teste de *Allium cepa* um dos ensaios in vitro mais confiáveis do que testes utilizando camundongos (RANK & NIELSEN, 1993).

Testes com *A. cepa* são adequados devido este organismo teste estar em constante divisão celular e possibilitar a avaliação de diferentes concentrações de planta medicinal podendo observar em parâmetros macroscópicos como turgescência, mudança de cor, formato, textura, espessura, comprimento da raiz e em parâmetros microscópicos como anáfases prematuras, aderências cromossômicas, pontes, fragmentação e perdas cromossômicas, e micronúcleos, que são indicadores de eventuais mutações no conteúdo genético celular (VENTURA, 2004; NASCIMENTO, 2010).

Devido ao frequente uso terapêutico do algodãozinho do Cerrado, para tratamento de diversas infecções, se faz necessário, testes para avaliação de seu potencial mutagênico. O sistema teste *A. cepa* oferece condições adequadas para análise de diferentes concentrações da droga vegetal, verificando possíveis alterações cromossômicas.

Este estudo teve como objetivo de avaliar o potencial mutagênico e citotóxico de diferentes concentrações do extrato aquoso do algodãozinho do Cerrado (*Cochlospermum regium*) utilizando-se o sistema teste *Allium cepa* (Asparaginales, Alliaceae). Segue abaixo a figura demonstrando a morfologia interna e externa do *Allium cepa*.



Demonstração esquemática do organismo teste vegetal *Allium cepa* (autoria própria).

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Pesquisas Replicon da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Tratamentos das raízes de *Cochlospermum regium*

As raízes de *Cochlospermum regium* foram coletadas na região da Serra das Areias em Aparecida de Goiânia-GO, nas seguintes coordenadas S: 16.83479° O: 49.30820° e S: 16.83476° O: 49.30835°. Para o registro foi utilizado um GPS Tracker TV Multilaser (Datum WGS 84). Foram coletadas 11 espécimes de Algodãozinho do Cerrado. Após a coleta das raízes, foram lavadas, retirada a casca e foram pesadas, obtendo-se um total de 25.200kg. Posteriormente, as raízes foram cortadas em pequenos pedaços e colocadas em estufas a 40°C por 96 horas, para desidratação. Ao final do processo de secagem, foi obtido um total de 3kg de raízes. Depois de secas as raízes foram trituradas e armazenadas em recipientes de vidro claro e fechado à temperatura ambiente, armazenados sem contato com a luz.

Definições das concentrações e preparo do decocto

As concentrações analisadas de *C. regium* foram definidas entre o maior e o menor decocto, (50g/L e 1g/L) mencionados no registro da ANVISA (2010), de acordo com fitoterápicos usualmente preparados, definimos então a utilização destas concentrações baseadas em outras plantas registradas. As concentrações definidas foram 50g/L; 37,5g/L; 25g/L; 12,5g/L e 1g/L

Foram utilizadas água deionizada como controle negativo e como controle positivo foram utilizados Paracetamol (por termos o conhecimento prévio de alguns estudos demonstrarem o efeito mutagênico deste) na concentração de 800g/L (STURBELLE et al., 2010).

Técnica de *Allium Cepa*

Para a realização da técnica de *Allium cepa*, foi seguido o protocolo de mutagênese ambiental de acordo com considerações descritas por Fiskejo (1985, p. 112) com eventuais modificações. Foram trabalhados com 5 bulbos por tratamento totalizando 35 bulbos, inicialmente os bulbos tunicados foram descascados e acondicionados em béqueres de 50 mL com água deionizada por um período de 4 dias afim de promover o crescimento radicular. Logo em seguida foi pipetado na água deionizada dos organismos expostos (o extrato de *C. regium* em suas diferentes concentrações), no controle positivo (Paracetamol) 2,0 ml ficando a um período de exposição de 48 horas. Posteriormente as raízes foram retiradas e fixadas em solução fixadora álcool ácido gelada, - 80 °C por cerca de 16 horas. Ocorreu a retiradas das raízes da solução fixadora e colocadas em HCL a 5N por um período de 10 min para a realização da hidrólise ácida, em seguida a região de coifa das raízes foram coradas com o corante fotossensível Orceína acética a 1%, por 10 min, após o tempo de coloração realizou-se uma breve pressão sobre o material com o auxílio de uma lamínula para ocorrer o melhor espalhamento das células.

Quanto a parâmetros macroscópicos foi identificado a coloração das raízes para observar se as raízes apresentaram diferenças na coloração quando comparado controle negativo , positivo e grupos expostos e quanto a parâmetros microscópicos ,foram avaliadas 5000 células por tratamento, dentre estas quais estavam em interfase e quais estavam em divisão sendo monitorados possíveis eventos de quebras e de perdas cromossômicas nas fases de divisão celular mitótica (Clastogenicos e aneugenicos), na questão de citotoxicidade foi observado o comportamento do índice de proliferação celular ou índice Mitótico.

Análises estatísticas

A realização da análise estatística foi realizada no software *Excel 2007* (Microsoft office, EUA) utilizando – se como teste estatístico ANOVA *One Way*, seguido pelo *Post* teste de comparação múltipla entre as médias de Turkey em um nível de 5 % de significância. Abaixo, na figura 2, tem-se as células de *Allium cepa* em vários ciclos, normais e anormais utilizadas na contagem para a verificação de mutagenicidade.

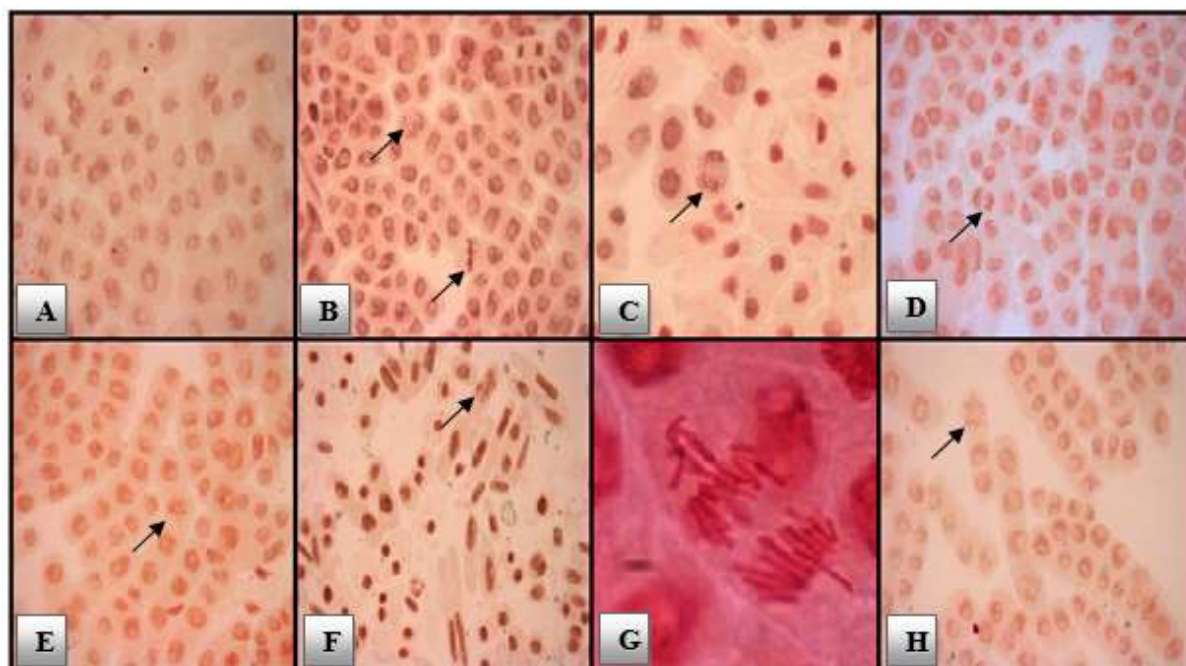


Figura 2. A: Núcleos interfásicos; B: Profase e Metáfase normal; C: Anáfase normal; D: Telófase e Metáfase normais; E: Prófase anormal; F: Metáfase anormal; G: Anáfase anormal; H: Telófase anormal (Autoria própria).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível verificar através dos dados que estão representados na Tabela 1, que entre o grupo controle negativo e as concentrações de 1g/L; 12,5g/L e 25g/L não houve diferença significativa das médias de alterações cromossômicas, no entanto, o controle positivo apresentou maior número de alterações cromossômicas. Quanto às concentrações de 37,5g/L e 50g/L não foram identificadas nenhuma alteração cromossômica, pois, a maioria das células observadas, estava em Prófase e, portanto, estes tratamentos de 37,5g/L e 50g/L não fizeram parte desta análise estatística, visto que, não houve linearidade nos achados de alterações cromossômicas. Diante do exposto acima fica então sugerido que para as concentrações analisadas não foi constatado potencial mutagênico.

Tabela 1. Análise estatística de alterações cromossômicas, referentes a metáfases e anáfases anormais de *C. regium*.

Tratamento	Média	Tukey	Desvio Padrão
1 g/L	0,174	B	0,014
12,5 g/L	0,171	B	0,033
25 g/L	0,108	B	0,037
CP	0,954	A	0,135
CN	0,204	B	0,017

Legenda: CP: controle Positivo; CN: controle negativo e as concentrações de *C. regium* 1g/L; 12,5g/L, 25g/L.

Um trabalho realizado com o teste de Ames com *Salmonella typhimurium*, utilizando o extrato de *C. regium*, o autor mediu a mutagênese bacteriana pelo número de células revertentes para a prototrofia de Histidina e os resultados mostraram que o extrato liofilizado da raiz nas concentrações de 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0gm/L, não exibiu atividade mutagênica (LIMA, 2002).

Foi relatado que embora outras pesquisas tenham indicado a antimutagenicidade de alguns compostos de *C. regium*, como taninos, flavonoides, o estudo realizado a partir do Teste de Micronúcleo em medula óssea de camundongos, com extrato liofilizado da raiz de *C. regium*, não apresentou modificação do DNA celular, portanto, não exibiu efeito antimutagênico (ANDRADE et al., 2008).

Observando a Tabela 2 pode-se verificar que o teste estatístico apresentou diferença entre os tratamentos analisados. Em análise ao ciclo celular (Figura 3), é possível constatar que o número de Prófase ocorre em maior quantidade do que as demais fases da mitose conforme aumentam as concentrações de *C. regium*, em comparação ao controle negativo. Desta forma, os resultados da análise dos extratos estudados indicam efeito citotóxico e também a influência na formação de proteínas relacionadas com o fuso mitótico sendo possível que ao aumentar a concentração de *C. regium* acima de 50g/L ocorra apoptose.

Tabela 2. Ciclo celular do teste de avaliação mutagênica de *C. regium*.

Divisão Celular	1g/L	12,5g/L	25g/L	37,5g/L	50g/L
Prófase	840	2538	5085	6075	6780
Metáfase	615	348	69	42	32
Anáfase	387	381	66	15	6
Telófase	453	261	9	6	6

Legenda: Concentrações de *Chochlopermun regium* em unidade de concentração gramas /L: 1g/L; 12,5g/L, 25g/L, 37,5 g/L e 50g/L.

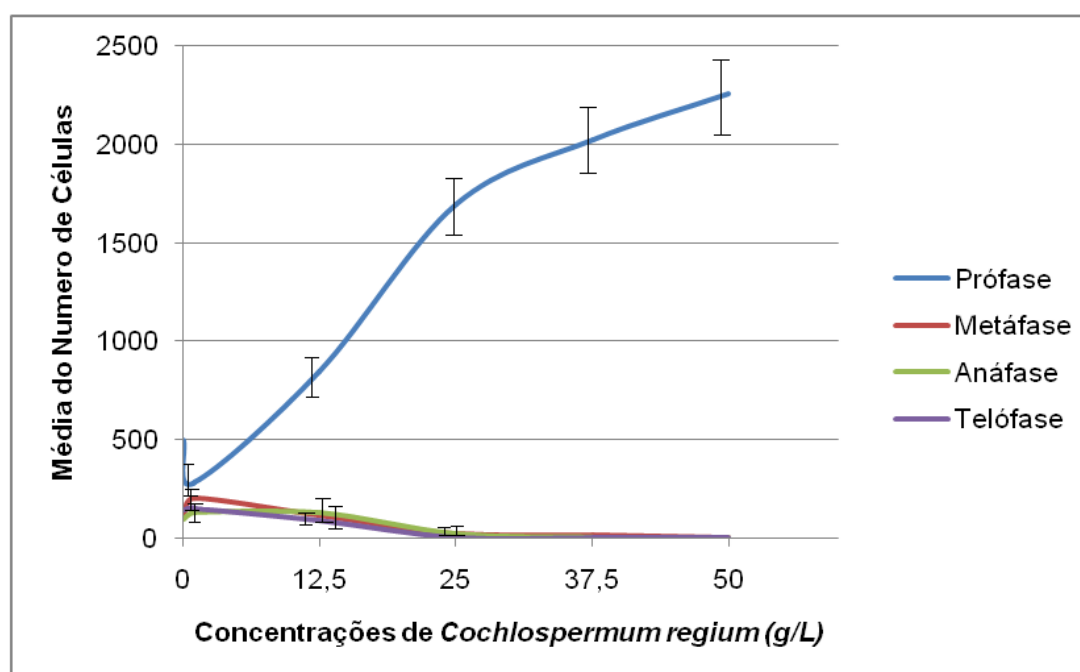


Figura 3. Ciclo celular de *C. regium* indicando aumento no número de Prófase. Média do número total de células.

Foi realizado um estudo demonstrando que o extrato da raiz de *C. regium* liofilizado apresentou atividade mutagênica e citotóxica em eritrócitos da medula óssea de camundongos. Tal resultado é devido à presença de compostos como flavonóides e taninos (CASTRO et al., 2004). Em avaliação a outra planta medicinal, *Thuja occidentalis* foi realizado um teste utilizando o mesmo bioindicador; *A. cepa* onde o resultado foi semelhante ao encontrado neste trabalho, o autor procedeu com a análise de três concentrações distintas da solução de Tuia (*Thuja occidentalis*), onde identificou que o número de células no estágio de Prófase também ocorreu um maior número de células no estágio de Prófase de acordo com

o aumento das concentrações da infusão do preparado desta planta e relatou o efeito como citotóxico (JORGE et al., 2009).

Em uma avaliação de citotoxicidade do extrato de *Aristolochia elegans*, utilizando o sistema de *A. cepa*, notou-se uma maior presença de prófase em relação as outras fases do ciclo celular, assim como em nosso estudo, também foi observado no estudo de *A. elegans* uma redução no índice mitótico e no crescimento radicular da cebola com o aumento da concentração do extrato (de PAULA et al., 2015). Em outro estudo que avaliou o efeito dos extratos de *A. elegans* na divisão celular, foi observado que ocorreu um aumento considerável de prófase em todas as concentrações do extrato em células de *Allium cepa* (MENDES et al., 2012).

Dados sobre a análise estatística do Índice Mitótico descrito na Figura 4 demonstraram que, entre todas as concentrações dos grupos controle e grupo exposto, a que apresentou maior número na média do Índice Mitótico foi à concentração de 50g/L seguida pelas concentrações de 37,5g/L; 25g/L; 12,5g/L em seguida vieram o controle positivo e o controle negativo e a concentração de 1g/L, este resultado indica que ao ser observado um maior número de células em estágio de Prófase sugere-se a inibição das próximas fases da mitose estando relacionado ao aumento da concentração de *C. regium*.

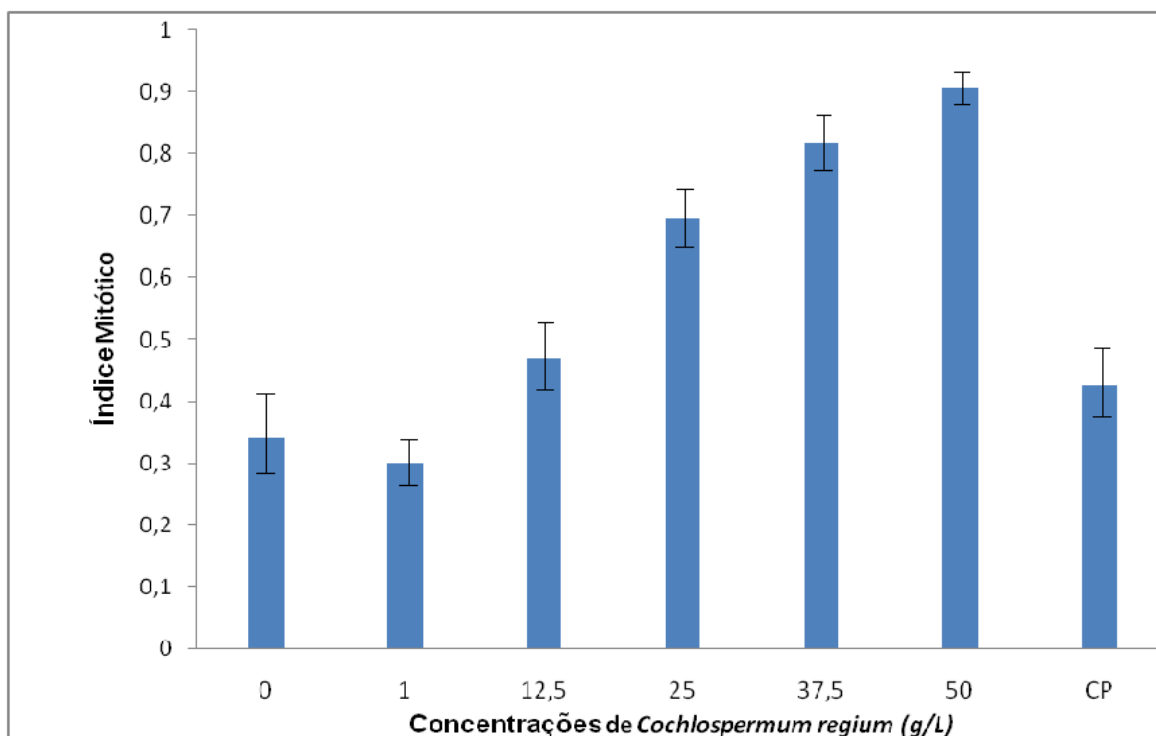


Figura 4. Análise estatística de Índice Mitótico em *Allium cepa*.

Em verificação aos resultados observados na Figura 5 houve correlação entre os dados, onde o controle negativo e a concentração de 1g/L obtiveram resultados semelhantes, e que houve aumento linear no Índice Mitótico.

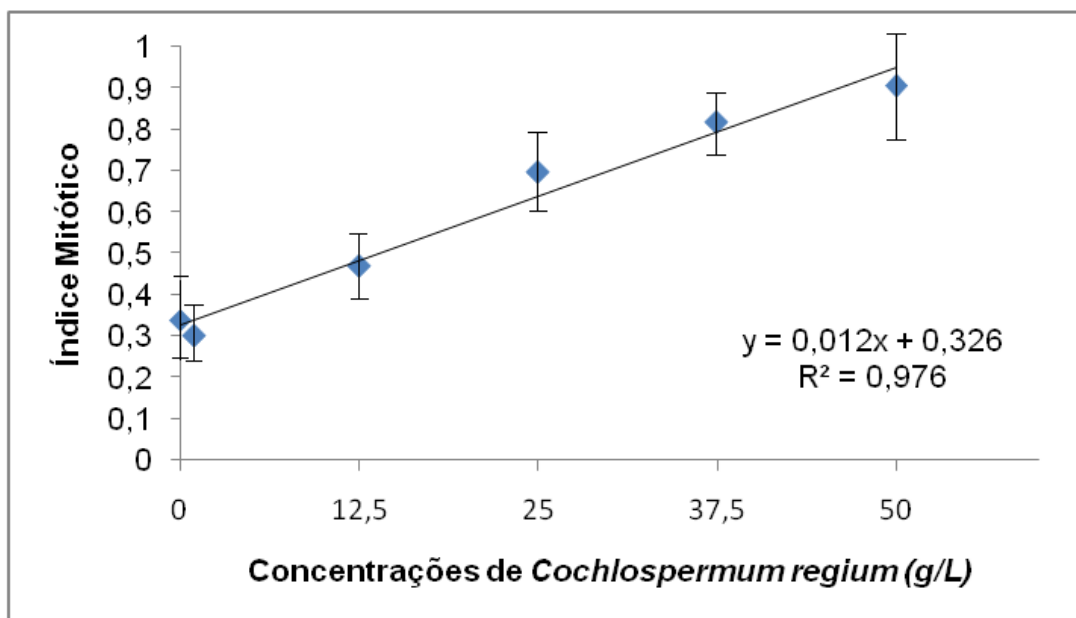


Figura 5. Análise estatística de correlação no Índice mitótico das concentrações de decocto *C. regium* em g/L.

Foi realizado bioensaios em três diferentes espécies de boldos que foram conduzidos em germinador a 25°C, com extrato aquoso obtido por infusão de folhas frescas na concentração de 30g/L e água destilada como controle. Os extratos testados neste experimento produziram efeito sobre o processo de divisão celular da *A. cepa*, mas não foram detectados efeitos citotóxico ou genotóxico e sim um aumento no índice de divisão celular significativo, no entanto neste trabalho não houve aumento no índice de divisão celular, e sim um efeito citotóxico que provocou a inibição das próximas fases da mitose, prolongando e evidenciando o período em Prófase, ao aumentar a concentração de *C. regium* (IGNANCI et al., 2006).

Em uma avaliação sobre o possível efeito citotóxico de *Rosmarinus officinalis*, o alecrim, sobre as células de *A. cepa*, observaram que houve um decréscimo no índice mitótico no decorrer dos tempos de 24 e 48 horas (CARDOSO et al., 2014). Em outro estudo de citotoxicidade, *Stachys byzantina*, que possui efeitos antibacterianos, quando realizado avaliações de seu extrato no sistema teste *A. cepa* verificou que o índice mitótico do tratado esteve abaixo do controle, mesmo depois de tentarem realizar uma recuperação (LOUVATEL et al., 2014)

CONCLUSÕES

Pelas análises realizadas da planta medicinal *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilger utilizando o sistema teste vegetal *Allium - cepa* (Asparaginales, Alliaceae), foi observado que o grupo exposto apresentou um *pool* maior no número de células presentes no estágio de Prófase, ao aumentar a concentração do extrato aquoso de *Cochlospermum regium* apresentando, um efeito concentração dependente, o extrato inibiu as demais fases da divisão celular mitótica que demonstrando um comportamento citotóxico e citostático. Não houve alterações cromossômicas significativas quando comparadas ao grupo controle. Portanto conclui-se que mediante as concentrações de *Chochlospermum regium* estudadas não demonstraram potencial mutagênico, porém fazem-se necessário a realização de novos estudos mutagênicos e testes citotóxicos para permitir uma boa correlação com os demais sistemas testes humanos e animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Science. p. 1663. 2002.

ANDRADE, L. S; SANTOS, D. B; CASTRO, D. B; GUILLO, L. A; CHEN-CHEN, L. Absence of antimutagenicity of *Cochlospermum regium* (Mart.And Schr.) Pilger 1924 by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal Biology**, v. 68 n. 1, p. 155-159. 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48, de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de normas da Coordenação de Fitoterápicos, Dinamizados e Notificados (COFID). 2010. Versão III.

BADKE, M. R.; BUDÓ, M. L. D.; SILVA, F. M.; RESSEL, L. B. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**. Rio de Janeiro, v.15 n.1. 2011.

BARBOSA, B. D. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardiumhumile* St. Hill. (Anacardiaceae).** 2008. 134 f. Dissertação de mestrado. Pós Graduação em Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia, MG.

BERHOW, M., WAGNER, E., VAUGHN, S., PLEWA, M. 2000. Characterization and antimutagenic activity of soybean saponins. **Mutation Research**, v. 448, p. 11-22. 2000.

BIANCHI, J. Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida malation, utilizando o sistema teste de *Allium cepa* em células de mamíferos. 2008. 165 F. Dissertação de mestrado. Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular. Universidade Estadual Paulista de Rio Claro, SP.

BORLAUG, N. E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: R. Bailey (ed). **Global warming and other eco-myths.** Competitive Enterprise Institute, Roseville, EUA. p. 29-60. 2002.

BRASIL. 2004. Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e florestas. **Núcleos dos biomas Cerrados e Pantanal. Programa Nacional de Conservação e Uso sustentável do Bioma Cerrado – Programa Cerrado Sustentável.** Brasília, DF.

CARDOSO, G. H. S.; DANTAS, E. B. S.; SOUSA, F. R. C.; PERON, A. P. Cytotoxicity of aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis* L.(Labiatae) in plant test system. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 4, p. 886-889, 2014.

CASTRO, D. B., SANTOS, D. B., FERREIRA, H. D. SANTOS, S. C., CHEN-CHEN, L. Atividades mutagênica e citotóxica do extrato do *Cochlospermum regium* (Mart. et Schr) Pilger (algodãozinho-do-campo) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6 n. 3, p. 15- 19. 2004.

De PAULA, R. P; BUENO, S. S. S; SCHMITT, K. F. M; TIAGO, A. V; ROSSI, A. A. B. Sistema Teste de *Allium cepa* como bioindicador de citotoxicidade e genotoxicidade em *Aristolochia elegans* Mast. **Enciclopédia biosfera, Centro conhecer.** V 11, n 21, p. 1749. 2015.

FACHINETTO, J. M., BAGATINI, M. D., DURIGON, J., DA SILVA, A. C. F., TEDESCO, S. B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 49-54. 2007.

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

FREITAS, V.S. Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 29, n. 2, p. 189, 2014.

FRESCURA, V. D. S. **Avaliação do potencial antiproliferativo, genotóxico e antimutagênico das espécies *Psychotria brachypoda* (Müll. Arg.) Britton e *Psychotria birotula* Smith & Downs (Rubiaceae)**. 2012. 74f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS.

GADANO, A.; GURNI, A.; LÓPEZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacol** v. 81, p. 11-16. 2002.

GRANT, W. 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U. S. Environmental Protection Agency – Genotoxic Program. **Mutation Research**, v. 281, p. 89-92. 1982.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos Medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: Um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasileira**, v. 17 n. 4, p. 561-584. 2003.

GUARIM NETO, G. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. **Revista eletrônica do mestrado em educação ambiental** 17, p. 71-89. 2006.

HAYATSU, H.; ARIMOTO, S.; NEGISHI, T. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 202, p. 429-446. 1988.

IGANCI, J. R. V.; BOBROWSKI, V. L.; HEIDEN, G.; STEIN, V. C.; ROCHA, B. H. G. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivo Insituto Biologico**, v. 73, n. 1, p. 79-82. 2006.

INÁCIO, C. M. **Estudo Agrônômico, Químico e Biológico de *Cochlospermum regium* (MART. EX. SCHARANK): uma planta medicinal do cerrado**. 2010. 132 f. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Agronomia (Horticultura) UNESP – Câmpus de Botucatu.

JOLY A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo, Editora Nacional. 2002.

JORGE, V. R; PRANDINI, E. V; KARSBURG, I. V. Citotoxicidade de *Allium cepa* em diferentes concentrações de Tuia (*Thuja Occidentalis*) Universidade do Estado de Mato Grosso. In: 2ª JORNADA CIENTÍFICA DA UNIVERDIDADE ESTADUAL DO ESTADO DE MATO GROSSO. Barra do Bugres, MT. 05 e 06 de outubro. 2009.

KLINK, C. A & MACHADO, R. B. A conservação do cerrado brasileiro. **Revista Megadiversidade**, v. 1 n. 1, p. 148. 2005.

LIMA, D. P. de; CASTRO, M. S. A. de; MELLO, J. C. P. de; SIQUEIRA, J. M. de; KASSAB, N. M. A. Flavanone glycoside from *Cochlospermum regium*. *Fitoterapia* 56 (6) p. 545-546. 1995.

LIMA, L. L. **Detecção da atividade mutagênica e antimutagênica do *Cochlospermum regium* (algodãozinho do campo) pelo teste Ames**. 2002. 122 f. Dissertação de Mestrado. Curso de Biologia, Universidade Salgado de Oliveira, Goiânia.

LOPES, L. C.; ALBANO, F.; LARANJA, G. A. T.; ALVES, L. M., SILVA, L. F. M.; SOUZA, G. P.; ARAÚJO, I. M.; NETO, J. M. N.; FELZENSZWALB, I.; KOVARY, K. Toxicological evaluation by in vitro and in vivo assays of anaqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. **Toxicology letters**, v. 116, p. 189-198. 2000.

LORENZI, H., F. J. MATOS. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. **Instituto Plantarum**. Nova Odessa, p. 512. 2002.

LOUVATEL, K.; ARENHART, A. R.; ZAIONS, M. I.M. Avaliação da Citotoxicidade e Genotoxicidade dos Extratos de *Stachys byzantina* C. Koch. (Pulmonária) e *Tropaeolum majus* L. (Capuchinha), Utilizando O Sistema Teste *Allium cepa*. **Unoesc & Ciência-ACBS**, v. 5, p. 23-28, 2014.

MA, T. H.; XU, Z., XU, C.; MCCONELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, H.; ZHANG, H. An improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 335, p. 185-195. 1995.

MACHADO, R. B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P.; CALDAS, E.; GONÇALVES, D.; SANTOS, N.; TABOR, K.; STEININGER, M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. **Conservation International do Brasil**. Brasília, DF, p. 15. 2004.

MENDES, S. S.; ANDRADE, J. A.; XAVIER, M. A.; SECUNDO JUNIOR, J. A.; PANTALEÃO, S. M.; ESTEVAM, C. S.; FERRARI, S. F. Genotoxicity test of *Maytenus rigida* and *Aristolochia birostris* in the radicular meristem of the onion, *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 76-81. 2012.

MOROSINI, R. R. In: ANAIS: 3ª JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNEMAT Avaliação citotóxica de extratos aquosos de *Tabebuia avellanae* Lorentz exGriseb (Ipê-rosa). Universidade do Estado de Mato Grosso. Cáceres, MT, Brasil, 20-24 setembro. 2008.

MYERS, N., R. A. MITTERMEIER., C. G. MITTERMEIER., G. A. B. FONSECA., J. KENT. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403, p. 853-858. 2000.

NASCIMENTO, R. H. In: ANAIS, 3ª JORNADA CIENTÍFICA DA UNEMAT Avaliação do efeito genotóxico e índice de infusões da casca de ipê-amarelo (*Tabebuia vellosi*) pelo sistema *Allium* test. Universidade do Estado de Mato Grosso. Cáceres, MT, Brasil, 20-24 setembro. 2010.

NUNES, W. B.; CARVALHO, S. Evaluation of the mutagenic potential of *Cochlospermum regium*. In: *Drosophila melanogaster* male germ cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 545-549. 2003.

OLIVEIRA, C. C.; SIQUEIRA, J. M.; SOUZA, K. C. B.; RESENDE, U. M. Antibacterial activity of rhizomes from *Cochlospermum regium*: preliminary results. **Fitoterapia**, v. 67, n. 2, p. 176-177. 1996.

PEÑA, L. F. M. **Uso do teste de micronúcleo em eritrócitos circulantes de peixes para monitorização de um local do rio Tibagi e avaliação da genotoxicidade de agrotóxicos em bioensaios**. 1996. 125 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

PERON, P. A.; FELIPES, J.; MATTGE, G. I.; CANTAGALLI, L. B.; MARIUCCI, R. G.; VICENTINI, V. E. P. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* (Less). *E Solanum longena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 6, n. 2, p. 127-130. 2008.

PERON, P. A.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 2, p. 155-159. 2009.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v. 118, p. 49-50. 1993.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 742. 2001.

RITTO, J. L. A. **Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluído de algodãozinho-do-campo, *Cochlospermum regium* (Mart et Schr.) Pilger**. 1996. 130 f. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

SALES, D. M.; COELHO, M. F. B.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; FERRONATO, A. Superação da dormência por ácido sulfúrico em sementes de algodão do campo [*Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilg.] – Cochlospermaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n. 2, p. 65-71. 2002.

SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L. S.; FERREIRA J. R., L. G. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 166, p. 113-124, 2010.

SKORUPA, L. A.; VIEIRA, R. F. Coleta de germoplasma de plantas medicinais. In: WALTER, B. T., CAVALCANTI, T. B. (org.). Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal. Brasília: Embrapa recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 435-468. 2005.

SILVA, L. O.; COSTA, D. A.; FILHO, K. E. S.; FERREIRA, H. D.; BRANDÃO, D. Levantamento florístico efeito sociológico de duas áreas de cerrados em *sensu strictus* no parque estadual da Serra de Caldas Novas, Goiás. **Acta Botânica Brasílica**, v. 16, n. 1, p. 43-53. 2002.

SÓLON, S. **Análise fitoquímica e farmacognóstica da raiz de *Cochlospermum regium* (Mart. EtSchr.) Pilger, Cochlospermaceae**. Tese de doutorado. 2009. 178 f. Universidade de Mato Grosso. Campo Grande, MS.

STURBELLE, R. T.; PINHO, D. S.; RESTANI, R. G.; OLIVEIRA, G. R.; GARCIAS, G. L.; MARTINO-ROTH, M. G. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 409-415. 2008.

TEIXEIRA, S.A; DE MELO, J.I.M. Plantas medicinais utilizadas no município de Jupi, Pernambuco, Brasil. **Iheringia Série Botânica**, v. 61, n. 1, 2, 2014.

VENTURA, D. C. B. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-teste**. 2004. 133 f. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Rio Claro. Estado de São Paulo, SP.

VERSCHAEVE, L.; VAN STADEN, J. Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 575–587. 2008.

WHO. World Health Organization General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. 2013.

ZAHA, A.; SCHRANK, A.; LORETO, S. L. E.; FERREIRA, B. H.; SCHRANK, S. I.; RODRIGUES, S. J. J.; REGNER, P. L.; PASSAGLIA, P. M. L.; ROSSETTI, R. L. M.; VAINSTEIN, H. M.; SILVA, C. S.; GAIESKY, V. S. L. V. Mutação e mecanismo de reparo de DNA, p.149 a 157. **In ZAHA, A., FERREIRA, B. H., PASSAGLIA, P. M. L. *Biologia Molecular básica***. Mercado aberto. Porto Alegre, RS. 2003.