



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS – CSHNB
CURSO: LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICA

ALECSANDRA MOREIRA FERREIRA DE SOUSA

AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DA AGUARDENTE ALEMÃ
EM MODELO ANIMAL (*mus musculus*)

PICOS

2016

ALECSANDRA MOREIRA FERREIRA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DA AGUARDENTE ALEMÃ
EM MODELO ANIMAL (*Swiss*)**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção de graduação no curso de licenciatura plena em ciências biológicas

Orientador: Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva

PICOS

2016

FICHA CATALOGRÁFICA**Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí****Biblioteca José Albano de Macêdo****S725a** Sousa, Alecsandra Moreira Ferreira de.

Avaliação citotóxica e mutagênica da aguardente alemã em modelo animal (*mus musculus*) / Alecsandra Moreira Ferreira de Sousa.– 2016.

CD-ROM : il.; 4 ¾ pol. (28 f.)

Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí, Picos, 2018.

Orientador(A): Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva

1. Citotoxicidade. 2. Mutagenicidade. 3. *Operculina alata*, 4. Aguardente Alemã. I. Título.

CDD 571.6

ALECSANDRA MOREIRA FERREIRA DE SOUSA

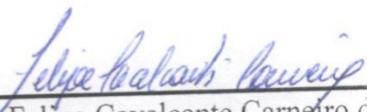
**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DA AGUARDENTE ALEMA EM
MODELO ANIMAL (*Mus musculus*).**

Trabalho de conclusão de curso de
graduação apresentado à Universidade
Federal do Piauí, como requisito para
obtenção de graduação no curso de
licenciatura plena em ciências biológicas

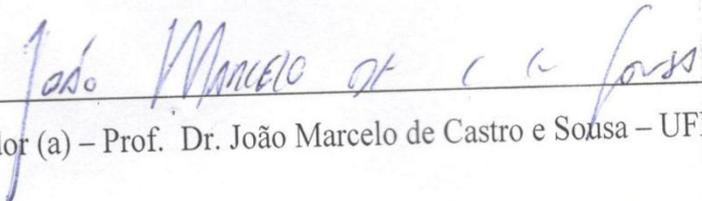
Orientador (a): Dr. Felipe Cavalcanti
Carneiro da Silva

Aprovado em: ___/___/___

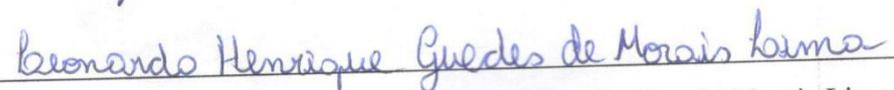
Banca Examinadora:



Presidente – Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva - UFPI



Examinador (a) – Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa – UFPI



Examinador (a) – Prof^ª. Dr Leonardo Henrique Guedes de Morais Lima - UFPI

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde e coragem e por me conceder a graça de estar concluindo esse curso onde nos momentos mais difíceis na minha trajetória me deu forças para não deixar me abater e desistir diante das dificuldades;

Aos meus pais Leila e Antônio (in memoriam) apesar de não estarem comigo nesse momento sempre que me apoiaram me nos meus estudos, me incentivando na minha trajetória. Vocês sempre foram meus exemplos de vida e de pessoas a serem seguidas.

A minha querida irmã Leidiane e meu cunhado André. Leidiane minha irmã mais velha, tão dedicada e persistente, sempre com o seu coração bondoso para ajudar a quem precisa, e por ter me acompanhado desde a minha infância. Obrigado pela convivência e por fazer parte da minha vida. André, meu cunhado e irmão. Melhor cunhado que você não vai existir. Obrigada por fazer parte da minha família, pelo incentivo, apoio incondicional e sempre me apoiar.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram, me incentivando sempre a não desistir

Aos meus filhos Asheley Kelly e Victor Otavio por serem os alicerces necessário para eu olhar para o futuro querendo me tornar uma pessoa cada vez melhor

Ao meu orientar Drº Felipe Cavalcante pela paciência, o conhecimento repassado durante todo o curso e pelas orientações no meu trabalho;

Ao Prof. João Marcelo por fazer as estatísticas do meu trabalho;

Ao meu colega de laboratório Ataíde foram muitas horas de conhecimento e de diversão no laboratório;

Ao meu amigo Victor pelos conhecimentos repassados sobre as técnicas no laboratório e por me acolher na sua casa durante esse período;

A dona Maria Jose por cuidar dos meus filhos pra eu poder concluir meus estudos

A todos os professores que fizeram parte da minha vida acadêmica por me proporcionarem conhecimento para que pudesse crescer cada dia mais;

Aos meus colegas de trabalho pelos incentivos nas adversidades enfrentadas durante essa trajetória

Agradeço ainda a todos aqueles que estiveram torcendo por mim para que eu obtivesse a primeira das muitas conquistas em minha vida.

DEDICATÓRIA

*Dedico esse singelo trabalho á aqueles que
me deram a vida Antônio e Leila (in
memoriam).*

RESUMO

A tintura jalapa é um fitoterápico extraído da planta *Operculina alata* (Ham) Urban, pertencente à família Convolvulaceae composta por 51 gêneros de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do Brasil. Ela é conhecida popularmente por aguardente alemã e comumente utilizada como purgativa e laxativa, embora também seja utilizada no tratamento de estados congestivos e inflamatórios do aparelho respiratório, na amenorreia e nas lesões cerebrais de causas diversas. Devido a escassez de estudos relacionados a toxicidade desse fitoterápico, o presente estudo teve como objetivo verificar a citotoxicidade e mutagenicidade do fitoterápico em diferentes concentrações, avaliados através da razão eritrócitos policromáticos e eritrócitos totais e teste de micronúcleo em sangue periférico de camundongos swiss, respectivamente. Para o estudo em questão, foram utilizados controles positivo e negativo, além de 3 doses diferentes de 5µl, 10µl e 20µl de aguardente alemã (gavagem) conjugada com ciclofosfamida (50mg/kg), intra peritonalmente. Os resultados obtidos constataram que a aguardente alemã não foi citotóxica e atuou como antimutagenica, visto que ela atenuou os efeitos tóxicos do quimioterápico ciclofosfamida. Para pacientes em tratamento oncológico, o uso de aguardente alemã deve ser suspenso.

Palavras chaves: Citotoxicidade, Mutagenicidade, *Operculina alata*, Aguardente alemã.

ABSTRACT

The jalapa dye is extracted from herbal plant *Operculina alata* (Ham) Urban, belonging to the Convolvulaceae family of 51 genera widely distributed in tropical and subtropical regions of Brazil. It is popularly known as Aguardente Alemã and commonly used as purgative and laxative, although it is also used in the treatment of congestive and inflammatory conditions of the respiratory tract, in amenorrhea and in brain lesions of various causes. Due to lack of studies related to toxicity of this herbal medicine, this study aimed to determine the cytotoxicity and mutagenicity of herbal medicines in different concentrations, measured by the ratio of polychromatic erythrocytes and total erythrocytes and micronucleus test in peripheral blood of Swiss mice, respectively. For the present study, we used positive and negative controls and additionally 3 different doses of 5µl, 10µl and 20µl of German brandy (gavage) combined with cyclophosphamide (50 mg / kg). The results verified that the Aguardente Alemã was not cytotoxic and served as antimutagenic, since it attenuate the toxic effects of chemotherapy cyclophosphamide. For patients undergoing cancer treatment, the use of Aguardente Alemã shall be suspended.

Palavras chaves: Citotoxicidade, Mutagenicidade, *Operculina alata*, Aguardente alemã.

LISTA DE ABREVIACÕES

CN: controle negativo

CP: controle positivo

EHA: estrato hidro alcoólico

ENC: eritrócito normocromático

EPCMN: eritrócitos policromáticos micronucleados

EPC: eritrócito policromático

MN: micronúcleo

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1:Análise de presença de micronúcleo nos diferentes tratamentos /Análise da frequência EPC/ENC nos respectivos tratamentos

Sumário

1 INTRODUÇÃO	111
2 REFERENCIAL TEÓRICO	122
2.1 PLANTAS MEDICINAIS	122
2.2 AGUARDENTE	123
2.3 TESTES DO MICRONÚCLEO.....	144
• 3 OBJETIVOS	177
• 3.1 OBJETIVO GERAL	177
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	177
4 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAL	188
4.1 OBTENÇÃO DAS DOSAGENS DO TRATAMENTO.....	188
4.2 ANÁLISE DE MUTAGENICIDADE ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM SANGUE PERIFÉRICO.....	19
4.3 COLORAÇÕES DAS LÂMINAS	19
4.4 LEITURAS DAS LÂMINAS	19
4.5 ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS / NORMOCROMÁTICOS. (CITOTOXICIDADE)	20
5 RESULTADOS	21
5.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA AGUARDENTE ALEMÃ:	211
5.2 AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE DA AGUARDENTE ALEMÃ:	222
6 DISCUSSÃO	233
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	255
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA:	266
TERMO DE AUTORIZAÇÃO.....	29

1. INTRODUÇÃO

O uso de medicamentos fitoterápicos vem desde a antiguidade, surgindo com a necessidade humana de curar enfermidades (Phillips; Gentry,1993). As plantas sempre foram empregadas como fonte comum de medicamentos e estima-se que mais de 80% da população mundial faz seu uso como fonte primária de produtos medicinais (Pintos et al 2002). Atualmente, a diferença entre plantas comestíveis e plantas que tem potencial terapêutico é melhor compreendida, mas todos os fitoterápicos devem ser avaliados sob diversos aspectos, tais como eficácia, qualidade e segurança, o que inclui o potencial citotóxico e mutagênico.

Com o desenvolvimento da química a partir do século XIX, a fitoterapia teve um grande avanço científico, onde os estudos começaram a analisar, identificar e separar os princípios ativos das plantas, ocasionando um grande avanço na área medica (SANTOS 2009). Atualmente, sabe-se que o uso desses fitoterápicos vem crescendo muito, preocupando os governantes, onde a população acredita que por se tratar de uma medicação natural, não produza malefícios a sua saúde (SANTOS 2009)

No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação desses medicamentos é a Agencia Nacional de Vigilância em Saúde (Anvisa) que tem como papel proteger a saúde da população garantindo a segurança sanitária de serviços e produtos através da sua adequação aos registros de saúde.

A tintura jalapa, conhecida popularmente por aguardente alemã foi introduzida na terapêutica por Cadet (Goncalves,2003). A jalapa é empregada como laxante, suas preparações farmacêuticas são o pó, a resina e a tintura obtidos a partir da droga seca. Além disso, sua ação purgativa vem sendo comumente usada no tratamento de estados congestivos e inflamatórios do aparelho respiratório, amenorreia e nas lesões cerebrais de causas diversas (Cruz,1980).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais

A história dos fitoterápicos é bem antiga, pois desde o início dos tempos o homem procurou curar suas enfermidades (Philippe; Gentry,1993). O uso das plantas medicinais pelos povos antigos também era muito relacionado com seu culto aos deuses. Muitas vezes, a sua utilização estava atribuída a uma intervenção divina e era comum as pessoas utilizarem as plantas para fazer rituais religiosos (Goff,1997).

Segundo Luz e colaboradores (2012) há milhares de anos o homem utiliza os recursos vegetais com fins terapêuticos (Luz et al. 2012). As propriedades curativas das plantas se tornaram parte da cultura popular através da observação e experimentação pelos povos (Ko,1999)

As primeiras testemunhas do uso das plantas na medicina foram os papiros egípcios, os escritos chineses nas folhas de bambu e as taboas de argila dos Sumérios. No papiro de Ebers, de 1550 a. C., descoberto em meados do século passado, em Luxor, no Egito, foi mencionado cerca de 700 drogas diferentes, incluindo extratos de plantas, metais (chumbo e cobre) e veneno de animais.

Na Grécia antiga, as plantas e seu valor terapêutico ou tóxico eram bastante conhecidos. Os gregos costumavam cultivar plantas medicinais em seus jardins e hortas. Hipócrates (470-377 a.C.) pai da medicina reuniu em sua obra *corpus hipocraticum* conhecimento médico de seu tempo indicando para cada enfermidade o remédio vegetal e o tratamento adequado. As plantas com propriedades medicinais eram prioridades em suas prescrições (Martins et al ,2000).

A partir do início da sintetização de substâncias de estrutura química definida e de ação farmacológica iniciou a Fitoterapia um ciclo declinante, com a diminuição da prescrição médica de produtos vegetais. As plantas medicinais foram praticamente esquecidas, cedendo lugar às sintéticas. Tal fase percorre o início da década de 50 até o final dos anos 70 (Rates,2001;Reis,2009). Os grandes centros de pesquisas em todo mundo direcionaram, com o vivo entusiasmo, vultosos recursos, tanto governamentais como de iniciativa privada, para a pesquisa de propriedades curativas das plantas medicinais. Multiplicaram-se na imprensa informações sobre as vantagens da farmacobotânica. Tal movimento naturalmente acompanhado pelo surgimento de um

Número expressivo de estabelecimentos comerciais especializada

Lima e colaboradores (2013) Fala que as plantas medicinais representam opção terapêutica de grande importância para a manutenção das condições de saúde das pessoas, especialmente para a população de baixa renda (Lima et al. 2013). A diferença entre planta medicinal e produto fitoterápico reside no fato de que para ser considerado fitoterápico deve ser elaborada uma formulação específica da planta medicinal (RDC N°48 de 16-03-04 – ANVISA).

Atualmente o uso dos fitoterápicos vem crescendo bastante, estima-se que cerca de 60% dos fármacos antitumorais que já estão sendo comercializados ou que estão em fase de pesquisas clinica sejam de originados de plantas (Shu,1998).

Segundo Pereira e colaboradores (2014), estudos recentes mostram que substâncias presentes em preparações medicinais podem causar efeitos tóxicos, como danos no DNA, devido à sua cito toxicidade, mutagenicidade e propriedades carcinogênicas (Pereira et al. 2014). A avaliação dos danos causados são de extrema importância para minimizar os riscos destes agentes, principalmente em tratamentos em longo prazo. (Sisenando et al., 2009)

2.2 Aguardente

A *Operculina* sp. é uma planta pertencente à família Convolvulaceae, que é composta por 51 gêneros e 1800 espécies com distribuição principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil é encontrada em vários estados recebendo assim diversos sinônimos populares, dentre os mais citados na literatura estão: Jalapa-do-Brasil, Batata-de-Purga, Ipu, Purga de Amaro Leite, Briônia da América, Jalapa de São Paulo, Escamonéia da América, Xalapa (Gonçalves,2003; Gonçalves,2007). Apresenta duas espécies principais, ambas trepadeiras de raízes tuberosas e que recebem o nome popular de jalapa popular (Goncalves ,2003). A batata de purga ou jalapa brasileira é empregada como laxante. Suas preparações farmacêuticas são o pó, a resina e a tintura, obtidos a partir da droga seca, que é comercializada como aparas de batata (Matos,2000). Além de sua ação purgativa, a jalapa brasileira vem sendo usada, embora sem comprovação científica, no tratamento de estados congestivos e inflamatórios do aparelho respiratório, na amenorreia e nas lesões cerebrais de causas diversas (Cruz,1980).

A jalapa exerce sua ação purgativa no intestino delgado, aumentando o peristaltismo e facilitando a evacuação, podendo ser classificado como um laxante estimulante drástico. Esta ação é devido ao elevado teor de resinas presentes no tubérculo, tendo na sua constituição glicosídeos, os quais na presença da bile, hidrolisam-se em açúcar e glicina, liberando o ácido graxo livre correspondente. Os ácidos graxos livres irritam a mucosa intestinal aumentando o peristaltismo e facilitando a evacuação (Teske, Trentiini,1997).

Segundo Pontes e colaboradores, a espécie *Operculina alata* é conhecida popularmente como “batata-de-purga”; também é utilizada na medicina popular no tratamento de bronquite, hemorragia, hipertensão, inflamações e em distúrbios do trato gastrintestinal no tratamento da constipação e inapetência devido a sua propriedade laxante (Pontes et al. 2012).

A grande utilização da jalapa levou a inclusão na primeira e segunda edição da farmacopeia brasileira (Brandao ET al,2008). Seu uso em doses maiores que a indicada, especialmente da resina, podem causar grave intoxicação. Seu uso é contra indicado sempre que houver sinais de inflamação no intestino ou outros órgãos abdominais (Matos,2000). Comercialmente, a Jalapa-do-Brasil (Aguardente alemã®) é explorada na forma de tintura por sua atividade laxante através do laboratório SOBRAL-PI (Santos ,2009; Gonçalves, 2003; Gonçalves,2007). Percebe-se que existe uma profunda carência de estudos farmacológicos e toxicológicos em relação a *Operculina alata*, apesar da sua ampla comercialização como fitoterápico. Nesse sentido, pareceu-nos atraente avaliar sua possível atividade tóxica, na forma de extrato hidro alcoólico (EHA) a nível celular.

2.3 Testes do micronúcleo

O teste do micronúcleo é o ensaio, in vivo, mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial. Este teste foi desenvolvido de início, em eritrócitos de medula óssea de camundongos, mas é também realizado em ratos (Neto Almeida 2005).

Segundo Pereira e colaboradores (2014), o método do micronúcleo baseia-se na análise da frequência de danos ocorridos ao DNA, os quais são resultantes de mitoses

ou meioses celulares que em contato com agentes clastogênicos e aneugênicos, podem gerar a perda de fragmentos ou de cromossomos inteiros, formando assim os micronúcleos (PEREIRA ET AL. 2014). A análise da relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos fornece o indicativo do extrato estar diminuindo a produção de novos eritrócitos (policromáticos). Se isto ocorrer, a droga poderá ser considerada citotóxica. (Fernandes et al 2011)

O termo micronúcleo foi sugerido por Boller *ET al.* em 1970, designando corpos cromáticos com diâmetro menor que 1/3 do diâmetro do núcleo celular, produzidos ao longo da anáfase devido aos defeitos nos centrômeros ou fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros perdidos em função de danos recentemente induzidos. (Araldi, 2013).

O procedimento original foi desenvolvido por Schmid e colaboradores em 1971 e subsequente, modificado por Hendle (Neto Almeida 2005, Araldi et al 2013). Agentes clastogênicos ou que interfere na formação de fusos mitóticos alterando a distribuição dos cromossomos durante a divisão celular podem ser detectados pelos testes de micronúcleo (Queiroga, 2011).

Segundo ainda Queiroga (2011) o micronúcleo se constitui de uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Os micronúcleos são formados durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envelope e reconstituído ao redor dos cromossomos da célula filha. Este teste detecta alterações genômicas ou/e dano ao aparato mitótico, sendo os micronúcleos indicativos de perdas irreversíveis de DNA. (Valadares et al, 2007) e amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais como parte da bateria de testes recomendada para se estabelecer a avaliação e o registro de novos agentes químicos e farmacêuticos que entram no mercado mundial, utilizado também para avaliar compostos mutagênicos (Ribeiro et al ,2003; Choy,2001).

O teste de micronúcleo é uma das ferramentas amplamente utilizadas para a pesquisa e aferição da segurança de inúmeras substâncias, classificando-as ou não como genotóxicas/mutagênicas e fornecendo resultados com forte suporte estatístico (Albas ET al, 2014).

Araldi et al., 2013 também falam que o teste do micronúcleo consiste em uma importante técnica citogenética não invasiva que permite detectar mutações cromossômicas que são a chave para os eventos carcinogênicos.

Estudos de micronúcleo feitos com extratos de plantas mostrou que a mesma não possui genotoxicidade para *Ilex paraguariensis*(*erva mate*),Albas ET al. 2014;para o extrato das folhas da *Plantago major* não mostrou ação mutagênica mas a mesma provoca alterações na divisão celular(Luz ET al ,2012); *Pterogyne nitens* apresentou efeito antimutagenico(Ferreira ET al ,2009);Para análises feitas com folhas e inflorescências de *Erythrina mulungu* verificou-se que nas condições do estudo a mesma tem a capacidade de induzir danos ao DNA (De Bona ET al ,2012);para estudos com extrato etanólico de *Synadenium umbellatum (EESU)* evidenciou que a mesma possui efeito citotóxico e mutagênico necessitando de mais estudos para expandir sobre os conhecimentos toxicológico do EESU(Valadares ET al,2007); Observou-se que na dose usual, a solução de *Aloe vera* não foi mutagênciã para o sistema de teste vegetal e nem para o humano.

3 OBJETIVOS:

3.1 Objetivo geral

- Avaliar os efeitos citotóxicos e mutagênicos do consumo de aguardente alemã utilizando camundongos como modelo experimental

3.2 Objetivos específicos

- Verificar possibilidade de efeito dose-dependente de alterações moleculares ao nível de DNA;
- Verificar a frequência de micronúcleos nas células do sangue dos camundongos.

4. DELINEAMENTOS EXPERIMENTAL

- Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Vegetal e Animal do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros da Universidade Federal do Piauí, Município de Picos estado Do Piauí, no período de maio a julho do ano de 2014.

4.1 Obtenção das dosagens do tratamento

- O experimento foi desenvolvido em cinco grupos de camundongos Swiss, constituídos cada por cinco animais. Foram testadas três doses do fitoterápico com limite máximo de 20 µl para camundongo de peso corpóreo entre 25-30g e outras doses de 10µl e 5 µl. As doses foram baseadas na recomendação de consumo diário de 15ml para um indivíduo de 70kg.
- Os animais de cada grupo foram tratados com doses diárias do fitoterápico no tempo limite de 72hs, como descrito a seguir:
- Tratamento 1: foi administrado 0,2 ml de água destilada com 10µl de aguardente alemã para avaliar as taxas de toxicidade nas células dos camundongos.
- Tratamento 2, 3 e 4: Os camundongos foram tratados com 0,2 ml de ciclofosfamida na concentração de 50 mg/kg do animal. No tratamento 2 foi administrados 0,2 ml de ciclofosfamida associada com 5µl de aguardente alemã; no tratamento 3 foi administrados 0,2 ml de ciclofosfamida 10µl de aguardente alemã; no tratamento 4 foi administrado 0,2 ml de ciclofosfamida e 20 µl de aguardente alemã todos via oral, sendo os animais submetidos à eutanásia 72 horas após a aplicação. Cerca de 10µl de sangue da veia orbital foi coletado dos animais no tempo de 24, 48 e 72 horas para realização dos esfregaços do teste de micronúcleo.
- O tratamento 5 foi o grupo controle negativo, no qual foi administrado 0,2mL de água destilada via gavagem.

4.2 Análise de mutagenicidade através do Teste de Micronúcleo em sangue periférico.

Para a determinação da mutagenicidade, um total de 2.000 células foram analisados/animal (1000/lâmina), para o registro da frequência de MNPCs. As lâminas foram analisadas em teste cego, utilizando microscópio óptico com aumento de 1.000x.

Após administração da substância por via oral ou intraperitoneal, realizou-se a coleta de duas a três gotas de sangue periférico do animal, a partir da veia orbital, nos tempos de 24h, 48h e 72h após o tratamento com as respectivas substâncias envolvidas no experimento; onde foi feita a transferência das gotas de sangue para uma lâmina de microscopia e fez-se um esfregaço;

Com os esfregaços prontos deixa-se as lâminas secar no ar, onde serão fixadas em álcool 70% durante 10 minutos, após as lâminas estando secas serão coradas com Giemsa diluído 1:10 de tampão fosfato pH 6,8 durante 15 minutos; posteriormente lava-se as lâminas com água destilada para retirada do excesso de corante finalmente após as lâminas estarem secas as mesmas serão armazenadas em caixas apropriadas para posterior análise das mesmas. (Para cada animal serão observados 2000 eritrócitos por tempo de exposição, totalizando 4000 eritrócitos policromáticos por tratamento)

4.3 Colorações das Lâminas

A coloração das lâminas foi feita com o corante Giemsa diluído em solução tampão fosfato com PH 6,8, na proporção de 1:10, durante 15 minutos. Após a coloração, as lâminas foram lavadas com água destilada para remoção do excesso de corante e deixadas secar ao ar.

De acordo com Ribeiro et al (2003), a coloração serve para diferenciar eritrócito policromático (PCE) de eritrócito normocromático (NCE). Eritrócitos policromáticos (PCE) ou jovens se coram de azul claro e eritrócitos normocromáticos se coram de vermelho-telha.

4.4 Leituras das Lâminas

Para a leitura das lâminas serão realizados os seguintes procedimentos:

- Utilização de microscópio óptico com objetiva de aumento de 100 vezes;
- Contagem e análise de 1000 eritrócitos policromáticos (PCE) e apenas a contagem de eritrócitos normocromáticos (NCE) em 200 PCEs para cada esfregaço;
- A leitura do campo laminar foi feita em ziguezague;

4.5 Análise da relação entre eritrócitos policromáticos / normocromáticos.

(Citotoxicidade)

Nessa avaliação foram analisados 1000 eritrócitos do sangue periférico para cada tempo de coleta (24,48h e 72h), sendo estabelecido a relação entre o número de eritrócitos policromáticos/normocromáticos em 1000 células.

A análise da relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos pode fornecer indícios de que a substância está diminuindo a produção de novos eritrócitos (policromáticos). Se isso ocorrer, a droga poderá ser considerada citotóxica.

5 RESULTADOS:

5.1 Avaliação da citotoxicidade da aguardente alemã:

Para avaliação da citotoxicidade, foi utilizado o teste de giemsa, no qual verificou o percentual de eritrócitos normocromáticos e policromáticos. Os resultados mostram que a aguardente alemã não apresentou citotoxicidade quando administrada em doses de 10ul em relação ao controle negativo (água destilada). O uso combinado de ciclofosfamida com diferentes doses de aguardente alemã não foi capaz de atenuar os efeitos citotóxicos do CP, demonstrando nenhuma capacidade citoprotetora (Tabela 1). Além disso, verificou-se que a aguardente mesmo em diferentes doses, não foi citoprotetora.

Tabela 1 - Média e Desvio Padrão (DP) de Micronúcleos (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) do sangue de camundongos e a relação EPC/ENC (citotoxicidade) após os tempos de 24, 48 e 72hs com tratamento de aguardente alemã.

Tratamento	TE	Total de células	EPC/ENC	MN
CN	24hs	10.000	0,06 ± 0,01	4,8 ± 1,6
	48hs		0,06 ± 0,03	4,7 ± 1,6
	72hs		0,05 ± 0,01	3,2 ± 1,8
10µl	24hs	10.000	0,02 ± 0,01	4,1 ± 0,9 ^a
	48hs		0,05 ± 0,02 ^a	5,8 ± 4,1 ^a
	72hs		0,03 ± 0,02 ^a	5,7 ± 3,5 ^a
5µl + CP	24hs	10.000	0,01 ± 0,01*	3,6 ± 1,8 ^a
	48hs		0,03 ± 0,02	5,5 ± 3,5 ^a
	72hs		0,01 ± 0,02*	5,7 ± 3,5 ^a
10µl + CP	24hs	10.000	0,02 ± 0,01*	3,9 ± 0,9 ^a
	48hs		0,01 ± 0*	5,2 ± 2,8 ^a
	72hs		0,01 ± 0*	6,2 ± 2,1 ^a
20 µl + CP	24hs	10.000	0,02 ± 0,01*	3,1 ± 1,1 ^a
	48hs		0,01 ± 0*	2,9 ± 0,9 ^a
	72hs		0,01 ± 0*	8,9 ± 3,4*
CP	24hs	10.000	0,03 ± 0*	16,2 ± 3,8*
	48hs		0,01 ± 0*	16,8 ± 4,7*
	72hs		0,01 ± 0*	18,4 ± 4,6*

CN e CP: Controle Negativo e positivo. * Estatisticamente significante em relação ao CN para $p < 0,01$. a: Estatisticamente significante em relação ao CP para $p < 0,05$. RM- MANOVA com Pós Teste de Tukey.

Para as frequências obtidas no tempo de 24hrs de EPC/ENC observou-se uma diminuição em relação aos controles. Para os tempos de 48hrs e 72hrs nos tratamentos 10μ e de 20μ os resultados foram iguais entre si em relação ao CP.

5.2 Avaliação de genotoxicidade da aguardente alemã

Para avaliação da genotoxicidade, foi utilizado o teste de micronúcleo, no qual verificou o percentual de eritrócitos policromáticos que apresentaram formação de micronúcleo. Os resultados mostram que a aguardente alemã não foi genotóxica quando comparada ao CN. A Aguardente combinada com o CP nas 3 diferentes doses e nos 3 diferentes tempos de exposição, de 24, 48 e 72hs, reduziu os efeitos genotóxicos causados pelo CP (Tabela 1). Apresentando resultados semelhante ao CN.

6. DISCUSSÃO

Recentemente, apesar de várias drogas clássicas derivadas de plantas terem perdido muito espaço para os fármacos de origem sintética, outras têm aparecido e recebido atenção especial e prestígio terapêutico, evidenciando que fármacos derivados de plantas e fitoterápicos têm o mesmo valor fármaco- econômico (DE SMET, 1997).

Ainda que exista uma ampla variedade de compostos ativos de origem natural que possam ser futuramente relacionados como medicamentos, os desafios estão centrados principalmente em métodos farmacológicos apropriados e ensaios biológicos que possam prever uma certa eficácia clínica à substância em estudo (SERPELONE,2008; HOSTETTMAN; MARSTON; HOSTETTMAN, 1997).

No presente estudo, a ciclofosfamida, droga empregada no tratamento de uma série de neoplasias, artrites reumatóides e também usada como imunossupressora em casos de transplantes de órgãos, foi utilizada como controle-positivo. Em células somáticas, a ciclofosfamida produz micronúcleos em ratos, camundongos e hamsters chineses, principalmente por quebras cromossômicas (ANDERSON et al., 1995; SERPELONE ,2008). No presente estudo observou-se que a frequência de MN de grupos tratados com aguardente alemã é significativamente menor que a frequência observada no CP, resultando em uma menor frequência de MN.

A ciclofosfamida tem sido amplamente usada como um controle positivo em ensaios de micronúcleo em roedores (MAGALHAES ,2010) devido a capacidade de indução de EPCMN. Todavia a diminuição das frequências de EPCMN comparados com os respectivos controles sugere que a aguardente alemã não age como uma genotoxina, podendo inclusive possuir componentes que exercem um efeito antígenotóxico. O efeito genotóxico da aguardente alemã em sangue periférico em camundongos foi estudada pela primeira vez nesse trabalho. Os resultados indicam que os componentes da aguardente alemã não causam o aumento significativo no número médio de células de micronúcleo quando administrado em doses de 5 µl,10µl,20µl para animais com peso médio de 30g.

Gonçalves e colaboradores (2007) através do uso crônico do EHA de *Operculina alata* mostraram que não houve sinais de toxicidade aguda ou morte em ratos swiss , o estudo consistiu em avaliar a toxicidade aguda da aguardente alemã em ratos onde para o teste de toxicidade aguda foi utilizado o teste DL50 sendo administrado doses crescentes (0,625;1,25;2,5;5mg/kg)do estrato EHA avaliando a morte das ratas durante o período de 14 dias; para toxicidade crônica, foi utilizado doses de 25, 125,625 mg /kg em 40 ratas

divididas em 4 grupos por 90 dias , durante esse período foi observado a massa corpórea , comportamentos adversos , consumo de água e ração a fim de detectar sinais clínicos de toxicidade. No estudo para toxicidade aguda não foi possível avaliar a DL50 pois não houve morte durante o estudo; para a toxicidade crônica não teve diferenças de comportamento e peso comparados com os controles dando assim ao fitoterápicos no seguinte estudo características que não classificam a substancia como toxica (Gonçalves et al, 2007).

Por outro lado, uma pesquisa feita com bioensaio de toxicidade em larvas de *Artemia salina* obteve resultados diferentes, apresentando efeitos tóxicos danosos á integridade celular, . Nesse ensaio, as larvas da *Artemia salina* foram expostas a concentração de 100%, 50%,25%, 12,5%6,25% e 3,13% do estrato hidroalcolico da *Operculina alata*, onde as mesmas permaneceram por 24 horas. Após esse período, foram feitas análises e contadas as larvas mortas em vidro relógio, obtendo morte de todas as larvas da concentração 100% ate 6,25%; obtendo sobrevida de 10% na concentração de 3,13%. No mesmo estudo, para avaliar a genotoxicidade foi feito empregado as mesmas concentrações (100%,50%,25%,12,5%,6,25 %e 3,13%) do EHA da *Operculina alata* em bulbos de *Alium cepa* durante 48 horas com ausência de luz. Observou-se que houve a ausência total de crescimento radicular impossibilitando a análise genotóxica do EHA da *Operculina alata* (Beirão et al, 2015). O presente estudo mostrou resultados conflitantes quando comparado com os estudos anteriores, porém, é importante salientar que a aguardente alemã tem uma concentração muito mais baixa que o EHA de *Operculina alata* utilizado nesses estudos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a utilização do fitoterápico estudado não apresenta valores significativos de anormalidades e divisões de micronúcleo comparados com o CP nas concentrações apresentadas no trabalho sendo considerada uma substância não citotóxica e antimutagenica.

A partir dos dados observados, pode-se inferir que a aguardente alemã, nas condições testadas, não é perigosa aos seres humanos e seu uso para fins farmacológicos é seguro. Para pacientes em tratamento oncológico, o uso regular de aguardente Alemã deve ser evitado, visto que ele foi capaz de atenuar os efeitos do quimioterápico ciclofosfamida. Além disso, em concentrações mais altas, podem ser prejudiciais (mutagenica e citotóxica) e seu uso indiscriminado deve ser evitado. O presente estudo proporciona evidências que o teste in vivo de micronúcleo em roedores são sistemas versáteis e sensíveis para determinação de atividade não genotóxica para aguardente alemã.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA:

<http://www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/10055/historico-do-uso-dos-fitoterapicos> acessado dia 18 de novembro de 2014

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Medicamentos+fitoterapicos> acessado dia 18 de novembro de 2014

GONÇALVES, E.DA S. **Avaliação toxicológica pre clínica do extrato hidroalcoólico da *Operculina alata (Ham) urbam***. Dissertação (mestrado) Recife Departamento de ciências farmacêuticas Universidade Federal do Pernambuco.2003

REIS, P.R DE M. **Avaliação das atividades genotóxica, antigenotóxica, angiogênica e potencial de cicatrização do látex da *Synadenium umbellatum Pax***. Tese (doutorado) Goiania Programa de pós-graduação em biologia Laboratório de radiobiologia e mutagênese Universidade Federal de Goias.2009

FONTELES, M.M.DE F.; VENANCIO, E.T.; RIOS, E.V.; BESSA, B.M.B.; FRANCELINO, E.V. CARVALHO, D.M^a S.; COELHO, H.L.L., **Vigilância pós-comercial da aguardente alemã (*Operculina macrocarpo e Convolvulus scammonia*)** Revista Brasileira de Farmacologia, publicada em novembro de 2008

SANTOS, L.K.X; **Estudos de toxicologia clínica da tintura jalapa na constipação intestinal**. Dissertação (mestrado) Fortaleza. Departamento de Fisiologia e Farmacologia Universidade Federal do Ceara. 2009

FREITAS, P.S. **Investigação do potencial mutagênico do extrato de frutos de *Vaccinium corymbosum (mirtilo)* em células do sangue periférico de camundongos Swiss in vivo**. Dissertação (mestrado) Alfenas MG 2007

QUEIROGA, A.S.; **Avaliação do potencial antimutagenico do leite humano na interação com a alfa cipermetria pelo teste do micronúcleo em camundongos**. Trabalho de conclusão de curso (tcc) em Ciências Biológicas Departamento de Biologia Universidade Estadual da Paraíba.2011

NETO ALMEIDA, J.X.; MEDEIROS E MELO, F.P.; MELO, A.J.M.; SILVA, J.C.; DANTAS, J.P.; **Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica mill*) através do teste de micronúcleo em medula óssea de ratos (*Ratos***

novergius) linhagem Wistar in vivo. Revista de Biologia e Ciência da Terra. Volume 5 n° 2, 2 semestres de 2005

GONCALVES, E.S.; SILVA, R.J.R.; AGUIAR, F.J.S.; DIMECH, G.S.; ROLIM-NETO, P.J.; FRAGA, M^a DO C.C.A.; LAFAYETE, S.S.L.; WANDERLEY, A.G. **Avaliação toxicológica crônica do extrato hidro alcoólico de *Operculina alata* (Ham) Urban sobre parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos Wistar.** Latin American Journal of Pharmacy. Fevereiro de 2007

ALBAS, C.S.1; SOUZA, J.P.1; NAI, G.A.1*; PARIZI, J.L.S1. **Avaliação da genotoxicidade da *Ilex paraguariensis* (erva mate) pelo teste do micronúcleo.** Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.345-349, 2014

LUZ, A.C.; PRETTI, I.R.; DUTRA, J.C.V.; BATITUCCI, M.C.P.*. **Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major L.* em sistemas teste in vivo.** Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.14, n.4, p.635-642,

DE BONA, A.P.1; BATITUCCI, M.C.P.1; ANDRADE, M.A.; RIVA, J.A.R.; PERDIGÃO, T.L. **Estudo fitoquímico e análise mutagênica das folhas e inflorescências de *Erythrina mulungu* (Mart ex Benth.) através do Teste de Micronúcleo em roedores.** Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.14, n.2, p.344-351, 2012

FERREIRA,F.G.;REGASINI,L.O.;OLIVEIRA,A.M.;CAMPOS,J.A.D.B.;SILVA,D.H.S.;CAVALHEIRO,A.J.;SANTOS,R.A.;BASSI,C.L.;BOLZANI ,V.DA.S.;SOARES,C.P **Avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes frações de *Pterogyne nitens* (Leguminosae), utilizando ensaio de micronúcleo em *Tradescantia pallida*.** Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 19(1A): 61-67, Jan./Mar. 2009

SERPELONI,J.M.;VILEGAS,W.;VARANDA,E.A.;CÓLUS,I.M.S. **Avaliação in vivo da anticlastogenicidade de extratos de plantas medicinais do gênero *Miconia* através do teste do micronúcleo.** Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 29, n. 1, p. 47-56, jan./jun. 2008

LIMA, L.R.; CAVALCANTE, R.R.L.; MARTINS, M.C.C.; PARENTE, D.M.,; CAVALCANTE, A.A.M.C. **Avaliação da atividade antiedematogênica,**

antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (A. C. Smith) (Imburana-de-cheiro). Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.15, n.3, p.415-422, 2013

PEREIRA, A.C.S.; RIBEIRO, G.E.; SOUZA, L.C.R.; RUFINO, L.R.A. ; CABRAL, I.S.R.; BORIOLLO, M.F.G.; NOGUEIRA,D.A.; OLIVEIRA, N.M.S.; FIORINI, J.E. **Atividade biológica do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* Link sobre *Herpetomonas samuelpeessoai* (Galvão.) Roitman.** Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.16, n.3, p.585-592, 2014.

VALADARES,M.C.;CASTRO,N.C.;CUNHA,L.C.*Synadenium umbellatum*: **citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas vol. 43, n. 4, out./dez., 2007



TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DIGITAL NA BIBLIOTECA
"JOSÉ ALBANO DE MACEDO"

Identificação do Tipo de Documento

- () Tese
 () Dissertação
 (X) Monografia
 () Artigo

Eu, Alexsandra Moreira Ferreira de Sousa,
 autorizo com base na Lei Federal nº 9.610 de 19 de Fevereiro de 1998 e na Lei nº 10.973 de
 02 de dezembro de 2004, a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar,
 gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação
Análise citotóxica e mutagênica da aquar-
dente alemã em modelo animal (Mus musculus)
 de minha autoria, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, pela internet a título
 de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

Picos-PI ____ de ____ de 20 ____.

Leonardo Henrique G. de M. Lima
 Assinatura

Felipe Roberto Lourenço
 Assinatura