



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, MODALIDADE LICENCIATURA.

**ERASMOVLANE SILVA BEZERRA NEVES**

**AÇÃO DE EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *Phyllanthus niruri* L.  
(Euphorbiaceae) SOBRE AS CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAIZES DE  
*Allium cepa* L.**

**Picos, Piauí  
2013**

**ERASMOVLANE SILVA BEZERRA NEVES**

**AÇÃO DE EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *Phyllanthus niruri* L.  
(Euphorbiaceae) SOBRE AS CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAIZES DE  
*Allium cepa* L.**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Peron

**Picos, Piauí  
2013**

Eu, **Erasmovlane Silva Bezerra Neves**, abaixo identificado(a) como autor(a), autorizo a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar, gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação abaixo discriminada, de minha autoria, em seu site, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, a partir da data de hoje.

Picos-PI, 30 de julho de 2014.

  
Assinatura

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí**  
**Biblioteca José Albano de Macêdo**

**N518a** Neves, Erasmovlane Silva Bezerra.  
Ação de extrato aquoso de folhas de *phyllanthus niruri* L (Euphorbiaceae) sobre as células meristemáticas de raízes de *Allium Cepa* L. / Erasmovlane Silva Bezerra Neves. – 2013.  
CD-ROM : il; 4 ¾ pol. (26 p.)  
  
Monografia(Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí. Picos-PI, 2013.  
Orientador(A): Profa. Dra. Ana Paula Peron  
  
1.Planta Medicinal. 2.Quebra-Pedras. 3.Divisão Celular. 4. Aberrações Celulares. 5.*Allium Cepa*. I. Título.

**CDD 615.9**

ERASMOVLANE SILVA BEZERRA NEVES

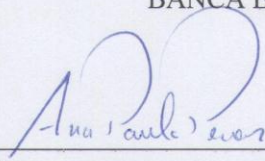
**AÇÃO DE EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *Phyllanthus niruri* L.  
(Euphorbiaceae) SOBRE AS CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAIZES DE  
*Allium cepa* L.**

Monografia apresentada ao curso de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus  
Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Licenciado em  
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Peron

Aprovado em 16/09/2013

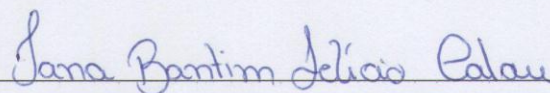
BANCA EXAMINADORA



---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Peron (Orientadora)

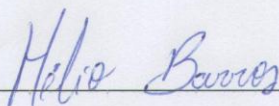
Curso de Ciências Biológicas – UFPI



---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Iana Bantim Felício Calou (Examinador)

Curso de Ciências Biológicas – UFPI



---

Prof. Me. Hélio Barros (Examinador)

Curso de Ciências Biológicas - UFPI

À minha Mãe Laurinete Neves, Meu pai  
Erasmão Neves (In memoriam). A Meus Irmãos  
Evlannyelie, Evlannisylie e Erasmão Junior. A  
minha Namorada Layla.

DEDICO

## AGRADECIMENTO

À DEUS por me guiar, proteger pelo discernimento e sabedoria.

À minha ilustríssima Orientadora Prof<sup>ª</sup> Dr.<sup>a</sup> **Ana Paula Peron**, pela dedicação e profissionalismo. Exemplo de Docente.

À Meu querido Pai **Erasmus Neves** (In memoriam), que mesmo não estando presente neste momento representa a minha vitória. Obrigado Pai. Minha mãe **Laurinete Neves** pelo amor que tens por mim. À vocês agradeço todo o amor a mim dado desde o meu nascimento, por todos os seus ensinamentos a mim ofertado desde a minha infância até os dias de hoje, seus ensinamentos representa o homem que sou hoje. Agradeço a vocês minhas Joias por tudo.

Aos Meus Irmãos **Evlannyelie, Evlannisylie e Erasmo Junior** e meu sobrinho **Enzo Gabriel**. À vocês agradeço o convívio e o amor que tens por mim. Eu amo Vocês.

Ao Meu Amor, Minha Namorada **Layla Rafael**, que está comigo desde o início desta caminhada, me dando força e orientação.

Minha Família é de vocês que vem toda a minha força de vontade e o sucesso. A vitória alcançada.

Aos meus colegas de Curso pelo companheirismo. Por estarmos juntos nessa Jornada. Todos vocês foram fundamental.

A todos que compõe o Campus Senador Helvídio Nunes de Barros (CSHNB). Prestadores de Serviço, Técnicos e Professores.

Ao Núcleo de Pesquisa Aplicada a Saúde e ao Meio-ambiente (NUPBSAM). A todos que compõe esse núcleo. Em especial os alunos que me ajudaram **Herlany Cardoso, Elifran Dantas e Ronielson Carvalho**. Obrigado.

“O temor do Senhor é o princípio do conhecimento; mas os insensatos desprezam a sabedoria e a instrução”.

Provérbios 1:7

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Phyllanthus niruri</i> L. Quebra Pedra.....	14
---	----



## LISTA DE TABELA

**Tabela 01** – Número de células em intérfase e em diferentes fases da divisão celular, total de células analisadas no ciclo celular de pontas de raízes de *A. cepa* tratadas com água e com os extratos aquosos das folhas de *P. niruri* nas concentrações de 0.02; 0.04; 0.06; 0.08mg/mL, nos tempos de exposição 24 e 48 horas..... 20

**Tabela 02** - Número de metáfases colchícinicas, pontes anáfasicas e telofásicas, células micronucleadas e total de aberrações celulares encontradas em cada controle e nas concentrações de 0.02; 0.04; 0.06 e 0.08mg/mL de extratos aquosos de *P. niruri*, nos tempos de exposição 24 e 48 horas..... 21

## RESUMO

O *Phyllanthus niruri* é uma planta com propriedades medicinais. É muitas vezes utilizado para tratar problemas renais. No entanto, os estudos sobre a sua toxicidade são escassos. Este estudo teve por objetivo avaliar a ação de extratos aquosos das folhas secas de *Phyllanthus niruri* L. (popular quebra-pedra) sobre as células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. em quatro concentrações, 0,02 (concentração utilizada para cálculos renais); 0,04; 0,06 e 0,08mg/mL, nos tempos de exposição de 24 e 48 horas. Para cada concentração utilizou-se um grupo de cinco bulbos de cebolas, que primeiramente foram enraizados em água destilada, e em seguida transferidos para as suas respectivas concentrações. As radículas foram coletadas e fixadas em ácido acético (3:1) por 24 horas. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e coradas com orceína acética a 2%. Analisaram-se células em todo ciclo celular, totalizando 5.000 células para cada controle e tempo de exposição. Os índices mitóticos calculados foram submetidos à análise estatística do Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ). A partir dos resultados obtidos observou-se que as quatro concentrações testadas, tiveram efeito antiproliferativo significativo sobre o ciclo celular deste sistema-teste. Também se verificou a presença de aberrações celulares como metáfases colchicínicas, pontes anafásicas e telofásicas, e micronúcleos nos dois tempos de exposição avaliados de todas as concentrações. Portanto, nas condições analisadas, as concentrações de extratos aquoso de folho secas de *P. niruri* mostraram-se citotóxicas e genotóxicas.

**Palavras-Chave:** planta medicinal, quebra-pedra, divisão celular, aberrações celulares, *Allium cepa*.

## ABSTRACT

*Phyllanthus niruri* is a plant with medicinal properties. It is often used to treat kidney problems. However, studies on its toxicity are scarce. This study aimed to evaluate the effects of aqueous extracts of dried *Phyllanthus niruri* L. (stonebreaker) leaves on *Allium cepa* L. root meristem cells at four concentrations, 0.02 (usual concentration), 0.04, 0.06 and 0.08mg/mL and exposure times of 24 and 48 hours. For each concentration we used a group of five onion bulbs that were first embedded in distilled water and then transferred to their respective concentrations. The radicles were collected and fixed in acetic acid (3:1) for 24 hours. The slides were prepared by the crushing technique and stained with 2% acetic orcein. Cells were analyzed throughout the cell cycle, totaling 5000 for each control and exposure time. The calculated mitotic indices were subjected to the Chi-squared statistical analysis ( $p < 0.05$ ). From the results obtained it was observed that all four concentrations tested had significant antiproliferative effect on the cell cycle of this test system. We also found the presence of cellular aberrations such as colchicined metaphases, anaphasic and telophasic bridges, and micronuclei in the two exposure times for all concentrations evaluated. Therefore, under the conditions studied the concentrations of aqueous extracts of leaves of *P. niruri* showed to be cytotoxic and genotoxic.

**Keywords:** medicinal plant, stone-breaking, cell division, cellular aberrations, *Allium cepa*

## SUMARIO

<b>1-INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2-REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
2.1 <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	14
2.2 Sistemas teste.....	16
<b>3-MATÉRIAS E MÉTODOS</b> .....	18
3.1-Coleta da Planta.....	19
3.2-Preparo das Infusões.....	19
3.4-Obtenção das células meristemáticas para a análise citogenética.....	19
3.5-Preparo e leitura das lâminas, e análise dos dados.....	19
<b>4-RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	20
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA</b> .....	23

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, cerca de 70% da população mundial utiliza plantas medicinais no atendimento básico a saúde (FRESCURA et al., 2012). No entanto, muitas destas plantas não foram suficientemente estudadas quanto ao seu potencial citotóxico/genotóxico (BAGATINI et al., 2007; MEYER et al., 2012). Assim, estudos que avaliem a toxicidade em nível celular, como o potencial antiproliferativo e genotóxico, de plantas medicinais, em diferentes organismos de prova, são de grande relevância em função de gerar informações para população sobre a utilização das mesmas, bem como auxiliar na padronização de quantidades de uso seguras e eficazes destes medicamentos (DELARMINA et al., 2012).

A *P. niruri*, espécie pertencente à família Euphorbiaceae, subfamília Phyllanthoideae, é originária da Índia e amplamente distribuída nas Américas (KALLUF, 2008). Esta planta medicinal, conhecida popularmente no Brasil como quebra-pedras (nome mais utilizado pela população em geral), quebra-pedra-verdadeiro, quebra-pedra-roxo e erva-pombinha é classificada como herbácea medindo, em média, 60 cm de altura, com haste ramificada horizontalmente e constituída por folhas simples, ovais e pequenas. Suas flores, amarelo-esverdeadas, são diminutas, dióicas e inseridas nas axilas das folhas (LORENZI e MATOS, 2008). Seus constituintes químicos já foram bem estabelecidos, notadamente as lignanas, taninos e flavonóides, estando os dois últimos presentes em grande concentração em suas folhas (DEVI et al., 2005).

Infusões das folhas de quebra-pedras são muito utilizadas na medicina popular para a retirada de cálculos de oxalato de cálcio dos rins (ALVÁREZ et al., 2009; Nascimento-Barros e Albuquerque, 2012), como eupéptica (DEVI et al., 2005), para afecções do fígado (MURUGAIYA e CHAAN, 2009), na amenização da icterícia (Barros et al., 2012) e no combate a infecções da bexiga e estômago (ABDULLA et al., 2010). No entanto, apesar de muitos trabalhos relatarem os efeitos benéficos desta planta, percebe-se na literatura científica uma carência de estudos sobre sua citotoxicidade. Dessa forma, é importante realizar análises, como as de citogenética, de células tratadas com diferentes concentrações de quebra-pedras, em organismos-testes diferentes e em diferentes tempos de exposição.

Os bioensaios com plantas são considerados adequados no monitoramento de efeitos tóxicos de compostos químicos (USEPA) (GRANT, 1999; IGANCI et al., 2006; HERRERO et al., 2012) e a *A. cepa* (cebola) é um eficiente organismo bioindicador de

citotoxicidade de infusões de plantas medicinais (FACHINETTO et al., 2007; LEME e MARIN-MORALES, 2008) por suas propriedades cinéticas de proliferação e por possuir cromossomos grandes e em número reduzido ( $2n=16$ ), o que facilita a análise na detecção de danos ocorridos durante a divisão celular, como a presença de pontes anafásicas e telofásicas, metáfases colchínicas, e de danos cromossômicos, como a ocorrência de células micronucleadas (MATSUMOTO et al., 2006, CARITÁ e MARIN-MORALES, 2008; HERRERO et al., 2012).

Este organismo de prova demonstra similaridade satisfatória aos resultados obtidos com outros bioensaios, como os realizados com animais e em cultura de células, (FACHINETTO et al., 2007; NUNES et al., 2011; GERAS'KIN et al., 2011), sendo frequentemente usado para alertar a população sobre o consumo de fitoterápicos (BAGATINI et al., 2007; MACÊDO et al., 2008).

Portanto, em virtude do grande uso de *P. niruri*, bem como a necessidade de mais estudos sobre os efeitos citotóxicos desta planta, e considerando o sistema *A. cepa* adequado para avaliação de toxicidade em nível celular de plantas medicinais, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial antiproliferativo e genotóxico de diferentes concentrações de quebra-pedras em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* em dois tempos de exposição.

## 2 REFERENCIAL TEORICO

A sociedade humana busca uma série de informações sobre o ambiente onde vive, o que lhe possibilita trocar informações diretamente com o meio. Neste acervo, encontra-se inserido o conhecimento relativo ao mundo vegetal com o qual estas sociedades estão em contato. Assim, a busca e o uso de plantas com propriedades terapêuticas é uma atividade que vem de geração a geração, descritos com o intuito de preservar essa tradição milenar e atestada em vários tratados de fitoterapia (CORREA JUNIOR, 1991).

No Brasil, a primeira descrição sobre o uso de plantas como medicamento foi feita por Gabriel Soares de Souza, autor do Tratado Descritivo do Brasil, de 1587. Esse tratado descrevia os produtos medicinais utilizados pelos índios de “as árvores e ervas da virtude”. Com a vinda dos primeiros médicos portugueses ao Brasil, diante da escassez, de remédios empregados na Europa, perceberam a importância das plantas utilizadas pelos indígenas como medicamento. (VEIGA, 2002).

Quase toda a população do mundo tem usado tradicionalmente, ao longo dos séculos, plantas na busca por alívio, cura de doenças e controle de pragas (CUNHA, 2004). Essas espécies utilizadas pela população têm se tornado objeto de estudo em muitos países e tem se tornado uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, que podem resultar na descoberta de novos fármacos, para as mais diversas doenças. Cerca de 13.000 plantas são usadas como fármacos ou para a síntese de moléculas medicinais (MING, 1998).

Dentro deste contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS), reiterou o compromisso em estimular o uso da medicina tradicional e medicina complementar para o período 2002-2005. Por sua vez, o Brasil em 2005, através do SUS, propõe a inclusão das plantas medicinais e fitoterapia como opções terapêuticas no sistema público de saúde. (BRASIL, 2006).

É inegável, no entanto, que o uso popular e mesmo tradicional não é suficientes para validar o uso de plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Nesse sentido, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético, e a preconização ou a autorização oficial do seu uso medicamentoso deve ser fundamentada em evidências experimentais comprobatórias de que o risco a que se expõem aqueles que a utilizam é suplantado pelos benefícios que possam advir (BRASIL, 1995).

## 2.1 *Phyllanthus niruri* L.



Figura 1. *Phyllanthus niruri* L. (Quebra Pedra). Fonte: Via Wikimedia Commons

*Phyllanthus niruri* L. um fitoterápico de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do globo, popularmente conhecido como quebra-pedra, com classificação taxonômica Reino: Plantae, Divisão: Magnoliophyta, Classe: Magnoliopsida, Ordem Malpighiales e pertence a família Euphorbiaceae. Características botânicas: *Phyllanthus niruri* é uma erva ereta com até 60 cm de altura, caule muito fino, folhas dísticas, oblongas, curto-pecioladas e base assimétrica, com até 1cm de comprimento, cuja disposição nos râmulos faz lembrar folhas compostas pinadas, com estípulas avermelhadas. Flores unissexuais, pequenas, amarelas ou esverdeadas, dispostas na parte inferior dos ramos. Fruto capsular medindo até 1mm de diâmetro.

As partes aéreas de *Phyllanthus niruri* apresentam lignanas, alcalóides, triterpenos e flavonóides. A semente possui óleo fixo, contendo ácido linolênico, compostos flavônicos, triterpenóides derivados do lupeol e esteróides (GUPTA et al., 1984; SYAMASUNDAR et al., 1985; JOSHI et al., 1986; HNATYSZYN et al., 1987; NEGI & FAKHIR, 1988; TEMPESTA et al., 1988; SINGH et al., 1989; HUANG et al., 1992). São utilizadas todas as partes da planta para uso medicinal folhas, frutos, sementes e raízes.

Farmacologicamente, a ação antiespasmódica de extratos aquosos das folhas de *Phyllanthus niruri* pode estar relacionada aos alcalóides ou flavonóides presentes



(CALIXTO et al., 1984; SOUSA et al., 1991). Os extratos hidroalcoólicos de *Phyllanthus niruri*, P. mostraram potente ação antinoceptiva em vários modelos experimentais (GORSKI et al., 1993; SANTOS et al., 1995). Para extratos foliares de *Phyllanthus niruri* tem sido relatado um efeito benéfico no tratamento de hepatite B; entretanto, os resultados de vários experimentos realizados para demonstrar esta atividade, são conflitantes (VENKATESWARAN et al., 1987; MEHROTRA et al., 1990; THAMLIKITKUL et al., 1991; YEH et al., 1993; DOSHI et al., 1994; BLUMBERG et al., 1989; LEELARASAMEE et al., 1990; THYAGARAJAN et al., 1988; NIU et al., 1990). O tratamento da hepatite B com quebra-pedra foi patenteado por uma empresa norte-americana, sendo este efeito é obtido com cápsulas gastroresistentes, uma vez que as substâncias com atividade antiviral são degradadas no estômago (MATOS, 1994).

Suas folhas são usadas como diuréticas, em afecções do fígado, icterícia, cólicas renais, moléstias da bexiga, retenção urinária e como auxiliar na eliminação de ácido úrico. As raízes são também utilizadas em afecções hepáticas e os frutos, as sementes e as folhas em diabetes, para dor nos rins, bexiga, dificuldades em urinar, pedra nos rins e como diurético.

Extratos aquosos da parte foliar, mostraram efeito hipoglicemiante, ação antibacteriana, antiespasmódica e anticancerígena além de ação antihepatotóxica, hepatoprotetora e antioxidante. Em doses acima do normal pode apresentar ação abortiva e purgativa. Além disso sua administração promove relaxamento dos ureteres, que aliado a uma ação analgésica, facilita a descida dos cálculos, geralmente sem dor nem sangramento, aumentando também a filtração glomerular e a excreção de ácido úrico. Esses resultados justificam seu uso popular para tratamento das pedras nos rins (litíase renal) e, provavelmente, no reumatismo gotoso e outras afecções caracterizadas por taxas elevadas de ácido úrico.

A quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) suas flores são minúsculas, verde-amareladas, solitárias e dispostas na parte inferior dos ramos. Já os frutos são verdes e bem pequenos. O chá preparado com a planta tem sabor amargo. Por se tratar de uma planta rústica, seu cultivo é muito fácil. Ela se dá melhor em locais à meia-sombra, sem muita luz solar direta. Não é muito exigente quanto ao tipo de solo, mas é recomendável que este tenda mais para o arenoso do que para o argiloso. A planta responde bem à adubação orgânica e não suporta solo encharcado, por isso, no cultivo em vasos ou jardineiras é preciso ter muito cuidado com o excesso de água.

Diante da grande quantidade de efeitos provenientes de composições químicas presente na *Phyllanthus niruri*, torna-se necessário uma melhor distribuição de conhecimento dos efeitos provocados pela mesma, bem como a sua ação farmacológica. Com isso deve ser feito uso com cautela, podendo tornar-se um fator de risco como intoxicação, além de problemas como citotoxicidade, genotoxicidade e até mesmo teratogenicidade. Por essas razões, entende-se que é de grande importância verificar ação dos extratos aquoso de *Phyllanthus nirur*.

## 2.2 Sistemas teste

As plantas medicinais são utilizadas mundialmente para o tratamento de doenças, e a maioria delas não foi suficientemente estudada, em relação ao seu potencial citotóxico/mutagênico, o qual pode ser monitorado pelo uso do sistema teste de *Allium cepa*. (SILVA et al., 2003). No Brasil, o uso de extratos vegetais brutos, infusões ou emplastros é uma prática muito difundida no tratamento de patologias (BIGHETTI et al, 2005;. MARLIÈRE et al, 2008;. VEIGA-JUNIOR, 2008). No entanto, seu uso inadequado e não controlado pode causar mais danos do que benefícios para a saúde humana (AMORIM et al, 2007;.. LANINI et al, 2009).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, cerca de 60-80% da população mundial nos países em desenvolvimento, devido à pobreza e falta de acesso à medicina tradicional, dependem essencialmente de plantas para cuidar de sua saúde. Entretanto, mesmo a diversidade genética vegetal mundial sendo bastante expressiva, poucas espécies (15 a 17%) têm sido cientificamente estudadas para a avaliação de suas qualidades, segurança e eficácia (SIMÕES et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2003; CALIXTO, 2005; Soares et al., 2006). Vicentini et al. (2001), relataram que os chás e infusões de plantas medicinais podem conter substâncias tóxicas com efeitos mutagênicos.

Estudos relativos à toxicidade e mutagenicidade de plantas medicinais são necessários para verificar a eficácia e segurança da sua utilização no tratamento de algumas doenças (MACEDO et al, 2008; FERREIRA et al, 2009). Neste contexto, as células meristemáticas de *A. cepa* são frequentemente utilizadas como um sistema de teste vegetal para indicar o potencial genotóxico dos extratos de plantas medicinais. Além disso, este sistema pode ser útil para avaliar a atividade mutagênica de fármacos específicos, devido à sua sensibilidade e a sua relação com o sistema de teste de mamífero (GRANT, 1978; FISKESJO, 1993; GRISOLIA e TAKAHASHI, 1990;

GROVER et al, 1990;. CLASSE & NILSEN, 1997; CARVALHO et al, 1999;. BAGATINI et al, 2007).

O método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *A. cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999).

Sistemas testes vegetais como o de *Vicia faba*, e principalmente o de *Allium cepa*, têm sido utilizados para o estudo dos efeitos de extratos vegetais, visando a detecção de genotoxicidade (TEIXEIRA et al., 2003; FACHINETTO et al., 2007). Esses sistemas também têm importância no monitoramento da poluição ambiental e avaliação do potencial mutagênico de muitos compostos químicos (Ma et al., 1995).

O número de evidências relatando os efeitos biológicos dos extratos de plantas está constantemente aumentando. A composição desses extratos naturais inclui componentes químicos com atividades mutagênicas, teratogênicas e/ou carcinogênicas. Se os componentes genotóxicos estão presentes, eles podem intercalar-se com a molécula de DNA levando a danos genéticos em regiões de fundamental importância para o controle do ciclo celular e apoptose, acelerando o processo neoplásico. Dessa forma, é muito importante a inclusão da abordagem genotóxica em avaliações toxicológicas dos compostos terapêuticos (SANTOS et al., 2008).

Devido ao intenso uso de plantas medicinais, estudos de toxicidade e mutagenicidade são necessários por contribuírem para sua utilização segura e eficaz. O índice mitótico e índice de replicação são usados como indicadores de proliferação adequada das células (GADANO et al., 2002), o que pode ser medido através do sistema teste vegetal de *Allium cepa*.

### **3 MATERIAIS E METODOS**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Vegetal e Animal do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Município de Picos, Estado do Piauí.

#### **3.1 Coleta da planta**

Amostras de *P. niruri* foram coletadas em um horto medicinal localizado na cidade de Teresina, Estado do Piauí, no mês de maio de 2012 e identificadas pela Prof<sup>a</sup> Maria do Socorro Meireles de Deus, mestre em botânica e docente da UFPI. Em seguida as folhas destas amostras foram armazenadas, em condições ambientais, por 06 meses.

#### **3.2 Preparo das infusões**

Folhas secas de quebra-pedras foram colocadas em água fervente onde permaneceram em infusão por 10 minutos. Após este tempo, os extratos aquosos foram coados e colocados para esfriar a temperatura ambiente. Estabeleceu-se 04 concentrações, 0.02; 0.04; 0.06 e 0.08mg/ml, sendo a de 0.02mg/ml considerada usual e a recomendada pelo Centro de Informações sobre Medicamentos a Base de Plantas Medicinais e Tóxicas (CIMPLAMT) (2012).

#### **3.3 Obtenção de células meristemática para a análise citogenética**

Os bulbos de *A. cepa* foram colocados para enraizar em frascos com água destilada, à temperatura de 25°C e aerados constantemente, até a obtenção de raízes com cerca de 1,0cm de comprimento. Para análise de cada concentração estipulou-se um grupo experimental com cinco bulbos de cebolas.

Antes de se colocar as raízes em contato com as suas respectivas concentrações, algumas raízes foram coletadas e fixadas para servirem de controle (CO) do próprio bulbo. Em seguida, as raízes restantes foram colocadas em suas respectivas concentrações, por 24 horas, procedimento este denominado de tempo de exposição 24 horas (TE 24h).

Após este tempo foram retiradas algumas raízes e fixadas. Feito este procedimento, as raízes restantes de cada bulbo foram devolvidas as suas respectivas concentrações onde permaneceram por mais 24 horas, o que se denominou de tempo de exposição 48 horas (TE 48h). Após este período, raízes novamente foram coletadas e fixadas. Os tempos de exposição de 24 e 48h foram escolhidos com o intuito de se avaliar a ação das concentrações estudadas em mais de um ciclo celular.

A fixação das raízes se deu em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético), a temperatura ambiente, por 24 horas. Para cada coleta de raiz, retirou-se, em média, três raízes por bulbo de cebola.

### **3.4 Preparo e leitura das lâminas, e análise dos dados.**

As lâminas, em média 03 por bulbo, foram feitas seguindo o protocolo proposto por Guerra & Souza (2002). Cada lâmina foi corada com duas gotas deorceína acética a 2% (Fachinetto & Tedesco, 2009) e analisada em microscópio óptico, em objetiva de 40X. Para cada bulbo analisou-se 1.000 células, totalizando 5.000 células para cada controle e concentração. Durante a análise observou-se células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. Foi calculado o número de células em intérfase e em divisão de cada controle e tempos de exposições e determinado o índice mitótico.

Também foi avaliada a presença de aberrações celulares como anomalias do ciclo mitótico (metáfases colchícnicas, pontes anáfasicas e pontes telofásicas) e anomalias interfásicas (células micronucleadas e células binucleadas). Para esta avaliação analisou-se 1.000 células de cada controle e tempo de exposição.

A análise estatística de todos os dados foi realizada pelo teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), com nível de probabilidade  $<0.05$ , por meio do software estatístico BioEstat 3.0 (AYRES, 2007).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, é apresentado o número de células em intérfase e em diferentes fases da divisão celular, e os valores de índice mitóticos obtidos de células meristemáticas de raízes de *A. cepa* tratadas com água e com diferentes concentrações de *P. niruri*, nos tempos de exposição de 24 e 48 horas.

**Tabela 01** – Número de células em intérfase e em diferentes fases da divisão celular, total de células analisadas no ciclo celular de pontas de raízes de *A. cepa* tratadas com água e com os extratos aquosos das folhas de *P. niruri* nas concentrações de 0.02; 0.04; 0.06; 0.08mg/ml, nos tempos de exposição 24 e 48 horas.

Concentração (mg/ml)	TE	Total de células analisadas	Células em Intérfase	P	M	A	T	Total de Células em Divisão	IM(%)
0,02	CO	5.000	4200	272	217	223	288	1.000	20,0 a
	24h	5.000	4413	156	178	134	119	587	11,7 b
	48h	5.000	4530	98	139	122	111	470	9,4b
0,04	CO	5.000	3878	291	259	279	193	1.022	20,4 a
	24h	5.000	4440	97	167	151	145	560	11,5b
	48h	5.000	4484	93	131	147	145	516	10,5b
0,06	CO	5.000	4237	287	201	296	179	963	19,26 a
	24h	5.000	4474	123	141	159	103	526	10,5b
	48h	5.000	4641	102	174	84	98	358	9,2b
0,08	CO	5.000	4120	274	278	294	204	1050	21,0 a
	24h	5.000	4151	129	117	151	187	584	11,7 b
	48h	5.000	4439	138	175	121	127	561	11,5b

TE – Tempo de exposição; CO – controle; P - prófase, M - metáfase, A - anáfase, T - telófase, IM – Índice Mitótico.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste do  $\chi^2$ .

A partir dos resultados obtidos verificou-se que as quatro concentrações testadas de *P. niruri* inibiram significativamente o IM das células meristemáticas de raízes de *A. cepa* nos dois TE quando comparado com o IM dos seus respectivos controles. Como pode ser observada, em todas as concentrações, este inibição se acentuou conforme o aumento do tempo de exposição. No entanto quando comparados os IM entre os TE de uma mesma concentração verificou-se que os mesmos não foram diferentes estatisticamente significativos.

Na Tabela 2, é apresentado o número de metáfases colchícinicas, pontes anáfasicas e telofásicas, micronúcleos, e o total de aberrações celulares presentes nas

células meristemáticas de raízes de *A. cepa* tratadas com água e com diferentes concentrações de *P. niruri*, nos tempos de exposição de 24 e 48 horas.

**Tabela 02** - Número de metáfases colchícnicas, pontes anáfasicas e telofásicas, células micronucleadas e total de aberrações celulares encontradas em cada controle e nas concentrações de 0.02; 0.04; 0.06 e 0.08mg/ml de extratos aquosos de *P. niruri*, nos tempos de exposição 24 e 48 horas.

Concentração (mg/ml)	TE	Total de células analisadas	Metáfases colchícnicas	Pontes metafásicas e telofásicas	Micronúcleos	Total de células aberrantes
0,02	CO	1.000	00	00	00	00a
	24h	1.000	03	03	21	27b
	48h	1.000	06	04	19	29b
0,04	CO	1.000	00	00	00	00a
	24h	1.000	01	02	20	23b
	48h	1.000	04	03	21	28b
0,06	CO	1.000	0	00	00	00a
	24h	1.000	04	05	13	22b
	48h	1.000	09	08	14	31b
0,08	CO	1.000	00	00	00	00a
	24h	1.000	03	02	20	25b
	48h	1.000	03	03	26	32b

TE Tempo de Exposição; CO – controle.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste do  $\chi^2$ .

Nos dois TE avaliados das quatro concentrações verificou-se a presença de metáfases colchícnicas, pontes anáfasicas, pontes telofásicas e micronúcleos. Todas as concentrações induziram um número de aberrações celulares que diferiu significativamente dos seus respectivos CO, porém não diferiram entre si.

Os resultados de citotoxicidade obtidos aqui corroboram com os observados por Barros et al. (2003), que avaliaram a medula óssea de ratos Wistar tratados via gavagem com extratos alcoólicos de folhas de quebra-pedra, na dose de 300mg/ml e em tratamento crônico, e verificaram que esta planta diminuiu o índice de divisão celular das células da medula destes animais, mostrando-se citotóxica. No entanto, Asare et al. (2012) avaliaram por noventa dias a ação de extratos alcoólicos de *P. niruri* em sague periférico de camundongos, nas doses de 30 e 300mg/ml e verificaram que os extratos não foram citotóxicos e nem mutagênicos nestes animais. Não foram encontrados na literatura científica outros estudos de avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade de

extratos de *P. niruri* em sistemas-testes com células normais, ou seja, sem nenhum tratamento prévio com drogas clastogênicas ou com algum distúrbio na divisão celular.

Dessa forma, levando-se em consideração os resultados obtidos neste trabalho onde os extrato aquoso de *P. niruri* tiveram ação antiproliferativa e genotóxica, pelos poucos estudos feitos até o momento sobre efeitos tóxicos em nível celular desta planta, considerando que o senso comum quase sempre considera as plantas medicinais isentas de reações adversas ao organismo, fazendo, muitas vezes, o uso indiscriminado das mesmas, e que a planta *P. niruri* é facilmente encontrada em hortos medicinais, ervanários, lojas de produtos naturais e feiras, torna-se de grande relevância realizar trabalhos semelhantes a este com *A. cepa*, com outros sistemas testes, diferentes tempos de exposição e diferentes tratamentos para assim se estabelecer com propriedade quais as concentrações ideais e seguras de utilização desta planta.



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABDULLA MA, AHMED KAA, AL-BAYATY FH, MASOOD Y. Gastroprotective effect of phyllanthus niruri leaf extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *J Pharm Pharmacol* 4: 226–230, 2010
- ASARE GA, ADDO P, BUGYEI K, GYAN B, ADJEI S, OTU-NYARKO LS, WIREDU EK, NYARKO A.. Acute toxicity studies of aqueous leaf extract of *Phyllanthus niruri*. *Interdiscip Toxicol* 4: 206-10. doi: 10.2478/v10102-011-0031-9, 2011.
- ASARE GA, BUGYEI K, SITTIE A, YAHAYA ES, GYAN B, ADJEI S, ADDO P, WIREDU EK, ADJEI DN, NYARKO AK. Genotoxicity, cytotoxicity and toxicological evaluation of whole plant extracts of the medicinal plant *Phyllanthus niruri* (Phyllanthaceae). *Genet Mol* 11: 100-111. doi: 10.4238/2012.January.13.3, 2012.
- ÁLVAREZ AL, DIÑEIRO Y, DEL BARRIO G, PICINELLI A, SUÁREZ B, VALDÉS S. Bioactivity-guided separation of anti HSV-2 and antioxidant metabolites from the plant *Phyllanthus orbicularis*. *Planta Med* 75: 990-99, 2009.
- AYRES M. *BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Brasília CNPq, 2007.
- BAGATINI MD, SILVA ACF, TEDESCO SB. Uso do sistema-teste *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Revista Bras Farmacogn* 18: 509-516, 2007.
- BARROS ME, LIMA R, MERCURI LP, MATOS JR, SCHOR N, BOIM MA. Effect of Extract of *Phyllanthus niruri* on crystal deposition in experimental urolithiasis. *Urol Res*. 34:351–357, 2006.
- CARITÁ R, MARIN-MORALES MA. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere* 72: 722-725, 2008.
- CIMPLAMT – Boletim informativo do Centro de Informações sobre Medicamentos a base de Plantas medicinais e Tóxicas. Boletim Informativo. São João Del Rei: Universidade Federal de São João Del Rei, 2012.
- DEVI V, SHANBHAG TV, BAIRY KL, SHENOY S. Effect of *Phyllanthus niruri* on wound healing in rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 49: 487–490, 2005.
- FACHINETTO JM, BAGATINI MD, DURIGON ACFS, TEDESCO SB. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo de celular de *Allium cepa*. *Revista Bras Farmacogn* 17: 49-54, 2007
- FACHINETTO JM, TEDESCO SB. 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 11: 360-367,2009.

FRESCURA, VD, LAUGHINGHOUSE IV, TEDESCO SB. Antiproliferative effect of the tree and medicinal species *Luehea divaricata* on the *Allium Cepa* cell cycle. Caryologia 65: 27-33, 2012.

GERAS`KIN S, OUDALOVA A, MICHALIK B, DIKAREVA N, DIKAREV. Genotoxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas, Poland by means *Allium* test. Chemosphere 83: 1133-1146, 2011.

GRANT WF. Chromosome aberration assays in *Allium*. Mut Res 99: 273-291, 1999.

GUERRA M, SOUZA MJ. Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002.

HERRERO O, PEREZ JMM, FERNÁNDEZ PF. Toxicological evaluation of three contaminant of emerging concern by use of *Allium cepa* test. Mut. Res 743: 24-34, 2012

IGANCI JRV, BROBOWSKI G, HEIDEN GVC, Stein L, Rocha BHG. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação índice mitótico de *Allium cepa* L. Arq Inst Biol 73: 79-82, 2006.

LEME DM, MARIN-MORALES MA. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. Mut Res 650: 80-86,2008.

MATSUMOTO ST, MANTOVANI MS, MALAGUTTI MIA, DIAS AL, FONSECA IC, MARIN-MORALES MA. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberration in onion root-tips. Genet Mol Biol 29: 148-58, 2006.

MEYER L, QUADROS KE, ZENI ALLB. Etnobotânica na comunidade de Santa Bárbara Acurra, Santa Catarina, Brasil. Rev Bras Bioc 10: 258-266, 2011.

MOREIRA J, KLEIN-JÚNIOR LC, CECHINEL FILHO V, DE CAMPOS BUZZI F. Anti-hyperalgesic activity of corilagin, a tannin isolated from *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). J Ethnopharmacol 146: 318-23. doi: 10.1016/j.jep.2012.12.052.  
Murugaiyah V, Chan KL 2009. Mechanisms of antihyperuricemic effect of *phyllanthus niruri* and its lignan constituents. J Ethnopharmacol 124: 233–239, 2013.

NASCIMENTO-BARROS FR, ALBUQUERQUE IL. Substâncias e medicamentos abortivos utilizados por adolescentes em unidade secundária de saúde. RBPS 18: 177-184, 2012.

NUNES EA, LEMOS CT, GAVKONSKI L, MOREIRA TN, OLIVEIRA NC, SILVA J. Genotoxic assessmernt on river water using diferent biological systems. Chemophere 84: 47-53, 2011

SABINI MC, CARIDDI LN, ESCOBARA FM, BACHETTI RA, SUTIL SB, CONTIGIANI MS, ZANON SM, SABINI LI. Evaluation of cytogenotoxic effects of cold aqueous extract from *Achyrocline satureioides* by *Allium cepa* L test. *Nat Prod Commun* 6: 995-998, 2011.

TABREZ S, SHAKIL S, UROOJ M, DAMANHORI GA, ABUZENADAH AM, AHMAD M. Genotoxicity testing and biomarker studies on surface water: an over view of the techniques and their efficacies. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 29(3): 250-75, 2011.

TEXEIRA RO, CAMPAROTO ML, MANTOVANI MS, VICENTINI VEP. Assessment of two medicinal plants, *Psidium grejava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *in vivo* assays. *Genet Mol Biol*, 26: 551-555, 2003.

THAKUR I, DEVI PV, BIGONIYA P. Protection against radiation clastogenecity in morrow by *Phyllanthus niruri*. *Indian J Exp Biol.* 49(9): 704-710,2011.

THIPPESWAMY AH, SHIRODKAR A, KOTI BC, SADIQ AJ, PRAVEEN DM, SWAMY AH, PATIL M. Protective role of *Phyllanthus niruri* extract in doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats. *Indian J Pharmacol.* 43(01): 31-35, 2011