



POTENCIAL TÓXICO, CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DE INFUSÕES DE *Eucalyptus citriodora* EM CÉLULAS DA RAIZ MERISTEMÁTICA DE *Allium cepa*

Tainá Azevedo Reis¹, Alisson Ferreira Dantas², Thais Miranda Rocha³, Artur Silva Borges Fernandes⁴, Michelle Mara de Oliveira Lima⁵, Aracelli de Sousa Leite⁶

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

²Mestre do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí.

^{3,4}Aluno(a)s do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação do Piauí-IFPI.

⁵Professora Pesquisadora do IFPI Campus Floriano. Bolsistas do Programa de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica – ProAGRUPAR do IFPI. e-mail: michellelima@floriano.ifpi.edu.br

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

Resumo: *Eucalypto citriodora* pertencente à família Myrtaceae é encontrado em quase todas as regiões do mundo. Essa espécie possui uma vasta utilização como perfumaria, cosméticos e purificadores de ar. Mas também tem sido relatada como uma importante espécie por suas atividades biológicas apresentadas. Possui atividade antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, pesticida, antiinflamatória dentre outras. O objetivo deste estudo foi verificar o potencial tóxico, citotóxico e genotóxico de infusões de eucalypto através do teste A. cepa. Observou-se efeitos tóxicos e citotóxicos estatisticamente significantes ($P < 0,0001$ e $P < 0,001$). Entretanto, não foi encontrada atividade genotóxica pelo aumento de aberrações cromossômicas quando comparado com o controle negativo significativo ($P > 0,05$). O consumo de chás de plantas medicinais deve ser monitorado através de testes que comprovem se causam ou não danos à saúde humana, visto que os compostos químicos presentes podem induzir danos ao DNA.

Palavras-chave: *Allium cepa*, citotóxicos, *E. citriodora*, genotóxicos e tóxicos.

1. INTRODUÇÃO

O eucalypto é um abrangente gênero da família Myrtaceae, composta por cerca de 900 espécies e subespécies (BROOKER, KLEINIG, 2004). Embora seja nativo da Austrália, é encontrado em quase todas as partes do mundo, devido à introdução humana. Atualmente sabe-se que são cultivadas em muitos países tropicais, subtropicais e até mesmo sub-temperadas (BATISH et al., 2008). O eucalypto é geralmente cultivado para aquisição de sua madeira, que tem seu uso frequente na fabricação de pasta de celulose e em segundo lugar para as placas e painéis (BROOKER, KLEINIG, 2004).

Eucalyptus citriodora é uma espécie de eucalypto que também possui vasta utilização na perfumaria, para a limpeza de ar, e como um ingrediente importante de cosméticos e purificadores de ambiente (BATISH et al, 2008; HABILA et al, 2010; RAMEZANI, 2002; SINGH et al., 2005). Espécies de eucalypto são bastante conhecidas por apresentar óleos essenciais, que são extraídos, por meio de vapor ou hidrodestilação. Estes têm sido amplamente utilizados nas indústrias de perfumaria e fragrância, e estão entre os melhores óleos comercializados no mundo (BATISH et al., 2008). Óleos que desde os tempos antigos, podem ser utilizados como um anti-séptico, antipirético e analgésico (BROOKER, KLEINIG, 2004). Além disso, o óleo tem sido relatado também com atividade antiinflamatória durante a gripe, resfriado e congestão nasal (SILVA et al., 2003).

Tem sido observado por possuir uma elevada gama de outras atividades biológicas, incluindo antimicrobiana, fungicida, repelente de insetos, pesticida fumegante e acaricida (BATISH et al., 2008). Tradicionalmente, cascas e folhas da planta, foram amplamente utilizadas como medicamentos populares em muitos países para o tratamento de graves doenças e para melhorar a força física (TAKASAKI et al., 2000). É popularmente utilizado no tratamento de inflamação da bexiga, diarreia e aplicado para cortes e abrasões. No entanto, é relativamente pouco conhecido sobre as propriedades



biológicas da resina *E. citriodora*, mais especificamente, seu principal composto bioativo (PIN-DER et al., 2012).

A análise de infusões a partir do teste *Allium 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 o potencial tóxico, citotóxico e genotóxico da infusão do eucalipto comercializado em Floriano/PI através do biomarcador *A. cepa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O teste de *A. cepa* seguiu o protocolo segundo Carvalho et al. (2011) com modificações. Cada grupo experimental constou de 3 concentrações da infusão de eucalipto: 3,2; 1,6 e 0,8 g/L. Como controle negativo (água desclorificada) e controle positivo (sulfato de cobre 0,0012g/L). O eucalipto foi mantido em infusão por 10 minutos (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 três concentrações da infusão de eucalipto. 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 para as análises tóxicas e citotóxicas da infusão de eucalipto em meristemas de raízes de *A. cepa* encontram-se expressos na Figura 1A e 1B, respectivamente. Todas as concentrações testadas apresentaram diminuição do crescimento das raízes significantes ($P < 0,0001$ e $P < 0,001$) e inibição do índice mitótico ($P < 0,0001$) em relação ao controle negativo, sugerindo efeitos tóxicos e citotóxicos das infusões de eucalipto nestas concentrações. A resina de *E. citriodora* inibiu a proliferação de células B16F10 *in vitro* por meio de apoptose e pode ser um potente agente antimelanoma. Neste mesmo estudo, foi encontrado alta presença de compostos fenólicos (PIN-DER DUH et al., 2012). Estes podem induzir apoptose, consequentemente contribuindo para a prevenção do câncer (YI et al., 2005). Outros estudos mostram que óleo volátil de *E. citriodora* inibe fortemente o crescimento radial de todos os fungos fitopatogênicos (RAMEZANI et al., 202).

O crescimento de raízes pode ser regulado pela combinação entre de atividades de divisão celular em meristemas mitoticamente ativos e com a alongação celular que acontece nas regiões proximais dos ápices das raízes (SHISHKOVA et al., 2008). Assim todas as concentrações causam distúrbios de proliferação em meristemas de *A. cepa*. Estes dados corroboram com os relatos sobre a importância do teste *A. cepa*, especialmente por permitir análises macroscópicas e microscópicas, bem como, pelas boas correlações com testes em mamíferos (TEIXEIRA et al., 2003).

Estudos químicos com *E. citriodora* revelam a presença de monoterpenóides como citronelal (52,2%), citronelol (12,3%) e isoisopulegol (11,9%). Observou-se efeito fitotóxico do citronelal e inibição da germinação, enquanto que o citronelol foi o inibidor mais potente de raízes (BATISH et al., 2006). Assim os efeitos observados acima do eucalipto podem ser relacionados provavelmente com essas substâncias presentes na espécie.

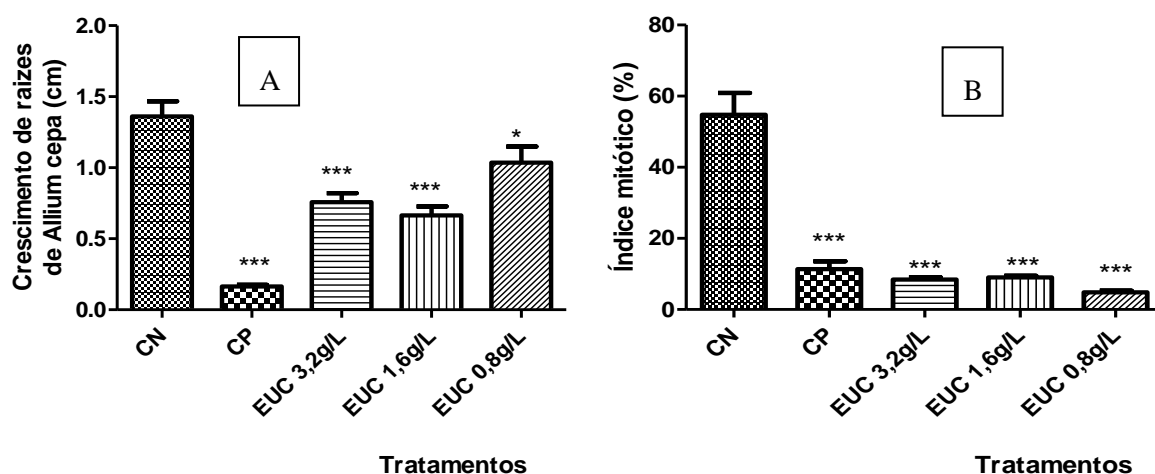


Figura 1. Efeitos tóxicos (A) e citotóxicos (B) da infusão de eucalipto através da inibição do crescimento e inibição do índice mitótico das raízes do *A. cepa* respectivamente. ***Diferença significativa $P < 0,0001$ em relação ao controle negativo. ANOVA. Teste de Tukey. Controle negativo (CN); Controle positivo (CuSO_4); infusão de eucalipto (EUC).

Não foram encontrados efeitos genotóxicos pela frequência de aberrações cromossômicas em nenhuma das concentrações testadas das infusões de eucalipto estatisticamente significativa ($P > 0,05$). Sugerindo efeitos não genotóxicos das infusões de eucalipto. Alguns estudos relatam que a presença de monoterpenóides no óleo das folhas de *E. citriodora* está relacionada com a atividade antioxidante *in vitro* apresentado por esta espécie (SINGH et al., 2012). Compostos fenólicos presentes em *E. citriodorora* (PIN-DER DUH et al., 2012), também encontrados em outras plantas possuem atividade antioxidante e sequestradora de radicais e assim suprem a genotoxicidade de agentes químicos (HEO et al., 2001; ROMERO-JIMÉNEZ et al., 2005).

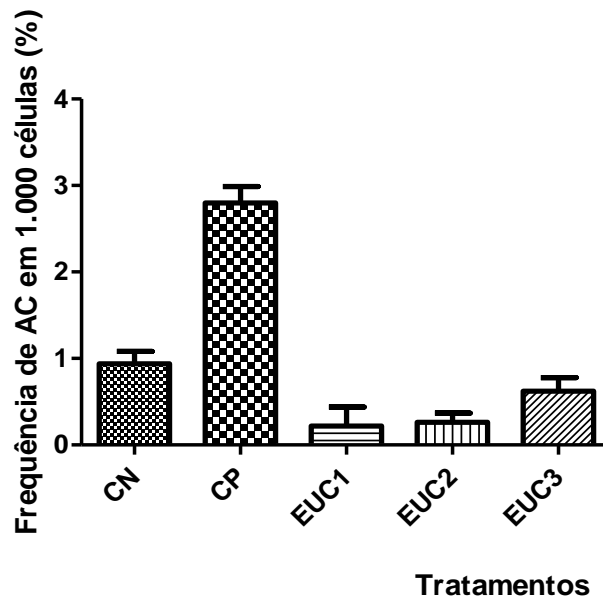


Figura 2. Efeitos genotóxicos da infusão de eucalipto através da frequência de aberrações cromossômicas (AC) nas raízes do *A. cepa*. ANOVA. Teste de Tukey. Controle negativo (CN); Controle positivo (CuSO₄); infusão de eucalipto (EUC).

6. CONCLUSÕES

Os resultados indicam que em todas as concentrações testadas da infusão de eucalipto no sistema *A. cepa* apresentaram efeitos tóxicos e citotóxicos. Entretanto, não apresentaram efeitos genotóxicos pela frequência de aberrações cromossômicas estatisticamente significante.

REFERÊNCIAS

- BATISH, D. R., SINGH, H. P., KOHLI, R. K., KAUR, S. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256, 2166-2174, 2008.
- BATISH, D. R., SINGH, H. P., SETIA, N., KAUR, S., & KOHLI, R. K. Chemical composition and inhibitory activity of essential oil from decaying leaves of *Eucalyptus citriodora*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 61, 465-471, 2006.
- BROOKER, M. I. H., KLEINIG, D. A. Field guide to Eucalypts, (2nd ed.), Vol. 3 Northern Australia. Melbourne, Australia: Bloomings Books, 2004.
- CARVALHO, IMCM; 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 Piauí, Brazil. *Chemosph.* 82, p. 1056-1061, 2011.
- HABILA, N., AGBAJI, A. S., LADAN, Z., BELLO, I. A., HARUNA, E., DAKARE, M. A., et al. (2010). Evaluation of in vitro activity of essential oils against *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma evansi*. *Journal of Parasitology Research*, 2012, 534601(1e5). doi:10.1155/2010/534601.
- LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—A case study. *Mut. Res.*, 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. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 30, p. 191-196, 2010.

PIN-DER DUH, ZONG-TSI CHEN, L SHWU-WOAN LEE, TSUEY-PIN LIN, YA-TING WANG, WEN-JYE YEN, LING-FENG KUO, AND HEUY-LING CHU. Antiproliferative Activity and Apoptosis Induction of Eucalyptus Citriodora Resin and Its Major Bioactive Compound in Melanoma B16F10 Cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. American Chemical Society, 2012.

RAMEZANI, H., SINGH, H. P., BATISH, D. R., KOHLI, R. K. Antifungal activity of the volatile oil of Eucalyptus citriodora. *Fitoterapia*, 73, 261e262, 2002.

SHISHKOVA, S.; ROST, T. L.; DUBROVSKY, J. G. Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. *Annals of Botany*. v. 101, p. 319-340. 2008.

SILVA, J., ABEBE, W., SOUSA, S. M., DUARTE, V. G., MACHADO, M. I. L., MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. *Bioresource Technology*, 89, 277e283, 2003.

SINGH, H. P., BATISH, D. R., SETIA, N., KOHLI, R. K. Herbicidal activity of volatile oils from Eucalyptus citriodora against Parthenium hysterophorus. *Annals of Applied Biology*, 146, 89e94, 2005.

TAKASAKI, M., KONOSHIMA, T., ETOH, H.; SINGH, I. P., TOKUDA, H. NISHINO, H. Cancer chemopreventive acivity of euglobal-G1 from leaves of Eucalyptus grandis. *Cancer Lett.*, 155, 61–65, 2000.

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. *Genetics and Molecular Biology*. v. 26, p. 551-555. 2003.

YI, W.; FISCHER, J.; KREWER, G.; AKOH, C. C. Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* 53, p. 7320–7329, 2005.