

AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *ALLIUM SATIVUM* E *ZINGIBER OFFICINALE* EM *ALLIUM CEPA*

CYTOTOXICITY EVALUATION OF AQUEOUS EXTRACTS OF *Allium sativum* AND *Zingiber officinale* IN *Allium cepa*

Jenifer Adriane Barros
Gabriela Marques de Souza
Camila Vieira da Silva

RESUMO

O grau da citotoxicidade de plantas medicinais pode ser obtido por meio da análise do ciclo celular de *Allium cepa*, sendo usado como designativo de segurança para as pessoas que usam chás de plantas no tratamento de doenças. As espécies *Allium sativum* e *Zingiber officinale* são utilizadas na medicina popular esperando-se obter os seguintes efeitos em comum: antifúngico, antimicrobiano e anti-inflamatório, porém não existem estudos suficientes que comprovem as ações citotóxicas destas espécies. A fim de realizar o teste de citotoxicidade destas substâncias, foram utilizados bulbos de cebolas, colocados para enraizar em água destilada (controle), e nos grupos tratamento foram submersos em chá de alho (Tratamento 1) e gengibre (Tratamento 2). Após o enraizamento foram coletadas as radículas, hidrolisadas em HCL 1N em banho maria, e em seguida corados com o kit Panótico Rápido LB. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos citotóxicos dos extratos aquosos de *Allium sativum* e *Zingiber officinale* obtidos segundo sua utilização popular, sob o sistema vegetal de *Allium cepa*. Os testes realizados demonstraram uma diminuição das divisões celulares o que pode indicar que não possuem ação citotóxica.

PALAVRAS CHAVE: Fitoterapia, toxidade, ciclo celular, chá.

ABSTRACT

The cytotoxicity of the medicinal plant species can be obtained by the cell cycle analysis of *Allium cepa*, being used as security designation for people who use plant teas to treat diseases. The *Allium sativum* and *Zingiber officinale* species are used in folk medicine and it is expected to obtain the following effects: antifungal, antimicrobial and anti-inflammatory, but there are not enough studies that prove the cytotoxic actions of these species. In order to carry out the cytotoxicity test of these substances, bulbs of onions were used and placed to root in distilled water (Control). Then, as part of the treatment, the groups were submerged in garlic tea (Treatment1) and ginger (Treatment2). After rooting, the rootlets were collected, hydrolyzed in HCl 1N in water bath, and then, stained with LB Fast Panotic kit. The goal of this study was to evaluate the cytotoxic effects of aqueous extracts of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* obtained according to its popular use in the vegetal system of *Allium cepa*. The tests showed a decrease of cell divisions which may indicate not have cytotoxic action.

KEYWORDS: Herbal Medicine, toxicity, cell cycle, tea.

INTRODUÇÃO

Mundialmente, diversas espécies de plantas são usadas no tratamento de patologias, o consumo do chá destas plantas podem extinguir os efeitos de agentes mutagênicos que estejam atuando sob um organismo. (SILVA et al., 2004). A fitoterapia é um dos recursos da medicina natural, que consiste no conjunto de técnicas utilizando vegetais no tratamento de doenças (PALHARIN et al., 2008). Dentre as plantas que possuem potencial medicinal destacam-se a *Allium sativum* (alho) e *Zingiber officinale* (gengibre). O alho possui propriedades farmacológicas capazes de atuar a nível digestivo/intestinal, renal, respiratório, no tratamento da diabetes, da hipertensão arterial, das dislipidemias, da arteriosclerose, no alívio de dores de dentes e picadas de insetos. O alho possui em sua composição a inulina, um polissacarídeo que auxilia no controle das bactérias patogênicas e putrefativas existentes no intestino (DALONSO et al., 2009; TSAI et al., 2012).

Por sua vez, o chá de gengibre é utilizado no tratamento contra gripes, tosses e

35

R
E
V
I
S
T
A

resfriados. Banhos e compressas quentes de gengibre são indicados para aliviar os sintomas de gota, artrite, dores de cabeça e na coluna, além de diminuir a congestão nasal, cólicas menstruais e servir na prevenção do câncer de intestino e ovário. O gengibre possui em sua composição os gingeróis e soagóis, que são compostos fenólicos a quais são atribuídos os efeitos anticancerígenos (GRZANNA et al., 2005; KUNDU et al., 2009; SOUSA et al., 2013).

O conhecimento da citotoxicidade destas espécies pode ser obtido por meio da análise do ciclo celular de *Allium cepa*, que possui grande relevância como designativo para assegurar as pessoas que utilizam infusões de plantas como único método terapêutico (BAGATINI et al., 2007). A eficiência das infusões aquosas de plantas sob o ciclo celular de *Allium cepa* têm sido mencionada por diversos autores (VICENTINI et al., 2001; CAMPAROTO et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2003; KNOLL et al., 2006; FACHINETTO et al., 2007), nos quais apontam mutagenicidade ou anti-mutagenicidade, a partir do aumento ou diminuição da mitose celular de radículas tratadas com distintas espécies de plantas.

Segundo Arraes e Longhin (2008), Matsumoto e Marin-Morales (2004) *apud* Amaral et al. (2007), a *Allium cepa* é um vegetal superior muito utilizado por pesquisadores em ensaios toxicológicos, pois as cebolas são fáceis de serem armazenadas e manuseadas e as células de suas raízes constituem um sistema conveniente tanto para parâmetros macroscópicos (crescimento, deformidade), quanto para parâmetros microscópicos (aberrações cromossômicas).

MATERIAIS E MÉTODOS

36

1. Local da pesquisa

O presente trabalho teve como local de pesquisa o laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Apucarana (FAP), localizada na cidade de Apucarana norte do Paraná – Brasil. Inserida no bairro Jardim Flamingos, Rua Oswaldo de Oliveira nº 600. Possuindo uma área total de 126.259 m² sendo 13.049 m² arquitetados, abrangendo cursos nas áreas: humanas, exatas, saúde e licenciatura.

2. Sistema teste – células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*

As cebolas de tamanho uniformes foram adquiridas de uma fonte comercial, as unidades de *A. cepa* foram divididas em 3 grupos (um controle e dois tratamentos) em seguida colocadas para enraizar sob frascos de 50 ml em temperatura ambiente, por 4 dias. No grupo controle (Co) a parte inferior esteve mergulhada em água destilada, já no grupo tratamento a parte inferior permaneceu submersa em soluções aquosas de *A. sativum* (Tr1) e *Zingiber officinale* (Tr2).

Por volta de 96h depois o início do teste, os meristemas foram coletados com aproximadamente 1 cm de comprimento, enxaguados em água destilada e hidrolisados em solução de HCL 1 N por 10 minutos em banho Maria a 60 C°, o resfriamento dos tubos sucedeu-se em água corrente. Em seguida, os meristemas foram colocados sobre a lâmina e corados com o kit Panótico Rápido LB que é composto por três soluções: triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e tiazinas a 0,1%, foram adicionadas 3 gotas de cada solução seguindo a sequência descrita acima com um intervalo de 2 minutos entre um e outro. Logo após, as lâminas foram cobertas com uma lamínula e envoltas em papel filtro

dobrado, em seguida foi pressionado o polegar contra a lamínula para que as raízes fossem esmagadas.

3. Preparo das infusões

O alho (*Allium sativum*) foi preparado em forma de infusão. A parte utilizada foram os bulbilhos frescos, e estes foram descascados, colocados em um becker e imersos em água fervente, ficando cobertos por 15 min. A infusão foi então extraída e resfriada em temperatura ambiente.

O gengibre (*Zingiber officinale*) também foi preparado em forma de infusão. A parte utilizada foi o seu rizoma, e estes foram higienizados em água corrente, cortados em rodela, colocados em um becker e imersos em água fervente, ficando cobertos por 15 minutos, então a infusão foi extraída e resfriada em temperatura ambiente. Após o resfriamento das infusões, estas foram utilizadas ainda no mesmo dia, pois o armazenamento das mesmas pode ocasionar a perda de algumas de suas propriedades. As soluções tratamentos das espécies *Allium sativum* e *Zingiber officinale* foram preparadas em três concentrações: 25 g/L, 50 g/L e 100 g/L.

4. Determinação do índice mitótico dos grupos tratamento e controle.

Para avaliar as células com alteração estruturais e determinação do IM (Índice Mitótico), foram utilizados cinco bulbos para cada grupo, controle e tratamentos, sendo analisadas 100 células por bulbo, totalizando 500 células por grupo. Foram avaliadas também as ocorrências de alterações cromossômicas e morfológicas celulares. A análise das lâminas foi realizada em microscópio de luz, com aumento final de 400 vezes e o cálculo do Índice Mitótico (IM) feito como a seguir:

$$IM = \frac{N^{\circ} \text{ de células em divisão}}{N^{\circ} \text{ de células em interfase} + N^{\circ} \text{ de células em divisão}} \times 100$$

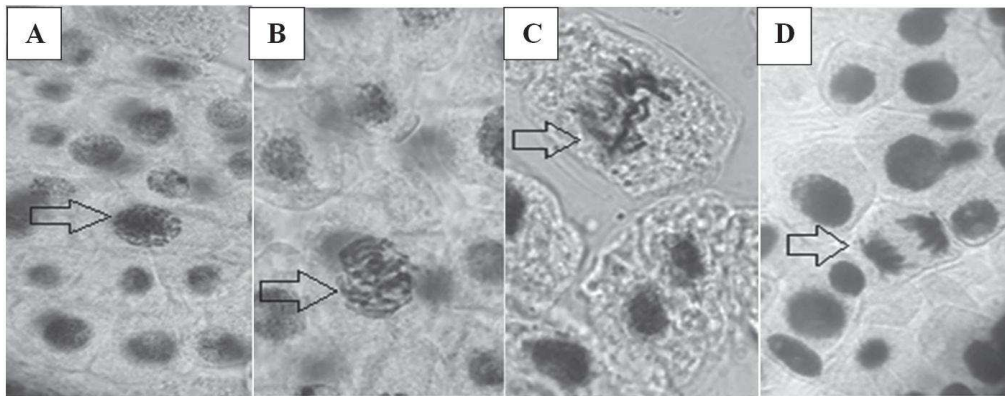
RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados a seguir foram obtidos através dos testes feitos em raízes de *Allium cepa* submetidas à solução controle (Co) e às infusões aquosas de *Allium sativum* (Tr1) e *Zingiber officinale* (Tr2) através da análise microscópica das lâminas e determinação do IM. As lâminas analisadas não apresentaram células binucleadas ou aberrações cromossômicas, a Figura 1 mostra algumas células de raízes de *Allium cepa* em diferentes fases do ciclo celular, como: interfase (A), prófase (B), metáfase (C) e anáfase (D).

37

R
E
V
I
S
T
A

Figura 1. Células de *Allium cepa* em diferentes fases do ciclo celular



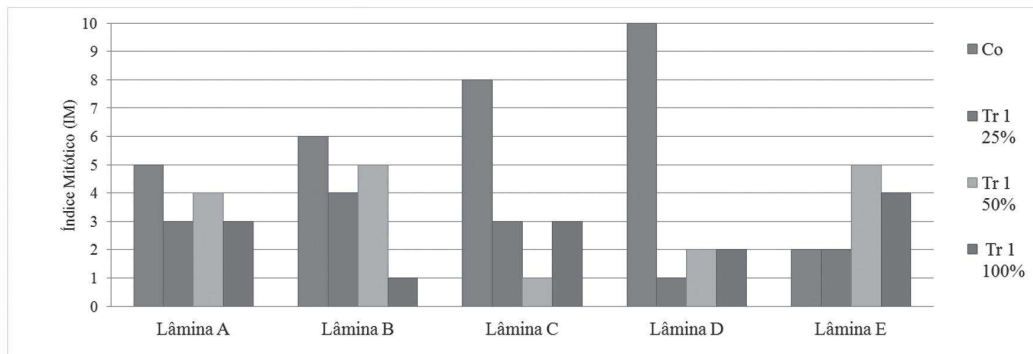
Fonte: Autora do Trabalho, 2015.

Os resultados obtidos com os experimentos feitos com diferentes concentrações das infusões demonstraram uma queda do índice mitótico comparado com o grupo controle. No grupo controle a média do índice mitótico (IM) foi de 32,0, enquanto que no grupo exposto ao chá de alho á 25%, 50% e 100% o índice foi de 19,0, 13,0 e 10,0 respectivamente, já no grupo tratado com ochá de gengibre nas mesmas concentrações o IM foi de 9,0, 16,0 e 13,0.

Pode-se observar que tanto no grupo tratamento 1 quanto no grupo tratamento 2, o índice mitótico foi menor em relação ao grupo controle. No gráfico 1 e 2 podemos observar o cálculo do IM das três diferentes concentrações testadas em cinco lâminas.

38

Gráfico 1. Comparação do IM entre o grupo controle (Co) e o grupo tratamento (Tr 1) submetido a infusões aquosas de *Allium sativum* nas concentrações de 25%, 50% e 100%



Fonte: Autora do Trabalho, 2015.

(Co) grupo controle/ (Tr 1 25%) grupo tratamento 25% / (Tr 1 50%) grupo tratamento 50% / (Tr 1 100%) grupo tratamento 100%

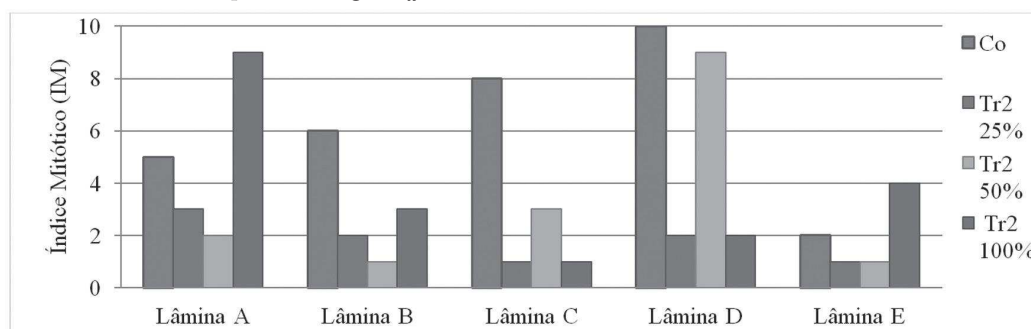
REVISITA

Não se encontrou na literatura testes similares a este se utilizando as infusões aquosas de *Allium sativum*, isto é compreensível, devido ao fato de que a preocupação com o efeito citotóxico dos vegetais é algo relativamente novo.

Um dos principais constituintes do alho é a inulina, e o seu consumo não é recomendado em altas concentrações, segundo Saad (2006), a inulina deve ser ingerida diariamente com doses de 5 a 20 gramas. O alho quando consumido em elevadas quantidades pode desencadear distúrbios testiculares, anemias, problemas gastrointestinais, reações alérgicas, erupções cutâneas, eczemas e dermatites de contato (FEHRI et al., 1991; TSAI et al., 2012; DESAI et al., 1990).

Pinho et al. (2010) utilizou o sistema teste em *Allium cepa*, onde também avaliou o índice mitótico e verificou-se que a concentração mais alta, da infusão de carqueja diminuiu o índice mitótico. A ação anti-proliferativa sobre o ciclo celular da cebola foi observada também nos experimentos de Fachinetto et al. (2007), ao utilizar as infusões de macela, popularmente conhecida como camomila nacional, uma outra espécie de planta medicinal, sendo que a ação inibitória da divisão celular aumentou conforme o aumento da concentração.

Gráfico 2. Comparação do IM entre o grupo controle (Co) e o grupo tratamento (Tr 2) submetido á infusões aquosas de *Zingiber officinale* nas concentrações de 25%, 50% e 100%



Fonte: Autora do Trabalho, 2015.

(Co) grupo controle / (Tr 2 25%) grupo tratamento 25% / (Tr 2 50%) grupo tratamento 50% / (Tr 2 100%) grupo tratamento 100%

Segundo diversos autores (ZICK et al., 2011; BALIGA et al., 2011; BROWN et al., 2008), o gengibre possui ação anticancerígena comprovada, porém também apresenta vários efeitos tóxicos em alguns tipos celulares, como nas células ováricas, nos linfócitos humanos e células basais alveolares (BALIGA et al., 2011; KIM et al., 2008).

Estudos realizados por Fachinetto e Bagatini (2009), utilizando extratos aquosos de duas espécies de carqueja, *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata*, apresentaram inibição da divisão celular já em uma menor concentração de 15 g/L, bem como alterações celulares, indicando a ocorrência de atividade anti-proliferativa dos extratos usados.

CONCLUSÃO

Conclui-se que os resultados demonstram que tanto o chá de *Allium sativum* quanto o chá de *Zingiber officinale*, atuam na diminuição da proliferação celular e com isso, comprovam que não possuem ação citotóxica, porém se faz necessária a realização de mais estudos sobre os efeitos do gengibre e do alho, de maneira a possibilitar a obtenção de conclusões mais definitivas.

REFERÊNCIAS

- ARRAES, A. I. O. M. E.; LONGHIN, S. R. **Otimização de ensaio de toxicidade utilizando o bioindicador *Allium cepa* como organismo teste.** Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p. 1958, 2012.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F. DA; TEDESCO, S. B. **Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais.** Revista Brasileira de Farmacognosia. 17(3): 444-447, Jul./Set, 2007.
- BALIGA, M. S.; HANIADKA, R.; PEREIRA, M. M.; D'SOUZA, J. J.; PALLATY, P. L.; BHAT, H. P.; PPOPURI, S. **Update on the chemopreventive effects of ginger and its phytochemicals.** Crit Rev Food Sci Nutr, 51, pp. 499-523, 2011.
- BROWN, A.C.; SHAH, C.; LIU, J.; PHARM, J. T.; ZHANG, J. G.; JADUS, M. R. **Ginger's (*Zingiber officinale* Roscoe) inhibition of rat colonic adenocarcinoma cells proliferation and angiogenesis in vitro.** Phytother Res, 23, pp. 640-645, 2008.
- CAMPAROTO, M.L; TEIXEIRA R.O; MANTOVANI M.S; VICENTINI V.E.P. **Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells.** Genet Mol Biol 25: 85-89, 2002.
- DALONSO, N.; IGNOWSKI, E.; MONTEIRO C. M. A.; GELSLEICHTER M.; WAGNER T. M.; SILVEIRA M. L. L.; SILVA, D. A. K. **Extração e caracterização de carboidratos presentes no alho (*Allium sativum* L.): proposta de metodologia alternativa.** Ciência e Tecnologia de Alimentos. ISSN 0101-2061 29(4): 793-797, Campinas, 2009.
- DESAI, H., KALRO R.H. e CHOSKI, A. **Effect os ginger and garlicon DNA content of gastricaspirate.** Indian J Med Res, 92, pp. 139-141, 1990.
- FACHINETTO, J.M; BAGATINI M.D; DURIGON J; SILVA A.C.F; TEDESCO S.B. **Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*.** Ver Bras Farmacogn 17: 49-54, 2007.
- 40 FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S.B. **Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*.** Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.11, n.4, p.360-367, 2009.
- FEHRI, B.; AIACHE, J.; KORBI, S.; MONKANI, M.; EEN S.M.; MEMMI, A. **Toxic effects induced by the repeat administration of *Allium sativum*.** L. J Pharm Belg, 46, pp. 363-374, 1991.
- GRZANNA, R.; LINDMARK, L.; FRONDOZA, C. G. **Ginger: An herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions.** J Med Food, 8, pp. 125-132, 2005.
- KIM, J. S.; LEE, S. I.; PARK, H. W.; YANG, J. H.; SHIN, T. Y.; KIM, S. H.; CHOI, S. U.; KEON, B. M.; LEEM, K. H.; JUNG, M. Y.; Kim, D. K. **Cytotoxic components from the dried rhizomes of *Zingiber officinale* Roscoe.** Arch Pharm Res, 31, pp. 415-418, 2008.
- KNOLL M.F.; SILVA A.C.F.; CANTODOROW T.S.; TEDESCO S.B. **Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells.** Genet Mol Biol 29: 539-542, 2006.
- R
E
V
I
S
T
A
KUNDU, J. K.; NA, H. K.; SURH, Y. J. **Ginger-derived phenolic substances with cancer preventive and therapeutic potential.** Forum Nutr., 61, pp. 182-192, 2009.
- MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. **Mutagenic potential of the water of a river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* test system.** Cytologia. 69: 399-408. 2004, apud AMARAL, A. de M.; BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J.C.; BARROS, L. **Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*).** Revista Brasileira de Toxicologia. V. 20, n.1 e 2, p. 65-72, 2007.

-
- PALHARIN, L. H. Di C.; FIGUEIREDO E. N.; CAMARGO M. P. L.; ASCÊNCIO F.; BOSQUÊ, G. G. **Estudo sobre gengibre na medicina popular.** Revista científica eletrônica de agronomia – ISSN: 1677-0293. Ano VII – Número 14 – Dezembro de 2008.
- PINHO, D.S.; STURBELLE R.T.; ROTH, M DA G.M.; GARCIAS, G.L. **Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos.** Revista Brasileira de Farmacognosia. 20 (2): 165-170, Abr./Mai, 2010.
- SAAD, S.M.I. **Probióticos e prebióticos: o estado da arte.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol.42, n.1, 2006.
- SILVA, C.R.; MONTEIRO, M.R.; CALDEIRA, DE A.A.; BEZERRA, R.J. A. C. **Absence of mutagenic and cytotoxic potentiality of senna.** Rev. Bras. Farmacogn. ISSN: 0102-695Xv. 14, supl. 01, p. 01-03, 2004.
- SOUSA, L. S.; SILVA, I.R.C.DA; ASSIS, D. DE J.; PASCOAL, D. R. DA C.; DRUZIAN, J. I. **Estudo prospectivo sobre as propriedades terapêuticas do *zingiber officinale* (gengibre) com ênfase na ação antimicrobiana.** Revista GEINTEC – ISSN: 2237-0722. Vol. 3/n. 5/ p.427-436, São Cristóvão-SE, 2013.
- TEIXEIRA, R.O.; CAMPAROTO, M.L.; MANTOVANI, M.S.; VICENTINI, V.E.P. **Assessment of two medicinal plants *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in in vitro and in vivo assays.** Gen Mol Biol 26: 551-555, 2003.
- TSAI, C.; CHEN, H.; SHEEN, L.; LII, C. **Garlic: Health benefits and actions.** Biomedicine, 2, pp. 17-29, 2012.
- VICENTINI, V.E.P.; CAMPAROTO, M.L.; TEIXEIRA, R.O.; MANTOVANI, M.S. ***Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems.** Acta Scientiarum 23: 593-598, 2001.
- ZICK, S.M.; TURGEON, D.K.; VAREED, S.K.; RUFFIN, M.T.; LITZINGER, A.J.; WRIGHT, B.D.; ALRAWIL, S.; NORMOLLE, D.P.; DJURC, Z.; BRENNER, D.E. **Phase II Study of the Effects of Ginger Root Extract on Eicosanoids in Colon Mucosa in People at Normal Risk for Colorectal Cancer.** American Association for Cancer Research. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0224, 2011.7

41

R
E
V
I
S
T
A