



ARTIGO

## Potencial mutagênico do extrato aquoso de *Allium cepa* L. em células hematopoiéticas de ratos Wistar

Daniela Granella Gomes Guidoti<sup>1\*</sup>, David Teixeira Guidoti<sup>1</sup>, Alessandra Paim Berti<sup>1</sup>, Elisângela Düsman<sup>1</sup> e Veronica Elisa Pimenta Vicentini<sup>2</sup>

Recebido: 6 de março de 2013      Recebido após revisão: 25 de novembro de 2013      Aceito: 3 de março de 2014  
Available online at <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2546>

**RESUMO:** (Potencial mutagênico do extrato aquoso de *Allium cepa* L. em células hematopoiéticas de ratos Wistar). As plantas são amplamente utilizadas pela população para diversas finalidades, seja na alimentação, culinária ou com fins medicinais. Portanto, se faz necessário a realização de testes a fim de esclarecer à população os seus efeitos benéficos ou colaterais, que podem ter ação mutagênica e/ou carcinogênica. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial mutagênico do extrato aquoso de *Allium cepa*, popularmente conhecida como cebola. Para análise dos efeitos mutagênicos, foi utilizado como sistema teste a medula óssea de ratos Wistar, *Rattus norvegicus*, tratados *in vivo* via gavagem, por tratamento agudo (24 horas) com 0,5 mL da solução teste. Os animais foram divididos em dois grupos, constituídos de três machos e três fêmeas em cada grupo, recebendo o seguinte tratamento: água (controle negativo); ciclofosfamida (controle positivo) e duas concentrações do extrato aquoso de *Allium cepa*. Foram analisadas 100 metáfases/animal, totalizando 600 metáfases/grupo e o cálculo do índice mitótico feito de 5.000 células/sexo, totalizando 10.000 células/grupo. Os resultados obtidos foram comparados entre si e com os dos controles, pelo teste do qui-quadrado. Observou-se que não houve alteração significativa nos índices de divisão celular, bem como, no número de alterações cromossômicas em nenhum dos tratamentos utilizados. Portanto, neste tipo, tempo de tratamento e concentrações testadas, o extrato aquoso de *Allium cepa* não mostrou efeito citotóxico e nem clastogênico no sistema teste empregado.

**Palavras-chave:** cebola, plantas medicinais, citotoxicidade, clastogenicidade, mutagenicidade.

**ABSTRACT:** (Mutagenic potential of aqueous extract of *Allium cepa* L. on hematopoietic cells of Wistar rats). Plants are widely used by the population for several situations, whether in food, culinary or medicinal purposes. Therefore, the achievement of tests is necessary to clarify to the population their beneficial or side effects, which may have mutagenic and/or carcinogenic action. Thereby, the aim of this present research was to evaluate the mutagenic potential of *Allium cepa* aqueous extract, popularly known as onion. For analysis of the mutagenic effects, the bone marrow of Wistar rats, *Rattus norvegicus*, was used as a test system, being treated *in vivo* by way of gavage, through acute treatment (24 hours) with 0.5 mL of the test solution. The animals were divided into two groups consisting of three males and three females in each group, receiving the following treatment: water (negative control), cyclophosphamide (positive control) and two concentrations of *Allium cepa* aqueous extract. A hundred metaphases/animal was analyzed, totaling 600 metaphases/group and the calculation of mitotic index was made from 5.000 cells/sex, totaling 10.000 cells/group. The obtained results were compared within them and with the control ones through the chi-square test. It was observed that there was no significant change in the cell division rates, as well as in the number of chromosomal alterations in any of the treatments used. Therefore, on this type, treatment time and tested concentrations, *Allium cepa* aqueous extract did not demonstrate neither cytotoxic nor clastogenic effect on the test system employed.

**Key words:** onion, medicinal plants, cytotoxicity, clastogenicity, mutagenicity.

### INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm demonstrado a presença, nas plantas, de muitas substâncias com atividades antimutagênicas e anticarcinogênicas, além de outras propriedades benéficas à saúde (Zeiger 2001). No entanto, sabe-se que muitas plantas apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas (Turolla & Nascimento 2006), como por exemplo, a potencialização da taxa de mutações no material genético, que ocorre normalmente no organismo em níveis basais, desencadeada por mutágenos químicos, físicos ou biológicos, incluindo os “produtos naturais” (Lutz & Kopp 1999, Landi *et al.* 1999).

*Allium* L. inclui várias espécies de importância econômica e medicinal. A ação terapêutica atribuída às

plantas pertencentes a este gênero se deve à presença de compostos orgânicos sulfurados, abundantes nos tecidos desses vegetais. São plantas ricas em antocianinas, que conferem a coloração avermelhada ou roxa aos bulbos, ou quercetinas e seus derivados, que conferem a coloração amarelada ou cor de pinhão aos bulbos. As antocianinas, pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos, são de grande interesse por suas propriedades anticarcinogênicas (Costa & Resende 2007), já as quercetinas, pertencentes ao grupo dos flavonóides, apresentam propriedades antioxidantes e também auxiliam no tratamento do câncer (Bravo 1998).

Os antioxidantes protegem as células contra os efeitos nocivos produzidos pelos radicais livres (Sies 1993) e estão associados com a redução do risco de câncer e

1. Doutorando do Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá. Avenida Colombo n° 5790, Jardim Universitário, Bloco H67, Sala 15, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

2. Docente do Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, PR, Brasil.

\* Autor para contato. E-mail: [danielaguidoti@live.com](mailto:danielaguidoti@live.com)

doenças cardiovasculares. *A. cepa* tem demonstrado, além da propriedade antioxidante (Stajner & Varga 2003), propriedades antimicrobianas (Benkeblia 2004), e anticâncer (Fukushima *et al.* 1997).

De acordo com estudos epidemiológicos, o consumo de plantas desse gênero pode reduzir o risco de câncer em locais específicos, como por exemplo, câncer de estômago (Haenszel *et al.* 1972, Buiatti *et al.* 1989, Boeing *et al.* 1991), câncer de cólon (Graham *et al.* 1988, Steinmetz & Potter 1993) e câncer de mama (Levi *et al.* 1993, Charlier *et al.* 1998). Seus princípios ativos são vitaminas A, B1, B2, B5, C, sais minerais (potássio, fósforo, cálcio, sódio, silício, magnésio, ferro), glicoquinina e flavonoides (Balbach 1973).

Os testes em toxicidade genética são utilizados, rotineiramente, para uma avaliação do espectro toxicológico de substâncias e medicamentos (Junqueira 2006). Entre os métodos empregados na detecção de alterações cromossômicas inclui-se a avaliação de aberrações cromossômicas, que possibilita a identificação de quase todas as alterações na estrutura do cromossomo metafásico (Silva *et al.* 2003).

A contagem de aberrações cromossômicas é realizada pela medida direta das lesões, o que oferece uma avaliação precisa da atividade clastogênica. O tipo de aberração produzida depende do agente genotóxico, da fase do ciclo celular e do tempo de tratamento (Darroud 1990).

A medula óssea de mamíferos constitui uma ferramenta excelente em estudos de alterações cromossômicas, em razão de possuírem um ciclo de divisão que se completa entre vinte e duas e vinte e quatro horas (Rabello-Gay *et al.* 1991).

A compreensão dos mecanismos de ação dos agentes mutagênicos e suas consequências para os seres vivos é fundamental, assim como o entendimento da forma como as células conseguem modular esses processos, podendo diminuir ou aumentar os danos genéticos (Ribeiro & Marques 2003).

Considerando o potencial terapêutico descrito para *Allium cepa* L. e a ausência de estudos que avaliem a possível ação tóxica dessa planta, largamente utilizada pela população, o presente trabalho teve por objetivo verificar, por meio de análise citogenética, os efeitos tóxico, em nível celular, e clastogênico, em nível cromossômico, do extrato aquoso dessa planta, utilizando como sistema teste células de medula óssea de ratos Wistar, *Rattus norvegicus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparo da solução teste: extrato aquoso de *Allium cepa*

Foram selecionados bulbos de *Allium cepa* provenientes da cidade de Monte Alto/SP, que não apresentavam nenhuma lesão aparente ou indicio de apodrecimento. Os mesmos foram lavados, macerados e posteriormente diluídos em água.

Para o cálculo das concentrações levou-se em consi-

deração o peso corpóreo (p.c.) de um homem de 70 Kg e um rato de 100 g p.c. A concentração recomendada de *A. cepa* para consumo diário pelo homem é de 50 g/1000 mL de água (Costa & Resende 2007).

A administração nos ratos foi de forma aguda (única), sendo adotada a concentração equivalente a uma xícara de 160 ml para uso do homem, correspondendo aos valores de 8 g e 48 g, extrapolando para os ratos foi de 0,025 g/0,5 mL e 0,150 g/0,5 mL, respectivamente.

### Tratamento

Os ratos Wistar, *Rattus norvegicus*, com aproximadamente 100 g p.c. com cerca de 35 dias foram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, UEM/PR.

Para cada tratamento, foram utilizados seis animais, sendo três machos e três fêmeas para cada grupo controle e tratamento. Foram administrados, via gavagem, 0,5mL da solução de cada concentração, por vinte e quatro horas, caracterizando um tratamento agudo.

Para comparação e validação dos resultados, foram utilizados dois controles. Para o controle negativo, foi administrado aos animais somente água (1 mL/100 g p.c.), via gavagem. No controle positivo, foi utilizado o agente clastogênico ciclofosfamida (1,5 mg/1 mL de água/100 g p.c.), via intraperitoneal (i.p.), por vinte e quatro horas.

Os ratos ficaram em caixas separadas (por grupo), sendo que a água e a ração foram trocadas diariamente e administradas *ad libitum*. Uma hora e meia antes do sacrifício foi injetado nos ratos 0,5 mL/100g p.c. de colchicina na concentração de 0,16%.

### Preparação citológica

A técnica utilizada para a obtenção das células da medula óssea de ratos foi baseada na técnica de Ford & Hamerton (1956).

Após o tempo de tratamento e aplicação da colchicina, os animais foram sacrificados. Em seguida, foram retirados os fêmures e suas epífises proximais cortadas.

A medula óssea foi retirada introduzindo no canal medular uma agulha com seringa contendo 5 mL de solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) 0,075M a 37°C. A suspensão foi deixada em estufa durante 12 minutos a 37°C.

Passado esse tempo, o material foi centrifugado por 5 min a 800 rpm e o sobrenadante foi descartado. Para a fixação do material foi adicionado ao tubo 5 mL de fixador na proporção 3:1 metanol/ácido acético.

Em seguida, a amostra foi submetida à centrifugação por 5 min a 800 rpm e após esse tempo, ressuspensa em 5 mL de fixador, e centrifugada novamente sob as mesmas condições.

No preparo das lâminas, o método utilizado foi o de espalhamento, pingando algumas gotas da suspensão em lâminas limpas e geladas, contendo um filme de água destilada, mantidas inclinadas com a finalidade de

promover o espalhamento do material e rapidamente flambadas para fixação.

A coloração das lâminas foi feita com solução de Giemsa diluído em tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,06M e pH 6,8 na proporção de 1:30. Após o período de 12 min, as lâminas foram lavadas em água corrente e colocadas para secagem ao ar.

#### Análise das lâminas

Foi calculado o Índice Mitótico (IM) de 5.000 células por sexo, totalizando 10.000 células por grupo da seguinte forma:  $\text{IM} (\%) = (\text{n}^\circ \text{ de células em divisão} / \text{Total de células presentes nos campos}) \times 100$ .

Foram analisadas 100 metáfases por animal (fêmeas e machos), contabilizando 300 metáfases por sexo (três machos e três fêmeas), totalizando 600 metáfases por grupo.

Foram preparadas 5 lâminas/animal e a análise das mesmas realizada em microscópio óptico, com aumento final de 1000 vezes. Foi avaliado também, o aparecimento de alterações como: *gap*, quebra cromatídica (ct), quebra cromossômica (cr), fragmento acêntrico, *minute* e *double minute*.

O cálculo estatístico utilizado foi o teste do qui-quadrado ( $\alpha = 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas constituem uma rica fonte de compostos bioativos que podem interagir com o nosso organismo, atuando de forma benéfica, preventiva ou curativa, mas também podendo desencadear uma resposta toxicológica.

Após os tratamentos com as duas concentrações do extrato aquoso de *A. cepa*, foi verificado que não houve ação citotóxica nesse sistema teste. As concentrações testadas também não causaram efeito clastogênico nesse tipo, tempo e forma de tratamento, como mostra a tabela 1.

Durante uma pesquisa detalhada sobre suplementos dietéticos que poderiam conter metais pesados com efeitos clastogênicos, foi testado o extrato de *Allium sativum* que mostrou-se eficaz em reduzir drasticamente os efeitos clastogênicos causados pela exposição crônica ao arsênio, em ratos (Roychoudhury *et al.* 1993).

O extrato bruto de *A. sativum*, quando administrado na ração alimentar diária, durante períodos prolongados a ratos, modifica o efeito citotóxico do arsenito de sódio (agente clastogênico). Roychoudhury *et al.* (1996) realizaram ensaios com o extrato bruto de *A. sativum*, a fim

de verificar se o efeito protetor seria transferido para a próxima geração. Ao final dos experimentos, constatou-se que na progênie, os efeitos clastogênicos causados pelo arsenito de sódio persistiu, porém, em menor grau.

As plantas *Allium* constituem uma parte importante da dieta de muitos povos que acreditam em suas propriedades preventivas contra o câncer. O extrato aquoso de *Allium ascalonicum* foi avaliado *in vitro* em diferentes linhagens celulares tumorais. Os resultados evidenciaram que houve acentuada atividade antiproliferativa contra as linhagens Jurkat e K562. O extrato também mostrou baixa citotoxicidade contra as células normais (HUVEC) e significativa atividade anti-inflamatória (Mohammadi-Motlagh *et al.* 2011).

O uso terapêutico de plantas exige o conhecimento dos compostos ou substâncias que as constituem e de suas respectivas atividades no organismo. Considerando a elevada atividade biológica de espécies de *Allium*, Simin *et al.* (2013), investigaram a composição química e as atividades biológicas de *Allium flavum* e identificaram a presença de 44 compostos fenólicos no extrato metanólico da planta e sua atividade antioxidante foi comparável à atividade do extrato de *A. cepa*.

Evidências sugerem que os extratos de *A. cepa* tenham propriedades anticâncer. No entanto, os mecanismos dessa atividade ainda não estão completamente esclarecidos em células cancerosas humanas. A atividade anticâncer dos polifenóis extraídos de *A. cepa* foi investigada em linhagens de leucemia humana. Observou-se que houve inibição do crescimento celular por meio da indução de apoptose, que foi desencadeada através da via extrínseca e intrínseca. Além disso, induziu a apoptose caspase-dependente, em parte, através da inibição de fosfatidilinositol 3-quinase (Han *et al.* 2013).

Os resultados da literatura, sobre a ação antioxidante, anticlastogênica e não tóxica de plantas *Allium* estão em acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, sobre a ausência de citotoxicidade e clastogenicidade do extrato aquoso de *A. cepa*, em ratos Wistar, representando mais um aspecto positivo para a recomendação da ingestão desta planta na dieta humana ou para o emprego seguro como fitoterápico.

Estes resultados podem ser indicativos para a realização de novos experimentos a fim de avaliar a ação antimutagênica desse extrato e com isso, descrever novas propriedades medicinais.

**Tabela 1.** Índices mitóticos (IM) e porcentagens de alterações cromossômicas, obtidos para os diferentes grupos, controles e tratados, de ratos Wistar.

Grupos (mg/mL)	IM	Alterações (%)	Gap	Quebras	Fragmentos acêntricos	Minute	Double Minute
Co+ (1,5 mg/mL)	1,08	128 (21,30)	29 ct e 04 cr	16 ct e 14 cr	20	30	15
Co- (1 mL)	1,40	02 (0,33)	-	02 ct	-	-	-
CEB 1	1,51	04 (0,66)	-	03 ct e 01 cr	-	-	-
CEB 2	1,54	07 (1,16)	-	04 ct e 01 cr	02	-	-

Abreviaturas: Co+, controle positivo com ciclofosfamida; Co-, controle negativo com água; CEB 1, 0,025 g de cebola; CEB 2, 0,150 g de cebola; cr: cromossômica; ct: cromatídica.

## REFERÊNCIAS

- BALBACH, A. 1973. *As Hortaliças na Medicina Doméstica*. São Paulo: M.V.P.
- BENKEBLIA, N. 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Food Science and Technology*, 37: 263-268.
- BOEING, H., JEDRYCHOWSKI, W., WAHRENDORF, J., POPIELA, T., TOBIASZ-ADAMEZYK, B. & KULIG, A. 1991. Dietary risk factors in intestinal and diffuse types of stomach cancer: a multicenter case-control study in Poland. *Cancer Causes and Control*, 2: 227-233.
- BRAVO L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56: 317-333.
- BUIATTI, E., PALLI, D., DECARLI, A., AMADORI, D., AVELLINI, BIANCHI, S., BISERNI, R., CIPRIANI, F., COCCO, P., GIACOSA, A., MARUBINI, E. E., PUNTONI, R., VINDIGNI, C., FRAUMENI, J. & BLOT, W. 1989. A case control study of gastric cancer and diet in Italy. *International Journal of Cancer*, 44: 611-616.
- CHARLIER, B., PERARNAU, J. & VIEL, J. 1998. Garlic, onion and cereal fibre as protective for breast cancer: a French case study. *European Journal of Epidemiology*, 14: 739-747.
- COSTA, N.D. & RESENDE, G.M. 2007. Cultivo da Cebola no Nordeste. *EMBRAPA Semi-árido Sistemas de Produção versão eletrônica*, 3. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/quimica.htm>>. 2007. Acesso em: 4 mar. 2013.
- DARROUD, F. 1990. *Cytogenetic short term assays for genotoxicity post-graduate practical course 7-18 may*. Departament of Radition Genetics and Chemical Mutagenesis, Sylvius Laboratory, State University of Leiden.
- FORD, C.F. & HAMERTON, J.L. 1956. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosome. *Stain Technical*, 31: 247-251.
- FUKUSHIMA, S., TAKADA, N., HORI, T. & WANIBUCHI, H. 1997. Cancer prevention by organosulfur compounds from garlic and onion. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement*, 27: 100-105.
- GRAHAM, S., MARSHALL, J., HAUGHEY, B., MITTELMAN, A., SWANSON, M., ZIELEZNY, M., BYERS, T.; WILKINSON, G. & WEST, D. 1988. Dietary epidemiology of cancer of the colon in western New York. *American Journal of Epidemiology*, 128: 490-503.
- HAENSZEL, W., KURIHARA, M., SEGI, M. & LEE, R.K. 1972. Stomach cancer among Japanese in Hawaii. *Journal of the National Cancer Institute*, 49: 969-988.
- HAN, M.H., LEE, W.S., JUNG, J.H., JEONG, J.H., PARK, C., KIM, H.J., KIM, G.S., JUNG, J.M., KWON, T.K., KIM, G.Y., RYU, C.H., SHIN, S.C., HONG, S.C. & CHOI, Y.H. 2013. Polyphenols isolated from *Allium cepa* L. induces apoptosis by suppressing IAP-1 through inhibiting PI3K/Akt signaling pathways in human leukemic cells. *Food and Chemical Toxicology*, 62: 382-389.
- JUNQUEIRA, A.P.F. 2006. Estudo do potencial clastogênico e genotóxico do extrato de *Piper cubeba* em células de Roedores *in vivo*. 67f. Dissertação (Mestrado em Saúde). Universidade José do Rosário Vellano. Alfenas, 2006.
- LANDI, S., HANLEY, N.M., WARREN, S.H., PEGRAM, R.A. & DE MARINI, D.M. 1999. Induction of genetic damage in human lymphocytes and mutations in *Salmonella* by trihalomethanes: roles of red blood cells and GSTT1-1 polymorphism. *Mutagenesis*, 14: 479-482.
- LEVI, F., LA-VECCHIA, C., GULIE, C. & NEGRI, E. 1993. Dietary factors and breast cancer risk in Vaud Switzerland. *Nutrition and Cancer*, 19: 327-335.
- LUTZ, W.K. & KOPP, S.A. 1999. Threshold dose response for tumor induction by genotoxic carcinogens modeled via cell-cycle delay. *Toxicology Science*, 49: 110-115.
- MOHAMMADI-MOTLAGH, H.R., MOSTAFAIE, A. & MANSOURI, K. 2011. Anticancer and anti-inflammatory activities of shallot (*Allium ascalonicum*) extract. *Archives of Medical Science*, 7: 38-44.
- RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A.L.R. & NETO, R.M. 1991. *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética. 246 p.
- RIBEIRO, L.R. & MARQUES, E.K. 2003. A importância da Mutagênese Ambiental na Carcinogênese Humana. In: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F. & MARQUES, E. K. (orgs.) *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra. 355 p.
- ROYCHOUDHURY, A., DAS, T., SHARMA, A. & TALUKDER, G. 1993. Use of crude extract of garlic (*Allium sativum* L.) in reducing cytotoxic effects of arsenic in mouse bone marrow. *Phytotherapy Research*, 7: 163-166.
- ROYCHOUDHURY, A., DAS, T., SHARMA, A. & TALUKDER, G. 1996. Dietary garlic extract in modifying clastogenic effects of inorganic arsenic in mice: two-generation studies. *Mutation Research*, 359: 165-170.
- SIES, H. 1993. Strategies of antioxidante defence. Review. 1993. *European Journal of Biochemistry*, 215: 213-219.
- SILVA, J., ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J.A.P. (orgs.). 2003. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance. 422 p.
- SIMIN, N., ORCIC, D., CEROJEVIC-SIMIN, D., MIMICA-DUKIC, N., ANACKOV, G., BEARA, I., MITIC-CULAFIC, D. & BOZIN, B. 2013. Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of small yellow onion (*Allium flavum* L. subsp. *flavum*, Alliaceae). *Food Science and Technology*, 54: 139-146.
- STAJNER, D. & VARGA, I.S. 2003. An evaluation of the antioxidant abilities of *Allium* species. *Acta Biologica Szegediensis*, 47: 103-106.
- STEINMETZ, K.A. & POTTER, J.D. 1993. Food-group consumption and colon cancer in the Adelaide Case-Control study. I. Vegetables and fruit. *International Journal of Cancer*, 53: 711-719.
- TUROLLA, M.S.R. & NASCIMENTO, E.S. 2006. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42: 289-306.
- ZEIGER, E. 2001. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or fault tests? *Mutation Research*, 492: 29-38.