



ANÁLISES TÓXICA, CITOTÓXICA E GENOTÓXICA DE INFUSÕES DE *Pimpinella anisum* ATRAVÉS DO TESTE *Allium cepa*

Tainá Azevedo Reis¹, Euclides Bezerra Luz², Thiago Brasil Araújo³, Luelma Savana Soares Rocha⁴, David Wanderson Miranda e Sousa⁵, Aracelli de Sousa Leite⁶

^{1,2}Iniciação científica do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação do Piauí-IFPI. e-mail: taina.reis.2@hotmail.com; e-mail: kutialoco@hotmail.com.

^{3,4,5}Aluno(a) do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação do Piauí-IFPI. e-mail:luelma_7@hotmail.com; e-mail: thg-brasil@hotmail.com; e-mail:davidfla1@yahoo.com.br.

⁶Doutoranda em Biotecnologia (RENORBIO) e professora do Instituto Federal de Educação do Piauí-IFPI. email: aracellileite2003@yahoo.com.br.

Resumo:

O chá é uma das bebidas mais consumidas no mundo. Um dos chás mais consumidos na atualidade é o chá de erva-doce, que é amplamente utilizado como tranquilizante e diurético. Estudos apontam que *P. anisum* detêm de vários efeitos terapêuticos, apresentando variadas condições, tais como digestivo, ginecológica, neurológica, e doenças respiratórias, assim como atividade antibacteriana. Os componentes químicos presentes nas plantas podem, em excesso, possuir atividade tóxica. O objetivo deste trabalho foi de avaliar a atividade tóxica, citotóxica e genotóxica de infusões do chá erva-doce comercializado em Floriano/PI através do teste de *A. cepa*. Observou-se que a infusão as concentrações testadas da infusão de erva doce apresentou atividades tóxicas e citotóxicas significantes ($P < 0,0001$), observados através da inibição do crescimento das raízes de *A. cepa* e do índice mitótico. No entanto, não apresentou significativa atividade genotóxica ($P > 0,05$) analisadas a partir das aberrações cromossômicas. Este estudo serve de referencia para que a população seja alertada sobre ao consumo exagerado de determinados chás, acreditando apenas que por se tratar de um produto natural não é passível de efeitos nocivos, e para posteriores estudos científicos, mais conclusivos quando a dose diária ideal.

Palavras-chave: *Pimpinella anisum*, Chá erva-doce, Teste *Allium cepa*, biomarcador.

1. INTRODUÇÃO

O chá é considerado a segunda bebida mais consumida no mundo, uma cultura baseada em tradições milenares. Atualmente, a utilização de chás tem se intensificado devido ao fato de estar relacionado com benefícios à saúde. Estudos recentes apontam que o chá minimiza a incidência de alguns tipos de câncer e doenças cardíacas (NISHIYAMA et al., 2010).

As plantas que nos cercam, como qualquer ser vivo, produzem substâncias químicas, que podem atuar de forma benéfica ou agirem de forma tóxica. Contudo, para que a população possa utilizar uma espécie medicinal, com segurança, é necessário que a mesma seja estudada sob o ponto de vista químico, farmacológico e toxicológico (RITTER et al., 2002).

Uma das plantas medicinais mais antigas, a *Pimpinella anisum* L., pertence à família Umbelliferae (SURMAGHI, 2010). É uma erva anual e uma planta gramínea, que apresenta flores verdes e brancas, com pequenas sementes amarelas, que crescem na Turquia, Irã, Índia, Egito, e muitas outras regiões quentes do mundo (POURGHOLAMI, MAJZOUB, JAVADI, KAMALINEJAD, FANAEE, SAYYAH, 1999; ZARGARI, 1989).

Na medicina popular turca, esta planta, especialmente suas sementes, têm sido utilizados como aperitivo, tranquilizante e diurético. Especialmente, ela vem sendo intensificada na produção de licor na Turquia (ASIMGIL, 1997; BAYTOP, 1999). São mais de 20 espécies de plantas em *Pimpinella anatolia* flora. e *P. anisum*, sendo uma das espécies mais comuns, que cresce em diversas regiões da Turquia (BAYTOP, 1999).



Alguns estudos relatam a presença de eugenol trans-anetole, metilchavicol, anisaldeído, estragol, cumatinas, escopoletina, umbelifirona, estrols, terpenos, polienos epoliacetilenos como os principais constituintes do óleo essencial de erva doce (GULCIN et al., 2003).

Chá de erva-doce à base de plantas é um remédio doméstico, frequentemente utilizado para tratamento de uma variedade de sintomas da gastrointestinal e trato respiratório em algumas áreas da Europa e Ásia (EMEA, 2008). Particularmente chás de erva-doce à base de plantas, são tradicionalmente utilizados para prevenir a flatulência e espasmo em lactentes (ALEXANDROVICH et al, 2003; SAVINO et al., 2005). Torna-se indispensável à avaliação da qualidade, segurança e a eficácia destes produtos, em particular quando alguns dos seus constituintes são suspeitos de ser prejudicial. Os efeitos farmacológicos de sementes de erva-doce têm sido atribuídos a seu óleo essencial, estragol sendo um dos principais constituintes do óleo (TNO, 2010).

Estudos apontam que *P. anisum* detêm de vários efeitos terapêuticos, apresentando variadas condições, tais como digestivo, ginecológica, neurológica, e doenças respiratórias (ABOABRAHIM, 1970). O óleo essencial dos frutos de *P. anisum* é também valioso na perfumaria e na medicina (ERNTS, 1989; SANTOS et al, 1998; SIMON, CHADWICK, CRAKER, 1980). Atividade antibacteriana foi encontrado para o extrato aquoso e metanol do fruto de *P. anisum* contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* e *klebsiella pneumoniae* (AKHTAR et al., 2008).

A análise de infusões a partir do teste *A. cepa* tem sido cada vez mais frequente por se tratar de um teste rápido, simples e de baixo custo. Sua eficiência em estudos comparados a mamíferos tem se mostrado cada vez maior (LEME; MARIN-MORALES, 2008). O objetivo deste trabalho foi de avaliar a atividade tóxica, citotóxica e genotóxica de infusões do chá erva-doce comercializado em Floriano/PI através do teste de *A. cepa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O teste de *A. cepa* seguiu o protocolo segundo Carvalho et al. (2011) com modificações. O sistema de teste foi organizado em seis grupos: Controle negativo (CN-água), Controle positivo, CP, CuSO_4 -0,0012 g/L), Erva-doce 1 (ED = 3,7 g/L); Erva-doce 2 (ED = 1,8 g/L), Erva-doce 3 (ED = 0,37 g/L) e Erva-doce 4 (ED = 0,18 g/L) . A infusão do chá erva-doce foi de 10 minutos segundo (NISHIYAMA et al., 2010). Os bulbos foram limpos e colocados em água corrente por 15 minutos e colocados para germinar, com a parte inferior mergulhada na solução. Foram preparadas quatro concentrações da infusão de chá erva-doce. Para cada tratamento foram utilizados 5 bulbos de cebola para cada controle. Após 48h de exposição em local escuro as raízes foram medidas, com o auxílio de uma régua.

Em seguida, as raízes das cebolas de cada controle, foram cortadas e colocadas em Solução Carnoy e estocadas em solução etanol-água (70-30). Diferenciado do protocolo de Carvalho et al. (2011), as raízes foram lavadas 3 vezes com água destilada por 5 minutos e posteriormente colocadas em solução de HCl 1N por 11 minutos e lavadas com água destilada. As raízes foram transferidas para frascos escuros, contendo Reagente de Schiff e depois foram lavadas para a retirada do excesso de corante. Para o preparo da lâmina, uma ou duas raízes foram colocadas sobre a lâmina e com uma pinça e bisturi, a região meristemática de aproximadamente 1 mm de comprimento foi retirada, desprezando o restante da raiz. Uma gota carmim acético 2% foi adicionada na amostra e uma lamínula foi colocada sobre a mesma. Depois do “squash”, o material foi levado para o microscópio.

Foram feitas uma lâmina para cada bulbo. Os parâmetros microscópicos utilizados foram o índice mitótico (número de células em divisão/1000 células observadas x 100); frequência de aberrações cromossômicas em 1000 células por lâmina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que o chá de erva doce induz toxicidade em células de meristemas de *A. cepa*, como avaliado pela inibição de crescimento de raízes de forma altamente significativa ($P < 0,0001$) em todas as concentrações testadas (Figura 1). Alguns estudos mostraram a presença de eugenol trans-anetole no óleo essencial de *P. anisum* (GULCIN et al., 2003). Este componente junto com outros demonstraram atividade nematicida para o controle de nematódeos (NTIALLI et al., 2011). Assim, provavelmente este composto pode também está presente no chá, corroborando com a atividade tóxica encontrada para todas as concentrações da erva-doce.

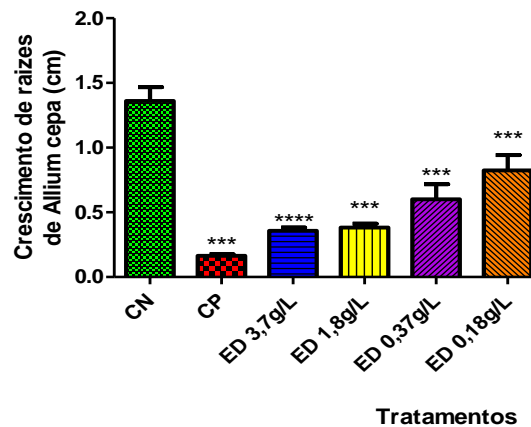


Figura 1. Efeitos tóxicos do chá de erva doce através da inibição do crescimento das raízes do *A. cepa*. ***Diferença significativa $P < 0,0001$ em relação ao controle negativo. ANOVA. Teste de Tukey. Controle negativo (CN); Controle positivo (CuSO_4); chá de erva doce (ED).

De forma similar, foi encontrada atividade citotóxica para o chá de erva doce em todas as concentrações testadas inibiram estatisticamente significativa ($P < 0,0001$) a divisão celular nos meristemas de raízes de *A. cepa* (Figura 2). Outros estudos relacionam os parâmetros macroscópicos como a redução do índice mitótico com a toxicidade, ocasionando interferências na replicação de DNA e síntese de proteínas (TKALEC et al., 2009), como observado em meristemas de *A. cepa* expostas ao chá de erva-doce (Figura 1 e 2).

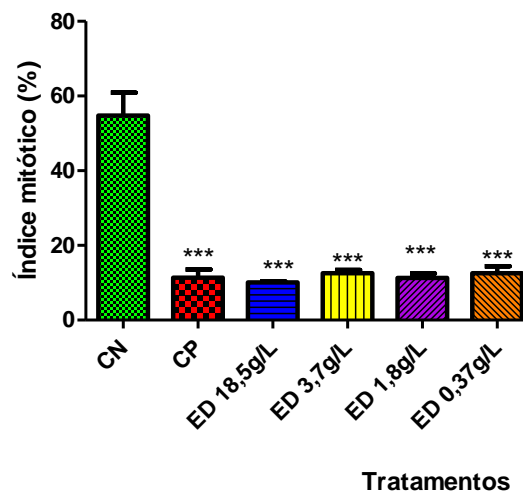


Figura 2. Efeitos citotóxicos do chá de erva doce através da inibição do índice mitótico das raízes do *A. cepa*. ***Diferença significativa $P < 0,0001$ em relação ao controle negativo. ANOVA. Teste de Tukey. Controle negativo (CN); Controle positivo (CuSO_4); chá de erva doce (ED).

Não foram detectados efeitos genotóxicos em nenhuma das concentrações testadas do chá de erva doce estatisticamente significativa ($P > 0,05$). O extrato aquoso e etanólico de *P. anisum* mostraram forte atividade antioxidante, quando comparado com antioxidantes sintéticos como butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) e α -tocoferol (GULCIN et al., 2003). Outros estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram o potencial do extrato etanólico exibiu atividade antioxidante contra óxido nítrico e 1,1-difenil,2-picril hidrazil (DPPH) (RAJESHWARI et al., 2011). As propriedades antioxidantes *in vitro* e *in vivo* também foram encontradas para o chá de erva doce. Exibiu fraco potencial antioxidante no ensaio TEAC e moderado efeito no ensaio de sequestro de hipoclorito e peroxinitrito (SPEISKY et al., 2006).

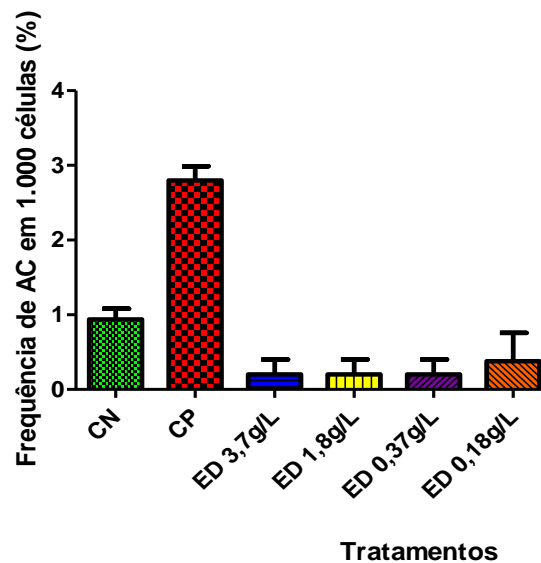


Figura 3. Efeitos genotóxicos do chá de erva doce através da frequência de aberrações cromossômicas através do teste *A. cepa*. ANOVA. Teste de Tukey. Controle negativo (CN); Controle positivo (CuSO_4); chá de erva doce (ED).

6. CONCLUSÕES

Esses dados sugerem que em todas as concentrações testadas do chá de erva doce no sistema *A. cepa* foram tóxicas (inibição do crescimento da raiz) e citotóxicas (inibição do índice mitótico). Entretanto, não apresentaram efeitos genotóxicos (frequência de aberrações cromossômicas).

Uma das principais substâncias é o seu óleo essencial, estragol sendo um dos componentes farmacológicos do chá mais ativos. No entanto, vale ressaltar a importância de outras substâncias presentes na planta, de forma isolada e combinada, uma vez que devido ao consumo em excesso, uma possível substância nociva pode vir a se acumular no organismo. Como se trata de uma planta utilizada na medicina popular para diversas patologias ela deve ser monitorada por seus efeitos maléficos para a saúde humana.

REFERÊNCIAS

- ABOABRAHIM, Z., ZAKHIRAH KHARAZMSHAHI. National Works Publications, Teheran, v. 2, p. 141, 1970.
- AKHTAR, A., A. A. DESHMUKH, BHONSLE A.V., KSHIRSAGAR P.M., KOLEKAR M.A. *In vitro* antibacterial activity of *Pimpinella anisum* fruit extracts against some pathogenic bacteria. *VeterinaryWorld*. v. 1, p. 272–274, 2008.



ALEXANDROVICH, I., RAKOVITSKAYA, O., KOLMO, E., SIDOROVA, T., SHUSHUNOV, S. The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed oil emulsion in infantile colic: a randomized, placebo-controlled study. *Altern. Ther. Health Med.* v. 9, p. 58–61, 2003.

ASIMGIL, A. *Thorn ifaly´ Bitkiler*. Istanbul: Timas, Yayınları, 1997.

BAYTOP, T. *Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present) (1st ed.)*. Publication of Istanbul University, 1999.

CARVALHO, I.M.C.M.; MELO-CAVALCANTE, A.M.; DANTAS, A.F.; PEREIRA, D.L.A.; ROCHA, F.C.C.; OLIVEIRA, F.M. DA SILVA, J. Environmental mutagenicity and toxicity caused by sodium metabisulfite in sea shrimp harvesting in Piauı, Brazil. *Chemosphere*, v. 82, p. 1056-1061, 2011.

EMEA . European Medicines Agency. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Assessment Report on *Foeniculum vulgare* Miller. EMEA/ HMPC/137426/2006. Available from: <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/hmpc/foeniculi_dulcis_fructus/13742606en.pdf>, 2008.

GULCIN,I.; OKTAY, M.; KIRECCI , E.; KUFREVIOGLU, I O.. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts, *Food Chemistry*, v. 83, p. 371–382, 2003.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—A case study. *Mutation Research*, v. 650, p.80-86, 2008.

NISHIYAMA, M.; COSTA, M.A.F.; COSTA, A.M.; SOUZA, C.G.M.; BOER, C.G.; BRACHT, C.K.; PERALTA, R.M. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos biotivos e sobre a estabilidade da bebida. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, p. 191-196, 2010.

NTALLI, N.G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. *Pest management science*, v. 67, p. 341-51, 2011.

POURGHOLAMI, M. H., MAJZOOB, S., JAVADI, M., KAMALINEJAD, M., FANAEE, G. H. R., SAYYAH, M. The seeds essential oil of *Pimpinella anisum* exerts anticonvulsant effects in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 66, p. 211–215, 1999.

RAJESHWARI, C. U.; ABIRAMI, M.; ANDALLU, B. *In vitro* and *in vivo* antioxidant potential of aniseeds (*Pimpinella anisum*), *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, v. 2, p. 80–89, 2011.

RITTER, M. R.; SOBIERAJSKI, G. R.; SCHENKEL, E. P.; MENTZ, L. A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. *Revista Brasileira Farmacognosia*, v. 12, p.51-62, 2002.

SANTOS, P. M., FIGUEIREDO, A. C., OLIVEIRA, M. M., BARROSO, J. G., PEDRO, L. G., DEANS, S. G., YOUNUS, A. K. K. M., & SECHEFFER, J. C. Essential oils from hairy root cultures and from fruits and roots of *Pimpinella anisum*. *Phytochemistry*, v. 46, p. 455–460, 1998.

SAVINO, F., CRESI, F., CASTAGNO, E., SILVESTRO, L., OGGERO, R. A randomized doubleblind placebo-controlled trial of a standardized extract of *Matricariae recutita*, *Foeniculum vulgare* and *Melissa officinalis* (ColiMil) in the treatment of breastfed colicky infants. *Phytother. Res.* 19, p. 335–340, 2005.



SIMON, J. E., CHADWICK, A. F., CRAKER, L. E. In herbs, na indexed bibliography, 1971–1980. Amsterdam: Elsevier, 1984.

SPEISKY, H.; ROCCO, C.; CARRASCO, C.; LISSI, E. A.; L'ÓPEZ-ALARC, C. ON. Antioxidant screening of medicinal herbal teas, *Phytotherapy Research*. v. 20, no. 6, p. 462–467, 2006.

SURMAGHI, M. H. S. Medicinal Plants and Phytotherapy, Donyay Taghziah In Press, Tehran, Iran, v. 1, 2010.

TKALEC, M.; MALARIC, K.; PAVLICA, M.; PEVALEK-KOZLINA, B.; VIDAKOVIC-CIFREK, Z. Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination and root meristematic cells of *Allium cepa* L. *Mutation Research*. v. 672, p. 76-81. 2009.

TNO. Volatile Compounds in Food Database, Release 12.1. Available from: <<http://www.vcf-online.nl/VcfHome.cfm>> , 2010.

ZARGARI, A. Medicinal plants, Tehran: Tehran University, v. 2, 1989.