

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

ANA PAULA DE BONA

**ESTUDOS FITOQUÍMICO, ALELOPÁTICO,
TÓXICO E MUTAGÊNICO DE *Erythrina mulungu*
MART. ex BENTH. UTILIZANDO BIOENSAIOS**

VITÓRIA
2009

ANA PAULA DE BONA

**ESTUDOS FITOQUÍMICO, ALELOPÁTICO,
TÓXICO E MUTAGÊNICO DE *Erythrina mulungu*
MART. ex BENTH. UTILIZANDO BIOENSAIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), como pré-requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci.

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Marcieni Ataíde de Andrade.

VITÓRIA
2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

D287e De Bona, Ana Paula, 1982-
Estudos fitoquímico, alelopático, tóxico e mutagênico de
Erythrina mulungu MART. ex BENTH. utilizando bioensaios /
Ana Paula De Bona. – 2009.
70 f. : il.

Orientadora: Maria do Carmo Pimentel Batitucci.
Co-Orientadora: Marcieni Ataíde de Andrade.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. *Erythrina mulungu*. 2. Alelopatia. 3. Mutagênese. 4.
Citotoxicidade. 5. Química vegetal. 6. Cebola. I. Batitucci, Maria
do Carmo Pimentel. II. Andrade, Marcieni Ataíde de. III.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

ANA PAULA DE BONA

ESTUDOS FITOQUÍMICO, ALELOPÁTICO, TÓXICO E MUTAGÊNICO DE *Erythrina mulungu* MART. ex BENTH. UTILIZANDO BIOENSAIOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), como pré-requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2009:

Prof^a Dr^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a Dr^a Marcieni Ataíde de Andrade
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a Dr^a Valéria de Oliveira Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a Dr^a Marcia Regina Holanda da Cunha
Faculdade Estácio de Sá de Vitória

A Deus por me abençoar com mais uma
graça.

Aos meus avós, meu pai e Nira pela
dedicação, amor e carinho.

Ao Fábio e aos verdadeiros amigos, pelos
momentos de alegria, apoio e
compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em todos os momentos de minha vida, sendo minha fortaleza, meu refúgio e acima de tudo, meu amigo incondicional.

Aos meus avós Fiori (*in memoriam*) e Luiza, meu Pai e Nira, por todo amor, dedicação, carinho, ensinamentos, lições de vida e acima de tudo por todo o esforço e incentivo para que meus objetivos pudessem ser alcançados.

Ao Fábio, pelo apoio, carinho, paciência e incentivo, tornando-se minha motivação e força necessárias para a elaboração deste trabalho.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci, pela amizade, incentivo, dedicação, carinho, empenho, apoio, orientação e, sobretudo, pela transmissão dos seus conhecimentos imprescindíveis para a elaboração deste trabalho.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Marcieni Ataíde Andrade, pela amizade, apoio e colaboração na elaboração deste trabalho.

As professoras Valéria de Oliveira Fernandes e Marcia Regina Holanda da Cunha pela receptividade em aceitar o convite para participar da banca examinadora.

A professora Diolina Moura Silva por aceitar o convite para participar, como suplente, da banca examinadora.

A minha “irmãzinha” Darlene, pelo ombro amigo, conselhos, conversa e acima de tudo pela grande e verdadeira amizade.

A todos os amigos da turma de mestrado de 2007, pela amizade e companheirismo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) pelos ensinamentos.

Aos verdadeiros amigos por acreditaram no meu potencial e permanecerem ao meu lado durante toda essa caminhada.

A administração do Horto Municipal de Vitória (Cariacica - ES) por permitir a realização das coletas.

Ao Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória – FACITEC, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

A todos aqueles, que direta ou indiretamente, ajudaram na realização e conclusão deste trabalho.

“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma.”
John Ruskin

RESUMO

De Bona, Ana Paula. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo. Fevereiro de 2009. Estudos fitoquímico, alelopático, tóxico e mutagênico de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth. utilizando bioensaios. Orientador: Maria do Carmo Pimentel Batitucci. Co-orientador: Marcieni Ataíde de Andrade.

As plantas produzem uma gama de compostos secundários, que podem atuar como princípio ativo em medicamentos ou podem produzir toxicidade sobre animais e outras plantas. Assim, por ser a *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth.) uma espécie de importância farmacológica e ecológica, o presente trabalho visa avaliar a composição fitoquímica e os potenciais efeitos alelopáticos e mutagênicos do extrato bruto de inflorescências e de folhas dessa planta, por meio de diferentes bioensaios. A prospecção fitoquímica foi realizada através de reações químicas que resultaram no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico. Os ensaios alelopáticos foram realizados em *Allium cepa* e consistiu de 8 tratamentos (água destilada e 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,6 mg/mL dos extratos) e 5 repetições com 20 sementes cada. Avaliou-se a velocidade de germinação (IVG), primeira contagem, porcentagem de germinação e média radicular. Para análise citotóxica e mutagênica em plantas, sementes de *Allium cepa* foram submetidas ao tratamento contínuo e descontínuo (20 e 72 horas) e avaliados o índice mitótico, índice de efeito aneugênico e índice de efeito clastogênico. A toxicidade aguda em animais foi realizada através do estabelecimento da dose letal média (DL₅₀) e a análise citotóxica e mutagênica feita pelo teste de micronúcleo, por meio do método do esfregaço, após exposição dos animais a 5 dias de tratamento. Os resultados demonstram a presença de açúcares redutores, fenóis e taninos, proteínas e aminoácidos, alcalóides, flavonóides, depsídeos e depsídonas e derivados de cumarina em ambos os órgãos; saponinas, esteroides e triterpenos nas folhas e glicosídeos cardiotônicos e antraquinônicos nas inflorescências. Os órgãos apresentam atividade alelopática sobre o desenvolvimento radicular, potencial citotóxico e ausência de efeito aneugênico sobre a cebola. As inflorescências possuem potencial clastogênico. Para a DL₅₀, a folha demonstrou-se atóxica e a inflorescência moderadamente tóxica. Ambas apresentaram ausência de citotoxicidade e potencial genotóxico em células de roedores, desse modo, a

utilização de *E. mulungu*, tanto para o manejo de áreas degradadas ou agrícolas, quanto para a fabricação de medicamentos, deve ser efetuada de forma cautelosa.

Palavras-chave: *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth.), alelopatia, mutagênese, citotoxicidade, fitoquímica, DL₅₀, *Allium cepa*, teste de micronúcleo em roedores.

ABSTRACT

De Bona, Ana Paula. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Espírito Santo. Fevereiro de 2009. Phytochemical, allelopathic, toxic and mutagenic studies of *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth. using bioassays. Orientador: Maria do Carmo Pimentel Batitucci. Co-orientador: Marcieni Ataíde de Andrade.

The plants produce a range of secondary compounds, which can act as active principle in drugs or can produce toxic effect on animals and other plants. Thus, as the *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth.) a kind of pharmacological and ecological importance, this study aims to evaluate the structure phytochemistry and allelopathic and mutagenic effects potential of the crude extract of the inflorescences and leaves of this plant through of different bioassays. The phytochemical survey was conducted through chemical reactions that resulted in the development of color and/or precipitate characteristic. The allelopathic tests in *Allium cepa* were conducted and consisted of 8 treatments (distilled water and 0025; 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.6 mg/mL of extracts) and 5 repetitions with 20 seeds each. Evaluated the germination speed, the first count, the germination percentage and the media root. For analysis cytotoxic and mutagenic in plants, seeds of *Allium cepa* were subjected to continuous and discontinuous treatment (20 and 72 hours) and assessed the mitotic index, aneugenic effect index and clastogenic effect index. The acute toxicity in animals was achieved through the establishment of the median lethal dose (LD₅₀) and cytotoxic and mutagenic analysis made by the micronucleus test, using the method of smear, after exposure of animals to 5 days of treatment. The results show the presence of reducing sugars, phenols and tannins, proteins and amino acids, alkaloids, flavonoids, depsides and depsidones, derived from coumarin in both organs; saponins, steroids and triterpenes in the leaves and cardiac and anthraquinones glycosides in inflorescences. The bodies have allelopathic activity on the root development, potential cytotoxic and no aneugenic effect on the onion. The inflorescences have potential clastogenic. To the LD₅₀, the leave showed non toxic and inflorescence, moderately toxic. Both showed lack of cytotoxic and genotoxic potential in cells of rodents. The use of *E. mulungu*, both for the

management of degraded or agricultural areas, as for the manufacture of medicines, must be done so cautiously.

Key words: *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth.) Allelopathy, mutagenesis, cytotoxicity, phytochemical, LD50, *Allium cepa*, micronucleus test in rodents.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO GERAL	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	17
3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	17
3.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA	17
3.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	18
3.4.1 Saponina Espumídica	18
3.4.2 Açúcares Redutores	19
3.4.3 Polissacarídeos	19
3.4.4 Fenóis e Taninos	19
3.4.5 Proteínas e Aminoácidos	19
3.4.6 Flavonóides	19
3.4.6.1 Classes dos Flavonóides	20
3.4.7 Alcalóides	20
3.4.8 Depsídeos e Depsidonas	20
3.4.9 Derivado de Cumarina	21
3.4.10 Esteróides e Triterpenóides	21
3.4.11 Glicosídeos Cardiotônicos	21
3.4.11.1 Reações com Anel Lactônico – Reação de Baliet.....	22
3.4.11.2 Reações com Desoxi-Açúcares – Reação de Keller- Killiani.....	22
3.4.12 Glicosídeos Antraquinônicos	22
3.5 ESTABELECIMENTO DA DOSE LETAL MÉDIA (DL ₅₀)	22
3.6 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE	23
3.6.1 Bioensaio com <i>Allium cepa</i>	23

3.6.2 Bioensaio com roedores	25
3.7 ANÁLISE ALELOPÁTICA	26
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS	28
4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO E ANÁLISE MUTAGÊNICA DAS FOLHAS E INFLORESCÊNCIAS DE <i>Erythrina mulungu</i> (Mart. ex Benth.) ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM ROEDORES	29
4.2 POTENCIAIS EFEITOS ALELOPÁTICOS E MUTAGÊNICOS DE <i>Erythrina mulungu</i> (MART EX. BENTH) EM <i>Allium cepa</i> (L.)	47
5 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a fitoterapia tem sido revalorizada (CARVALHO, 2004; BIESKI, 2005; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006) e segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial a utilizam *in natura* ou através de formulações medicamentosas como principal recurso no atendimento básico de saúde (ELISABETSKY, 2002). Isto se deve ao fato de ser um tratamento acessível e classificado, de acordo com o senso comum, como natural, não perigoso à saúde e isento de reações adversas e/ou contra-indicações.

Entretanto, apesar da crescente importância das drogas vegetais na terapêutica medicamentosa, boa parte de sua comercialização ocorre em feiras, que possibilitam identificação errônea da espécie e adulteração, e em farmácias e lojas de produtos naturais, onde as preparações são distribuídas com rotulagem industrializada (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Em geral não possuem certificado de qualidade e às vezes carecem de informações técnicas, tais como data de validade, modo de ação, contra-indicação, precaução, advertência (principalmente para pacientes idosos, crianças, mulheres grávidas e lactantes), interação medicamentosa e superdosagem.

Além disso, em muitos casos, as propriedades farmacológicas anunciadas são baseadas somente no uso popular, não possuindo validade científica, pela não comprovação de suas ações farmacológicas ou por não terem sido investigadas (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005) já que relativamente poucos estudos farmacológicos, toxicológicos e clínicos foram realizados a fim de comprovar a eficácia e segurança das diversas plantas curativas conhecidas.

Contudo, o uso de produtos derivados de plantas pode levar a diversos agravos à saúde, como reações alérgicas, reações tóxicas, efeitos adversos e efeitos mutagênicos (ALVES, 2004), já que muitas plantas que possuem poder curativo, podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (CAPASSO et al. 2000), que podem desencadear reações adversas devido aos seus próprios

componentes ou pela presença de contaminantes ou adulterantes nas preparações fitoterápicas (SILVA et al., 2001).

Esses agravos à saúde podem representar efeitos imediatos, facilmente associados à ingestão do produto vegetal, mas também, podem se instalar a longo prazo e de forma assintomática, como os carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos (LAPA et al., 2007). Além disso, as drogas vegetais podem apresentar interações medicamentosas com drogas sintéticas e outras drogas vegetais, e conseqüentemente induzirem a erro médico no diagnóstico, já que muitas vezes a automedicação com plantas medicinais não é informada ao médico (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Esta toxicidade é atribuída à diversidade de compostos químicos oriundos do metabolismo secundário, que atuam tanto como princípios ativos em medicamentos (FERREIRA; AQUILA, 2000) quanto como compostos alelopáticos e mutagênicos causando toxicidade sobre várias plantas e/ou animais (CHOU; KUO, 1986 apud SOUZA et al., 2005). Geralmente, essa toxicidade resulta da ação de vários metabólitos, que, coletivamente, interferem em vários processos fisiológicos. Essas misturas podem conter substâncias similares ou de natureza química diversa (EINHELLIG, 1999 apud SILVA; AQUILA, 2006).

A *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth., espécie nativa da parte central do Brasil que ocorre desde São Paulo e Mato Grosso do Sul até Tocantins e Bahia, e popularmente conhecida como mulungu, é uma espécie com diferentes propriedades farmacológicas, sendo utilizada principalmente como sedativa e hipotensiva (LORENZI; MATOS, 2002). O extrato de suas folhas e de suas inflorescências, bem como tinturas dessas partes, compõe formulações fitoterápicas nacionais e internacionais, apesar da escassez de estudos farmacológicos, clínicos e toxicológicos que estabeleçam padrões de qualidade para as diversas preparações utilizadas.

Além disso, o gênero foi escolhido como árvore-símbolo da Embrapa Agrobiologia, devido às inúmeras aplicações ligadas à agroecologia, sendo recomendado como moirão vivo, no enriquecimento e arborização de pastagens, na recuperação de

matas ciliares e de ecossistemas degradados e na manutenção da fauna silvestre (NEVES, 2006). Contudo, algumas espécies do gênero manifestam propriedades tóxicas comprovadas (TORAL; WENCOMO, 1999; GARCÍA-MATEOS; SOTO-HERNÁNDEZ; VÁZQUEZ, 2000; GARÍN-AGUILAR et al., 2000; SAIDU et al., 2000; GARCÍA-MATEOS et al., 2004; SCHVARTSMAN, 1979 apud VIRTUOSO, 2005) e também efeitos alelopáticos (ANTHOFER; HANSON; JUTZI, 1998; HASTINGS, 1990 apud GARCÍA-MATEOS; PEÑA-VALDIVIA; SOTO-HERNANDEZ, 2002; SOARES et al., 2002; VIRTUOSO, 2005) em diferentes organismos-teste.

Dessa forma, faz-se necessário submeter o extrato de *E. mulungu* à avaliação citotóxica/genotóxica (toxicológica) a fim de legitimá-lo como recurso terapêutico seguro e sujeitá-lo a estudos fitoquímicos, para a identificação preliminar dos compostos secundários presentes.

Além disso, diante do seu papel ecológico, é importante avaliar o efeito alelopático da espécie, uma vez que é necessário conhecer a sua biologia e o seu comportamento em reflorestamentos (BARBOSA, 2000). Essa informação é importante, pois os efeitos ocasionados pelas substâncias alelopáticas sobre uma planta são diversos e os conhecimentos desses efeitos e dos seus mecanismos de ação são importantes para o entendimento das interações entre plantas, tanto nos ecossistemas naturais, como nos agrícolas (RODRIGUES et al., 1993 apud REZENDE et al., 2003), visto que esses compostos são importantes na adaptação das espécies e na organização de comunidades vegetais (WHITTAKER; FEENY, 1971).

Assim, a realização de experimentos com organismos-teste permite avaliar a substância quanto à sua atividade alelopática, citotóxica e mutagênica. Sistemas testes vegetais, realizados com células meristemáticas de raízes de plantas, têm sido amplamente empregados na investigação de potencial alelopático, na detecção de citotoxicidade/mutagenicidade de extratos vegetais (TEIXEIRA et al., 2003; FACHINETTO et al., 2007), no monitoramento da poluição ambiental e na avaliação do potencial mutagênico de muitos compostos químicos (MA et al., 1995).

Dentre os vegetais utilizados, destaca-se o *Allium cepa* (L.), devido à alta sensibilidade e boa correlação com outros sistemas-teste, fatores fundamentais para avaliação mais precisa de riscos ambientais e extrapolação de dados para outros organismos alvos (FISKESJÖ, 1985). Assim, resultados positivos no teste devem ser considerados como um indício de que o componente testado pode apresentar propriedade alelopática ou ser prejudicial à saúde humana, dependendo do enfoque a ser testado.

Dentre os testes com animais, destaca-se o teste de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*, que apresenta correlação positiva entre o aumento da frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e no homem (MORITA et al., 1997). Por isso, é um ensaio citogenético bem estabelecido e recomendado pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte de uma bateria de testes para a avaliação e registro de diversas substâncias, entre elas, as obtidas das plantas medicinais (CHOY, 2001 apud RIBEIRO, 2003; FAGUNDES et al., 2005; LEITE et al., 2006).

Dessa forma, devido à escassez de estudos com a *Erythrina mulungu* no Brasil, e diante de sua importância farmacológica e ecológica, é necessário submetê-la à avaliação citotóxica/genotóxica (toxicológica) a fim de fornecer informações mais precisas para o seu uso, garantindo segurança e confiabilidade às pessoas que a utilizam como medicamento e também à avaliação alelopática, uma vez que é necessário conhecer a sua biologia e o seu comportamento em reflorestamentos (BARBOSA, 2000 apud SOARES et al., 2002).

2 OBJETIVO GERAL

Investigar a composição fitoquímica e os potenciais efeitos mutagênicos e alelopáticos de diferentes concentrações do extrato bruto de inflorescências e de folhas de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth., por meio de diferentes bioensaios.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos mutagênicos e genotóxicos de diferentes concentrações da do extrato bruto de inflorescências e de folhas de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth., em células vegetais, por meio do teste com *Allium cepa*.

Estimar através de análise estatística a atividade alelopática do extrato bruto das folhas e das inflorescências de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth.;

Estabelecer a dose letal 50% (DL₅₀) do extrato bruto de inflorescências e de folhas de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth., por meio do teste de toxicidade aguda frente a camundongos;

Avaliar os efeitos mutagênicos e genotóxicos de diferentes concentrações da do extrato bruto de inflorescências e de folhas de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth., em células animais, por meio do teste de micronúcleo com roedores.

Realizar a caracterização fitoquímica das inflorescências de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Os galhos da *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth foram coletados no Horto Municipal de Vitória, localizado no município de Cariacica-ES, Brasil.

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Foram separadas as inflorescências e as folhas, as quais foram submetidas à secagem em estufa, com circulação de ar, à 40 °C, e após completamente secas, as mesmas foram pulverizadas, utilizando-se um moedor elétrico.

Os extratos hidroalcoólicos foram obtidos através da maceração de 60 g do pó da folha e da inflorescência em 700 mL de etanol 70%, a temperatura ambiente (25 a 30°C), e ao abrigo da luz, por 72 horas. Após esse período, os extratos foram submetidos à rotaevaporação a pressão reduzida e temperatura de 60°C, com a finalidade de remover o solvente (álcool 70%) sem alteração dos componentes químicos dos extratos. Os extratos foram levados à estufa para completa secagem e mantidos na geladeira até o momento da realização dos protocolos experimentais.

Nos experimentos os extratos foram dissolvidos em água destilada para obtenção das frações aquosas.

3.3 DETERMINAÇÃO DA MASSA SECA

Devido ao fato dos extratos permanecerem com certo grau de hidratação, mesmo após serem colocados no rotaevaporador, realizou-se a determinação da massa seca para quantificar a concentração efetiva de extrato não hidratado a ser utilizado

nos protocolos experimentais, a fim de evitar que alterações durante a rota-
evaporação do material vegetal interferissem na dose aplicada nos experimentos.
Inicialmente, um cadinho de porcelana vazio foi pesado em balança digital e
submetido ao aquecimento. Em seguida, o cadinho foi pesado até que fosse obtida a
mesma massa em três pesagens sucessivas.

Posteriormente, 500 mg do extrato bruto foi transferido para o cadinho, e então,
submetido a aquecimento até a total evaporação do solvente, controlando
cuidadosamente a temperatura a fim de evitar a perda do material, devido à fervura.
Pesagens repetidas foram realizadas até que a massa observada não se alterasse
por três vezes consecutivas.

Para a determinação da massa seca, o valor da pesagem final foi subtraído do valor
do cadinho vazio acrescido das 500 mg do extrato bruto, obtendo-se assim a massa
de extrato seca contida em 500 mg do extrato bruto úmido. As concentrações dos
extratos utilizadas neste estudo foram baseadas na massa seca do extrato.

3.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A partir dos extratos hidroalcoólicos das folhas e das inflorescências foram
realizadas reações para detecção preliminar de alguns grupos de constituintes dos
metabólitos secundários dos vegetais, segundo metodologia proposta por Barbosa
(2004).

3.4.1 Saponina Espumídica

Dissolveu-se uma alíquota dos extratos em 5 mL de água destilada. Em seguida, a
solução foi diluída para 15 mL e agitada energicamente durante 2 minutos em tubo
de ensaio. Analisou-se a persistência da camada de espuma com altura superior a
um centímetro após 30 minutos de repouso.

3.4.2 Açúcares Redutores

A uma alíquota dos extratos dissolvida em 5 mL de água destilada foi adicionada 2 mL do reativo de Fehling A e 2 mL do reativo de Fehling B. A solução foi aquecida em banho-maria em ebulição durante 5 minutos. Avaliou-se aparecimento de um precipitado vermelho tijolo.

3.4.3 Polissacarídeos

Uma alíquota dos extratos foi dissolvida em 5 mL de água destilada e foram acrescentadas duas gotas de lugol. Observou-se o aparecimento de coloração azul.

3.4.4 Fenóis e Taninos

Dissolveu-se uma alíquota dos extratos em 5 mL de água destilada, e adicionou-se uma gota de solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl_3) a 2%. Notou-se mudança na coloração ou formação de precipitado.

3.4.5 Proteínas e Aminoácidos

Uma alíquota dos extratos foi dissolvida em 3 mL de água destilada. Em seguida, foi adicionada 0,5 mL de solução aquosa de Nihidrina a 1% e aquecida em banho-maria até a ebulição. Avaliou-se o aparecimento de uma coloração violeta persistente.

3.4.6 Flavonóides

A uma alíquota dos extratos dissolvida em 10 mL de metanol foram adicionadas 5 gotas de ácido clorídrico (HCl) concentrado e raspas de magnésio. Analisou-se o surgimento de uma coloração rósea.

3.4.6.1 Classes dos Flavonóides

Transferiu-se 3 mL de solução obtida através da dissolução de uma alíquota dos extratos em 20 mL de água destilada para três tubos de ensaio. Uma das soluções foi acidificada a pH 3 enquanto as restantes foram alcalinizadas a pH 8.5 e pH 11.

Notou-se coloração vermelha (pH 3), lilás (pH 8.5) e azul púrpura (pH 11) para a presença de antocianinas e antocianidinas, coloração amarela (pH 8.5) para flavonas, flavonóis e xantonas, coloração vermelha (pH 3) e vermelho-púrpura (pH 11) para chalconas e auronas, coloração vermelho-laranja (pH 11) para flavanonóis, coloração vermelha (pH 3) para leucoantocianidinas, coloração pardo-amarela (pH 3) para catequinas e coloração vermelho-alaranjado (pH 11) para flavanonas.

3.4.7 Alcalóides

Dissolveu-se uma alíquota dos extratos 5 mL de solução de ácido clorídrico (HCl) a 5%, transferiu-se 1 mL da solução para placas de porcelana e adicionou-se duas gotas de cada reagente. Os reagentes utilizados foram: reagente de Dragendorff (tetraiodeto bismuto de potássio), reagente de Bouchardat, reagente de Mayer (mercúrio tetraiodeto de potássio) e reagente de Wagner.

Observou-se a formação de precipitado branco para o reativo de Mayer, precipitado de cor vermelho tijolo para o reativo de Dragendorff, precipitado de cor laranja avermelhado para o reativo de Bouchardat e precipitado amarelo para o reagente de Wagner.

3.4.8 Depsídeos e Depsídonas

Uma alíquota dos extratos foi dissolvida em 5 mL de éter etílico, que foi então todo evaporado em banho-maria. Ao resíduo, adicionou-se 3 mL de metanol, agitou-se e adicionou-se 2 gotas de solução de cloreto férrico (FeCl_3) a 2%. Analisou-se o aparecimento de coloração verde, azul ou cinza.

3.4.9 Derivado de Cumarina

Dissolveu-se uma alíquota dos extratos em 5 mL de éter etílico e concentrou-a em banho-maria até 0,5 mL. Em papel filtro, aplicaram-se gotas da solução etérea, formando duas manchas de aproximadamente 1cm de diâmetro cada. A uma delas, adicionou-se 1 gota de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1N. A metade da mancha foi coberta com papel escuro, e a outra metade foi exposta a luz ultravioleta. Notou-se o aparecimento de fluorescência azul na parte exposta da mancha.

3.4.10 Esteróides e Triterpenóides

Uma alíquota dos extratos foi dissolvida em 10 mL de clorofórmio (CH_2Cl_2). A solução foi filtrada sobre carvão ativado e transferida para tubo de ensaio. Ao filtrado, adicionou-se 1 mL de anidrido acético, agitou-se suavemente, em seguida, adicionou-se três gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, tornando a agitar suavemente. Observou-se rápido desenvolvimento de cores, que vão do azul evanescente ao verde persistente.

3.4.11 Glicosídeos Cardiotônicos

Adicionou-se 40 mL de etanol 95% a uma alíquota dos extratos e submeteu-os à extração em banho-maria a 60 °C por 15 minutos. A solução foi esfriada, filtrada e a ela adicionada 10 mL de solução saturada de acetato de chumbo. A solução foi novamente filtrada e o filtrado foi transferido para funil de separação e extraído duas vezes com 15 mL de clorofórmio (CH_2Cl_2). O extrato em clorofórmio foi concentrado em evaporador rotativo até a metade do volume.

3.4.11.1 Reações com Anel Lactônico – Reação de Baljet

Ao extrato clorofórmico concentrado, adicionou-se 5 gotas de solução aquosa de ácido pícrico 0,5% (2,4,6-trinitrofenol) e 2 gotas de hidróxido de potássio (KOH) 1 N. Notou-se o aparecimento de coloração alaranjada intensa.

3.4.11.2 Reações com Desoxi-Açúcares – Reação de Keller- Killiani

Dissolveu-se o extrato clorofórmico concentrado em 1,0 mL de ácido acético glacial. Adicionou-se 2 gotas de cloreto férrico (FeCl_3) a 2% e transferiu-se cuidadosamente o conteúdo deste tubo para um outro contendo 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Observou-se o aparecimento de coloração castanho-avermelhado na zona de contato dos líquidos e azul esverdeada na camada acética.

3.4.12 Glicosídeos Antraquinônicos

Uma alíquota dos extratos foi fervida, durante 5 minutos, com 10 mL de hidróxido de potássio (KOH) 0,5 N e 1 mL de água oxigenada (H_2O_2) a 6%. A suspensão foi esfriada, filtrada, acidificada com ácido acético glacial e particionada com 10 mL de clorofórmio (CH_2Cl_2). A fase orgânica foi separada e agitada com 2,5 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2 N. Notou-se o aparecimento de coloração vermelha à parte alcalina e incolor à parte orgânica.

3.5 ESTABELECIMENTO DA DOSE LETAL MÉDIA (DL_{50})

Para estabelecimento da dose letal média (DL₅₀), que determina a concentração do extrato que é letal para 50 % dos animais, foram usados camundongos (30-50g), obtidos no Biotério da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e realizada a metodologia de Litchfield e Wilcoxon (1949 apud GARÍN-AGUILAR et al., 2000). Foram utilizados 30 animais, divididos em 3 grupos experimentais (n=10) que receberam o volume administrado da dose proporcional à massa corpórea de cada animal.

Foram utilizadas 3 doses dos extratos (250, 500 e 1000 mg/kg) das folhas e das inflorescências, administradas por via intraperitoneal, em delineamento inteiramente casualizado.

Os animais permaneceram nas gaiolas, em local com temperatura e ciclo noite-dia controlados e alimentação *ad libitum*, por um período de 48 horas, após os quais foram observados e contados o número de óbitos.

3.6 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

3.6.1 Bioensaio com *Allium cepa*

Sementes de *Allium cepa* cultivar Baia Periforme (cebola) foram submetidas à germinação em 2 concentrações (0,4 e 0,6 mg/mL) dos extratos das folhas e das inflorescências de *Erythrina mulungu*. Para o controle negativo (CN) empregou-se água destilada.

As sementes foram submetidas a dois tipos de tratamentos:

- 1- Tratamento Contínuo: embebição e germinação das sementes diretamente no extrato vegetal;
2. Tratamento Descontínuo: sementes inicialmente germinadas em água destilada até atingirem cerca de 1 cm de protusão radicular, sendo posteriormente transferidas para os tratamentos com as diferentes concentrações do extrato. Após 20 h (tratamento agudo), algumas sementes foram coletadas aleatoriamente e o restante

permaneceu recebendo o tratamento correspondente por 72 h (tratamento crônico). As raízes foram fixadas em Carnoy 3:1 (álcool:ácido acético) por 24 horas à temperatura ambiente e, após esse período foram acondicionadas na geladeira.

A preparação do material para posterior análise foi realizada segundo metodologia descrita por Fontes, Davide e Davide (2001), com algumas modificações. Para a preparação citológica, as raízes foram lavadas em água destilada e submetidas à hidrólise com HCl 1N a 60°C por 5 minutos. Após esse período as raízes foram lavadas em água destilada e coradas com reativo de Schiff por 2 horas em local escuro. Todas as lâminas foram confeccionadas pelo método do esmagamento suave (GUERRA; SOUZA, 2002), e a região meristemática excisada foi macerada em 1 gota de carmim acético 1%. As lamínulas foram descoladas em nitrogênio líquido e as lâminas foram tornadas permanentes utilizando-se entellan.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, com objetiva de aumento de 40X. Para cada lâmina foram avaliadas 1000 células, perfazendo um total de 5000 células por tratamento.

As células foram analisadas quanto à presença de alterações morfológicas e cromossômicas. Para análise do efeito citotóxico foi utilizado o Índice Mitótico (IM) e para análise do efeito genotóxico foram usados o Índice de Efeito Aneugênico (IEA) e Índice de Efeito Clastogênico (IEC).

O IM foi determinado através da fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{número de células em divisão}}{\text{total de células analisadas}} \times 100$$

Calculou-se o IEA, considerando-se anáfase multipolar, c-metáfase, aderência, atraso, célula binucleada e perda como células aneugênicas, através da fórmula:

$$\text{IEA} = \frac{\text{número de células aneugênicas}}{\text{total de células analisadas}} \times 100$$

Considerou-se ponte, quebra, micronúcleo e morte celular como células clastogênicas e calculou-se o IEC através da fórmula:

$$\text{IEC} = \frac{\text{número de células clastogênicas}}{\text{total de células analisadas}} \times 100$$

3.6.2 Bioensaio com roedores

Para a realização da análise de micronúcleos foram utilizados camundongos machos e fêmeas, adultos jovens com idade entre 7 a 12 semanas e saudáveis, obtidos no biotério da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram pesados, selecionados ao acaso, identificados para continuidade dos registros e interpretação dos resultados ao longo dos experimentos e separados em 4 grupos experimentais (sendo 3 machos e 3 fêmeas para cada grupo). Os animais foram mantidos com alimentação *ad libitum* em local com temperatura e ciclo noite-dia controlados.

A preparação do material para posterior análise foi realizada segundo metodologia descrita por Ribeiro (2003). Os extratos vegetais foram administrados, em 2 concentrações (200 e 400 mg/mL), de acordo com o grupo experimental, por gavagem. Foram estabelecidos o grupo controle negativo (CN), que recebeu o veículo (soro fisiológico 0,9%) e o controle positivo (CP), que recebeu ciclofosfamida (50 mg/Kg). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e amostras de medula óssea foram coletadas dos fêmures dos animais, logo após o sacrifício, realizando-se o teste do micronúcleo (MN).

Após a retirada da medula óssea do fêmur dos ratos, com auxílio de uma seringa, previamente preenchida com soro fetal bovino, o material foi ressuspensionado no soro por várias vezes, com auxílio de uma pipeta Pasteur, até a obtenção de uma suspensão homogênea. A suspensão foi centrifugada, por 5 minutos, a 1000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 0,5 mL de soro fetal bovino.

Pelo método do esfregaço, foram confeccionadas 2 lâminas para cada animal, de cada um dos grupos experimentais. As lâminas foram secas ao ar, fixadas em

metanol e após 24 horas foram coradas, pelo método de Leishman, para diferenciar eritrócito policromático (PCE) do eritrócito normocromático (NCE).

O número de eritrócitos, com micronúcleos, foi determinado pela análise de um total de 2000 PCEs para cada animal, levando-se em consideração o número de PCEs micronucleados (PCEMN) e a razão PCE/PCE+NCE.

3.7 ANÁLISE ALELOPÁTICA

O bioensaio para verificação da atividade alelopática foi efetuado utilizando-se extratos hidroalcoólicos das folhas e das inflorescências de *Erythrina mulungu* com o intuito de observar o efeito sobre a germinação e crescimento de sementes de *Allium cepa* cultivar Baia Periforme (cebola).

Foram utilizadas sete concentrações do extrato bruto - 0,6 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,05 mg/mL e 0,025 mg/mL – e água destilada como controle negativo (CN).

As sementes de cebola foram acondicionadas em placas de petri, forradas com papel filtro, e embebidas diretamente em extrato vegetal e em água destilada. O delineamento foi inteiramente casualizado, composto de 8 tratamentos (CN e as concentrações dos extratos) e cinco repetições com 20 sementes cada.

As variáveis analisadas foram índice de velocidade de germinação (IVG), teste de primeira contagem, porcentagem de germinação (G) e média da radícula. As sementes foram consideradas germinadas quando a protrusão da radícula através do tegumento se tornou visível (ADEGAS; VOLL; PRETE, 2003; ALVES et al., 2004). As contagens foram diárias e no mesmo horário até o 6º e 12º dia após a implantação do experimento para o teste de primeira contagem e porcentagem de germinação, respectivamente (SOUZA, 2005).

A porcentagem de germinação foi calculada de acordo com Labouriau e Valadares (1976, apud LINHARES et al., 2005):

$$G = \frac{\text{número total de sementes germinadas}}{\text{número total de sementes colocadas a germinar}} \times 100$$

A determinação do índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes foi feita conforme Maguire, 1962 (apud FONTES; DAVIDE; DAVIDE, 2001; ADEGAS; VOLL; PRETE, 2003) através da fórmula:

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \frac{G_3}{N_3} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$$

Onde G_1 , G_2 , G_3 e G_n correspondem ao número de sementes germinadas no 1º, 2º, 3º e último dia do experimento, e N_1 , N_2 , N_3 e N_n correspondem ao número de dias após a implantação do experimento.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística para a verificação da citotoxicidade e mutagenicidade utilizando o bioensaio com *Allium cepa* e o bioensaio com roedores, foi realizada através do método Qui-Quadrado (χ^2) (BEIGUELMAN, 2006).

Os resultados da análise alelopática foram submetidos à análise de variância e comparação de médias através do teste de Tukey, com $\alpha \geq 0,05$ para as diferenças estatísticas significativas, utilizando-se o pacote computacional ASSISTAT (SILVA, 2007).

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO E ANÁLISE MUTAGÊNICA DAS FOLHAS E INFLORESCÊNCIAS DE *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth.) ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM ROEDORES – submetido à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais – ISSN 1516-0572

4.2 POTENCIAIS EFEITOS ALELOPÁTICOS E MUTAGÊNICOS DE *Erythrina mulungu* (MART EX. BENTH) EM *Allium cepa* (L.) – submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia – ISSN 0102-695X

Estudo fitoquímico e análise mutagênica das folhas e inflorescências de *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth.) através do Teste de Micronúcleo em roedores

De Bona, A. P.^{1*}; Batitucci, M.do C. P¹; Andrade, M. A. de²; Riva, J. A. R.²

¹Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos nº1468, Campus de Maruípe, 29040-090, Vitória, ES, Brasil. ² Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos nº1468, Campus de Maruípe, 29040-090, Vitória, ES, Brasil. *e-mail para correspondência: apdebona@yahoo.com.br

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo investigar a composição fitoquímica, estabelecer a dose letal média (DL₅₀) e avaliar os potenciais efeitos mutagênicos e genotóxicos do extrato hidroalcoólico de folhas e inflorescências de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth por meio do teste de micronúcleo em camundongos. A fitoquímica foi realizada através de reações preliminares com mudança de coloração e/ou formação de precipitado; a DL₅₀, por meio da administração intraperitoneal de 3 concentrações dos extratos, avaliando-se o número de óbitos após 48 horas e o teste de micronúcleo foi feito por meio do método do esfregaço, após exposição dos animais a 5 dias de tratamento. Os resultados fitoquímicos demonstraram presença de açúcares redutores, fenóis e taninos, proteínas e aminoácidos, flavonóides, alcalóides, depsídeos e depsídonas e derivados de cumarina em ambos os órgãos; saponinas espumídicas e esteroides e triterpenos nas folhas e glicosídeos cardiotônicos e antraquinônicos nas inflorescências. Para a DL₅₀ a folha demonstrou-se atóxica e a inflorescência moderadamente tóxica. Para o teste de

micronúcleo, os resultados indicaram ausência de citotoxicidade e genotoxicidade dose-dependente para as folhas e independente da dose para as inflorescências. Assim, esses resultados sugerem que a planta, nas condições analisadas, possui potencial para induzir danos ao DNA.

Palavras-chave: *Erythrina mulungu*, fitoquímica, DL50, teste de micronúcleo em roedores

ABSTRACT: Study phytochemical and mutagenic analysis of the leaves and inflorescences of *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth) through the micronucleus test in rodents - This paper aimed to investigate the phytochemical composition, median lethal dose (LD₅₀) and assess the potential genotoxic and mutagenic effects of hydroalcoholic extract of leaves and inflorescences of *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth through the micronucleus test in mice. The preliminary phytochemical was accomplished through reactions with change of color and/or formation of precipitate; the LD₅₀ by the intraperitoneal administration of 3 concentrations of the extracts, assessing the number of deaths after 48 hours and micronucleus test was done by the method of smear, after exposure of animals to 5 days of treatment. The results phytochemicals showed presence of reducing sugars, phenols and tannins, proteins and amino acids, flavonoids, alkaloids, depsides and depsidones derived from coumarin in both organs; saponins and steroids and triterpenes in the leaves and cardiac and anthraquinones glycosides in inflorescences. For the LD₅₀ leaves are non toxic and inflorescence is moderately toxic. To micronucleus test, the results demonstrated absence of cytotoxicity and genotoxicity dose-dependent for the leaves and independent of the dose to the inflorescence. Thus, these results suggest that the plant under the conditions tested, has the potential to cause damage to DNA.

Key words: *Erythrina mulungu*, phytochemical, LD₅₀, micronucleus test in rodents

INTRODUÇÃO

A utilização de espécies vegetais para o tratamento, cura ou prevenção de doenças é uma prática terapêutica bastante antiga, que atualmente tem sido revalorizada (Carvalho, 2004; Bieski, 2005; Turolla & Nascimento, 2006) e segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial a utilizam *in natura* ou através de formulações medicamentosas como principal recurso no atendimento básico de saúde (Elisabetsky, 2002).

A *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth., encontrada na parte central do Brasil e popularmente conhecida como mulungu, é uma espécie utilizada para diferentes ações farmacológicas, atuando principalmente, como sedativa e hipotensiva (Lorenzi & Matos, 2002). O extrato das folhas e das inflorescências, bem como tinturas dessas partes, compõem formulações fitoterápicas nacionais e internacionais, apesar da escassez de estudos farmacológicos, clínicos e toxicológicos que estabeleçam padrões de qualidade para as diversas preparações utilizadas.

Tais estudos são extremamente importantes, pois ainda existe a crença de que as plantas medicinais, por serem utilizadas a milhares de anos, apresentam eficácia comprovada e ausência de efeitos colaterais e riscos à saúde. Contudo, o uso de produtos derivados de plantas, pode levar a diversos agravos à saúde, como reações alérgicas, reações tóxicas, efeitos adversos e efeitos mutagênicos (Alves, 2004), já que muitas plantas que possuem poder curativo, podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (Capasso et al. 2000), que podem desencadear reações adversas devido aos seus próprios componentes ou pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas (Silva et al., 2001).

Esses agravos à saúde podem representar efeitos imediatos, facilmente associados à ingestão do produto vegetal, mas também, podem se instalar a longo prazo

e de forma assintomática, como os carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos (Lapa et al., 2007).

Além disso, as drogas vegetais podem apresentar interações medicamentosas com drogas sintéticas e outras drogas vegetais, e conseqüentemente induzirem a erro médico no diagnóstico, já que muitas vezes a automedicação com plantas medicinais não é informada ao médico (Veiga Junior et al., 2005).

Dessa forma, faz-se necessário que os produtos fitoterápicos sejam tratados como medicamentos, e sejam submetidos a estudos científicos para a avaliação de sua eficácia e segurança, a fim de legitimá-los como recurso terapêutico benéfico e eficaz para a humanidade e de se estabelecer padrões de identidade e qualidade para as diversas preparações utilizadas.

Dentre os testes utilizados para a avaliação da genotoxicidade e/ou mutagenicidade, o teste de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* é amplamente aceito e recomendado pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte de uma bateria de testes para avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos, visando detectar e quantificar a ação mutagênica e/ou anti-mutagênica de agentes indutores (Choy, 2001 apud Ribeiro, 2003; Fagundes et al., 2005; Leite et al., 2006).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar a composição fitoquímica, estabelecer a dose letal média (DL₅₀) e avaliar os potenciais efeitos mutagênicos e genotóxicos do extrato hidroalcoólico de folhas e inflorescências de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth por meio do teste de micronúcleo com camundongos.

MATERIAL E MÉTODO

Material botânico

Os galhos da planta *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth foram coletados no Horto Municipal de Vitória, localizado no município de Cariacica-ES, Brasil.

Obtenção do extrato

Para obtenção do extrato hidroalcoólico, as inflorescências e as folhas foram submetidas à secagem em estufa, com circulação de ar, à 40 °C, e após completamente secas, as mesmas foram pulverizadas, utilizando-se um moedor elétrico.

Os extratos foram obtidos através da maceração de 60 g do pó da folha e da inflorescência em 700 mL de etanol 70%, a temperatura ambiente (25 a 30°C), e ao abrigo da luz, por 72 horas. Após esse período, foi realizada a filtração a vácuo dos extratos em rota-evaporador a pressão reduzida e temperatura de 60°C, com a finalidade de remover o solvente (álcool 70%) sem alteração dos componentes químicos dos extratos. Os extratos foram levados à estufa para completa secagem e mantidos na geladeira até o momento da realização dos protocolos experimentais. As concentrações dos extratos utilizadas neste estudo foram baseadas na massa seca do extrato. Os extratos foram dissolvidos em água destilada para obtenção das frações aquosas.

Prospecção fitoquímica

A partir dos extratos hidroalcoólicos das folhas e inflorescências foram realizadas reações para detecção preliminar de alguns grupos de constituintes dos metabólitos secundários dos vegetais, como, saponina espumídica, açúcares redutores, polissacarídeos, fenóis e taninos, proteínas e aminoácidos, flavonóides e suas classes, alcalóides, depsídeos e depsidonas, derivado de cumarina, esteróides e triterpenóides, glicosídeos cardiotônicos e glicosídeos antraquinônicos, segundo metodologia de Barbosa (2001).

Estabelecimento da dose letal média (DL₅₀)

Para estabelecimento da dose letal média (DL₅₀) foram usados camundongos (30-50g), obtidos no Biotério da Universidade Federal do Espírito Santo e realizada a metodologia de Litchfield e Wilcoxon (1949 apud Garín-Aguilar et al., 2000). Os animais foram divididos em três grupos experimentais (n=10), mantidos em gaiolas e, tratados com a o extrato hidroalcoólico de *Erythrina mulungu*, em diferentes doses (250, 500 e 1000 mg/kg), por via intraperitoneal, em delineamento inteiramente casualizado. O volume administrado da dose foi proporcional à massa corpórea de cada animal. Os animais foram mantidos em local com temperatura e ciclo noite-dia controlados, e alimentação *ad libitum*. Após 48 horas foram observados e contado o número de óbitos.

Teste de micronúcleo

Para a realização da análise de micronúcleos foram utilizados camundongos machos e fêmeas, adultos jovens com idade entre 7 a 12 semanas e saudáveis, obtidos no biotério da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram pesados, selecionados ao acaso e separados em diferentes grupos experimentais, sendo 3 machos e 3 fêmeas para cada grupo. Os animais foram mantidos com alimentação *ad libitum* em local com temperatura e ciclo noite-dia controlados.

A preparação do material para posterior análise foi realizada segundo metodologia descrita por Ribeiro (2003). O extrato vegetal foi administrado, em diferentes concentrações (200 e 400 mg/kg), por gavagem, de acordo com o grupo experimental. Foram estabelecidos o grupo controle negativo (CN), que recebeu o veículo (soro fisiológico 0,9%) e o controle positivo (CP), que recebeu ciclofosfamida (50mg/Kg). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e amostras de medula óssea foram coletadas dos fêmures dos animais, logo após o sacrifício, realizando-se o teste do micronúcleo (MN).

Após a retirada da medula óssea do fêmur dos ratos, com auxílio de uma seringa, previamente preenchida com soro fetal bovino, o material foi ressuspenso no soro por várias vezes, com auxílio de uma pipeta Pasteur, até a obtenção de uma suspensão homogênea. A suspensão foi centrifugada, por 5 minutos, a 1000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 0,5 mL de soro fetal bovino.

Pelo método de esfregaço, foram confeccionadas 2 lâminas para cada animal, de cada um dos grupos experimentais. As lâminas foram secas ao ar, fixadas em metanol e após 24 horas foram coradas, pelo método de Leishman, para diferenciar eritrócito policromático (PCE) do eritrócito normocromático (NCE).

O número de eritrócitos, com micronúcleos, foi determinado pela análise de um total de 2000 PCEs para cada animal, sendo 5 animais por tratamento, levando-se em consideração o número de PCEs micronucleados (PCEMN) e a razão PCE/PCE+NCE.

A análise estatística foi realizada através do método Qui-Quadrado (χ^2) (Beiguelman, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da prospecção fitoquímica preliminar das folhas de *Erythrina mulungu* (Tabela 1) indicaram a presença de saponina espumídica, açúcares redutores, fenóis e taninos, proteínas e aminoácidos, flavonóides, alcalóides, depsídeos e depsidonas, derivados de cumarina e esteróides e triterpenóides. As inflorescências (Tabela 1) apresentaram açúcares redutores, fenóis e taninos, proteínas e aminoácidos, flavonóides, alcalóides, depsídeos e depsidonas, derivados de cumarina, glicosídeos cardiotônicos e glicosídeos antraquinônicos.

Observou-se também, que ambas não apresentam em sua composição polissacarídeos e que determinados compostos são exclusivos das inflorescências

(glicosídeos cardiotônicos e glicosídeos antraquinônicos), enquanto outros são das folhas (saponina espumídica e esteróides e triterpenos).

TABELA 1: Ensaio fitoquímico dos extratos hidroalcoólico das folhas e das inflorescências de *Erythrina mulungu* Mart ex. Benth.

ENSAIOS FITOQUÍMICOS	Folha	Inflorescência
Saponina Espumídica	+++	-
Açúcares Redutores	+++	+++
Polissacarídeos	-	-
Fenóis e Taninos	+++	+++
Proteínas e Aminoácidos	+++	+++
Flavonóides	++	+++
Alcalóides		
Drangendorff	+	+
Bouchardat	+	+/-
Mayer	-	-
Ácido Pícrico	-	+
Depsídeos e Depsidonas	+++	+++
Derivados de Cumarina	++	+++
Esteróides e Triterpenóides	+++	-
Glicosídeos Cardiotônicos		
Anel Lactônico	-	+++
Desoxi-Açúcares	-	+++
Glicosídeos Antraquinônicos	-	+

Legenda: (-) negativo, (+/-) falso positivo, (+) fracamente positivo, (++) positivo, (+++) fortemente positivo.

Nas folhas de *E. fusca*, assim como nas folhas de *E. mulungu*, observou-se a presença de alcalóides, flavonóides, cumarinas, saponinas, açúcares redutores e triterpenos/esteróides. Contudo, foi detectado na *E. fusca*, a presença de glicosídeos cardiotônicos, presentes apenas nas inflorescências de *E. mulungu*, e a ausência de fenóis e taninos, presentes tanto nas folhas quanto nas inflorescências de *E. mulungu*. Além disso, observou-se também em *E. fusca*, a presença de lactonas e carotenóides (Pino-Rodrigues et al., 2004).

Assim como nas folhas de *E. mulungu*, nas folhas de *E. velutina* detectou-se alcalóides, flavonóides, esteróides, triterpenóides, fenóis, taninos catéquicos e pirogáticos e saponinas, além da presença de heterosídeos cianogênicos (Araujo Neto, 2008).

Com relação à classe dos flavonóides, observou-se que essas são diferentes entre as folhas e as inflorescências. Nas folhas, observou-se a presença de catequinas e flavona, chalconas e xantonas, enquanto que nas inflorescências ocorreu a presença de

antocianinas e antocianidinas, chalconas e auronas, flavanonóis, leucoantocianidinas e flavanonas (Tabela 2).

TABELA 2: Classe dos flavonóides presentes nos extratos hidroalcolóico das folhas e das inflorescências de *Erythrina mulungu* Mart ex. Benth.

CLASSE DOS FLAVONOÍDES	pH	Folha	Inflorescência
Antocianinas/Antocianidinas	3	-	+
	8.5	-	-
	11	-	-
Flavonas/Flavonóis/Xantonas	11	+	-
Chalconas/Auronas	3	-	+
	11	-	-
Flavanonóis	11	-	+
Leucoantocianidinas	3	-	+
Catequinas	3	+	-
Flavanonas	11	-	+

Legenda: (-) negativo, (+) fracamente positivo.

Na casca do caule de *E. mulungu* foram detectadas flavanonas e leucoantocianidinas, assim como nas inflorescências, e a presença de xantonas, também encontrada nas folhas (Lima et al., 2006).

Nas folhas de *E. velutina*, assim como nas folhas de *E. mulungu*, foram detectados flavonas, flavonóis, xantonas e catequinas. Além disso, a prospecção fitoquímica de *E. velutina* indicou também a presença de auronas, chalconas, flavanonas, flavanonóis e leucoantocianidinas, encontrados nas inflorescências de *E. mulungu* (Araujo Neto, 2008).

No ensaio de toxicidade aguda em camundongos (DL₅₀), realizado com as folhas de *E. mulungu*, após 48 horas de exposição, não foi observado nenhum óbito, o que indica que esse extrato não apresenta uma alta toxicidade aguda.

Da mesma forma, um estudo toxicológico para determinar a toxicidade aguda do extrato aquoso das folhas de *E. velutina*, indicou que a administração aguda é atóxica por via oral em ratos, uma vez que não foram observados mortalidade ou sintomas adversos após a administração da dose limite de 5g/kg (Silva, 2008).

O ensaio utilizando o extrato hidroalcolóico da inflorescência, por sua vez, determinou uma DL₅₀ igual a 1,37 g/Kg (Figura 1), apresentando-se como um agente

moderadamente tóxico, de acordo com a classificação proposta por Hodges & Haggard (apud, Leite & Amorim, 2006).

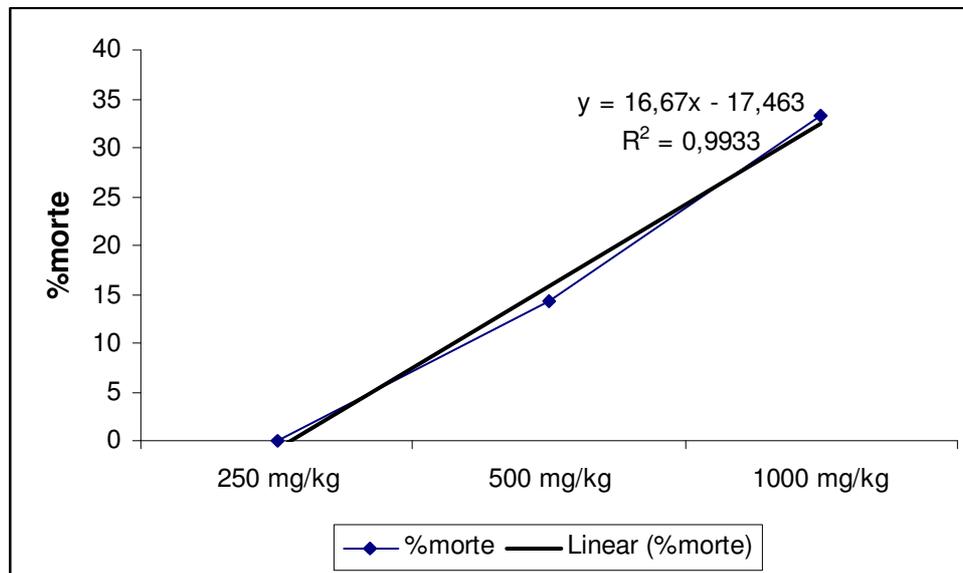


FIGURA 1: Toxicidade aguda em camundongos, frente ao extrato hidroalcoólico das inflorescências de *Erythrina mulungu* Mart ex. Benth, após 48 horas de exposição.

A DL₅₀ da inflorescência de *E. mulungu* apresentou valores intermediários entre o encontrado para a casca de *E. senegalensis* que foi aproximadamente 450 mg/kg (Saidu et al., 2000) e para *E. falcata*, que apresentou uma dose intermediária entre 3,75 g/Kg e 5,0 g/Kg (Cerutti et al., 2000).

Os resultados do presente estudo reforçam que diferentes órgãos vegetais influenciam o conteúdo de metabólitos secundários, alterando não somente a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura (Gobbo-Neto & Lopes, 2007), afetando dessa forma, a qualidade e segurança dos preparados fitoterápicos. Além disso, demonstram a necessidade de selecionar corretamente a parte a ser utilizada para determinada afecção e principalmente, seguir a posologia, a fim de evitar intoxicações ou reações adversas que podem aparecer devido ao emprego de doses inadequadas, modo de preparo incoerente e/ou períodos prolongados.

Em relação ao teste de micronúcleo, também se observou uma diferença de comportamento entre os extratos testados, quanto à indução de incidência de micronúcleos. Os resultados demonstraram que o aumento da incidência de micronúcleos nos animais expostos ao tratamento com extrato hidroalcoólico das folhas de *E. mulungu*, ocorreu de forma dose-dependente, quando comparado ao grupo controle. Além disso, os valores encontrados foram estatisticamente inferiores aos do controle positivo, demonstrando que, apesar do extrato ter capacidade de causar alterações no DNA, ele possui ação genotóxica inferior à ciclofosfamida (Figura 2). Essa diferença de comportamento entre o controle positivo e o extrato analisado, pode ser devido a um distinto mecanismo de ação entre os dois, ou a necessidade de uma concentração de extrato superior à analisada, para produzir efeito similar à ciclofosfamida.

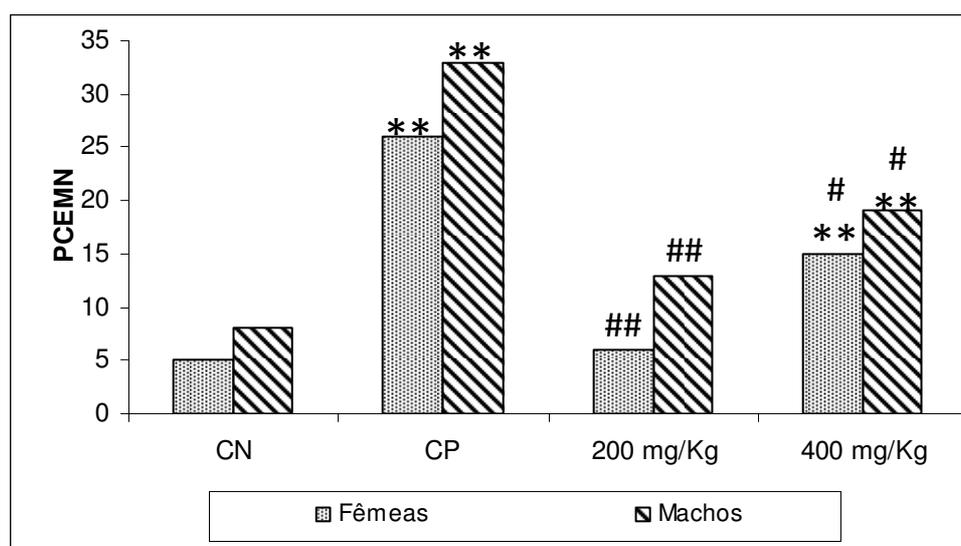


FIGURA 2: Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) em medula óssea de camundongos machos e fêmeas, tratados com 200 mg/kg e 400 mg/kg de extrato hidroalcoólico das folhas de *Erythrina mulungu* Mart ex. Benth. Diferença significativa, pelo teste χ^2 , em relação ao controle negativo: ** $p < 0,01$; Diferença significativa, pelo teste χ^2 , em relação ao controle positivo: # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$.

Nos animais expostos ao tratamento com extrato hidroalcoólico das inflorescências de *E. mulungu*, por sua vez, observou-se que o aumento da incidência de micronúcleos se deu de forma independente entre as doses utilizadas, não apresentando diferença estatística entre elas. Os valores encontrados foram similares àqueles encontrados no grupo de animais expostos à ciclofosfamida (Figura 3).

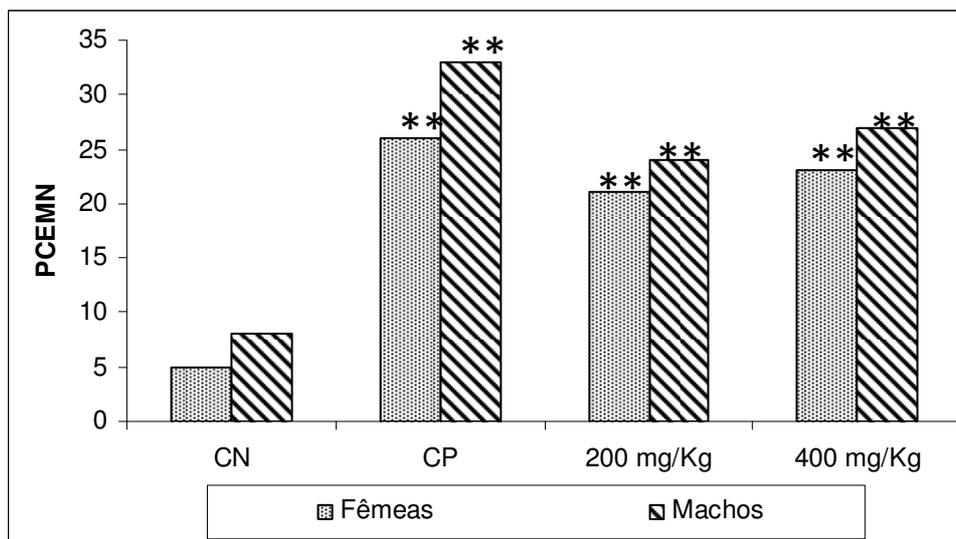


FIGURA 3: Freqüência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) em medula óssea de camundongos machos e fêmeas, tratados com 200 mg/kg e 400 mg/kg de extrato hidroalcoólico das inflorescências de *Erythrina mulungu* Mart ex. Benth. Diferença significativa, pelo teste χ^2 , em relação ao controle negativo: ** $p < 0,01$.

Essa potencialidade genotóxica, encontrada nas folhas e inflorescências de *E. mulungu*, não foi encontrada por Matos & Pantaleão (2008), ao analisarem o extrato alcoólico de *E. velutina*. Os resultados obtidos por esses autores indicam que o extrato das folhas, nas concentrações de 25 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg não apresenta ação genotóxica, pois a incidência de micronúcleos não diferiu significativamente do grupo controle.

Provavelmente os compostos secundários diretamente responsáveis pela genotoxicidade observada foram os alcalóides e/ou flavonóides que são considerados potencialmente mutagênicos, pois a ação terapêutica de alguns deles está associada a sua interação com o DNA (Henriques et al., 1991 apud Sanchez-Lamar et al., 2008). Os taninos, que demonstraram atividade genotóxica causando quebras de fita simples (Labieniec & Gabryelak, 2003), podem ter colaborado com essa mutagenicidade, agindo como mutagênicos ou potencializando os efeitos dos alcalóides e/ou flavonóides.

Assim, observa-se que os efeitos dos produtos naturais resultam da interação entre os compostos químicos presentes no extrato e deles com o sistema biológico, onde os

danos ocasionados por esses compostos estão relacionados com a estrutura química e os elementos presentes na molécula e à variações nas concentrações desses compostos.

Analisando a relação entre a porcentagem de eritrócitos policromáticos (PCE) e o total de eritrócitos (PCE+NCE), do extrato da folha (Figura 4) e da inflorescência (Figura 5) de *E. mulungu*, não se constatou diferença significativa em relação ao controle negativo, em nenhum dos extratos.

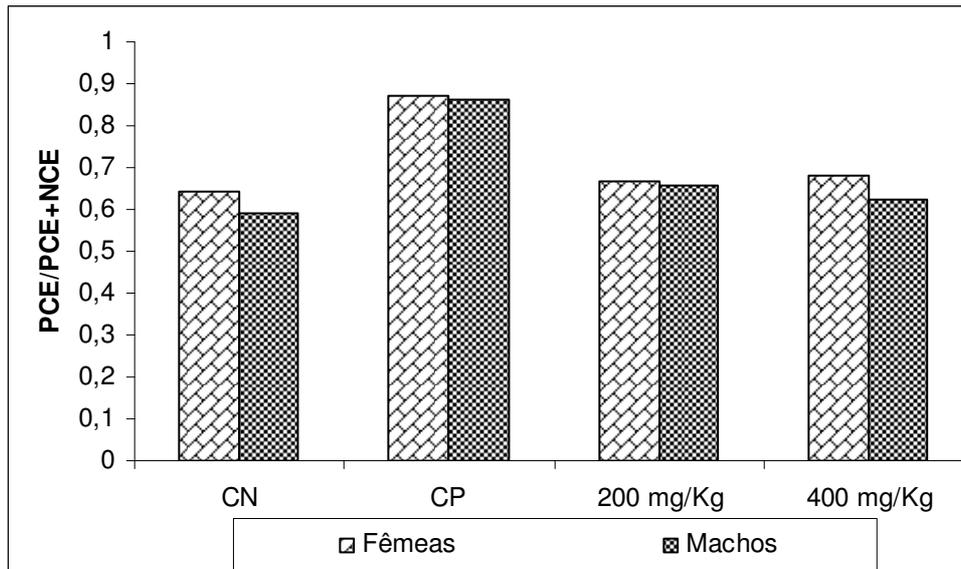


FIGURA 4: Relação entre eritrócitos policromáticos (PCE) e o total de eritrócitos (PCE+NCE) em medula óssea de camundongos machos e fêmeas, tratados com 200 mg/kg e 400 mg/kg de extrato hidroalcoólico das folhas de *Erythrina mulungu* Mart ex. Benth.

A razão PCE/PCE+NCE pode indicar a toxicidade de uma substância, pois o decréscimo dessa relação indica que a substituição dos PCE, originados do eritoblasto, está deprimida. Dessa forma, esses resultados, que não demonstram redução na relação, indicam que os extratos analisados não estão afetando a maturação dos PCE, nem a sua formação no ciclo mitótico seguinte, não exibindo atividade citotóxica.

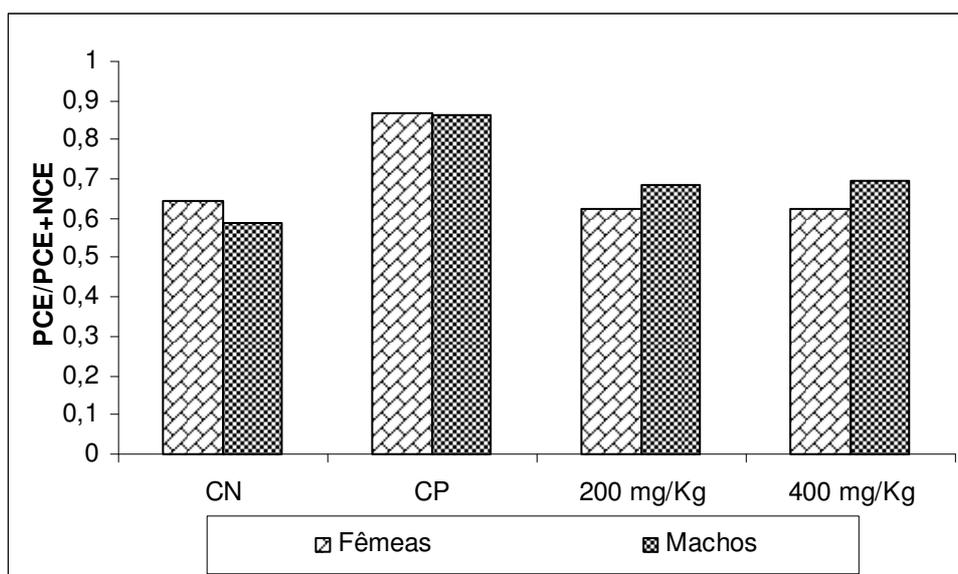


FIGURA 5: Relação entre eritrócitos policromáticos (PCE) e o total de eritrócitos (PCE+NCE) em medula óssea de camundongos machos e fêmeas, tratados com 200 mg/kg e 400 mg/kg de extrato hidroalcoólico das inflorescências de *Erythrina mulungu* Mart ex. Benth.

Assim, observa-se que apesar da folha e inflorescência apresentarem resposta diferenciada com relação à DL_{50} , ambas apresentaram ausência de citotoxicidade em medula óssea de roedores. Contudo, folha e inflorescência demonstraram, nas concentrações utilizadas, capacidade de alteração no DNA, sendo essa característica dose-dependente e independente da dose, respectivamente, caracterizando-as como potencialmente genotóxicas.

AGRADECIMENTO

Ao Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória – FACITEC, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALVES, N. D. da C. **Avaliação da adequação técnica das indústrias de medicamentos fitoterápicos e officinais do estado do Rio de Janeiro a partir dos instrumentos regulamentatórios específicos**. 2004. 83 p. Dissertação (Programa de Pós Graduação

em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz.

ARAUJO NETO, V. et al. **Prospecção fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante do extrato das folhas de *Erythrina Velutina Willd.*** In: 18^o Encontro de Iniciação Científica e 4^o Encontro de Pós-Graduação, Universidade Federal de Sergipe, 2008. Disponível em: <www.posgrap.ufs.br/down/Livro_Resumos_18EIC_4EPG.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2008.

BARBOSA, W. L. R. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Revista Científica da UFPA**, v.4, p.1-19, 2004.

BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. 5.ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2006. 274 p.

BIESKI, I. G. C.; **Plantas medicinais e aromáticas no sistema único de saúde da região sul de Cuiabá- MT**. 2005. 92 p. Monografia (Graduação *Lato Sensu* em Plantas Medicinais: manejo, uso e manipulação) - Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAPASSO, R. et al. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v.71, p.S58-S65, 2000.

CARVALHO, J. E. de. Toxicidade pré-clínica: fitoterápicos e alimentos com propriedades funcionais ou de saúde. 2004. Disponível em: <www.abma.com.br/2004/notes/205.pdf>. Acesso em: 7 mar. 2008.

CERUTTI, S. M. et al. Análise da toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico bruto de *Erythrina falcata* em camundongos (*Mus musculus*). **Revista de Farmácia e Biologia [Lecta-USF](#)**, v.18, n.2, p.75-83, jul./dez. 2000.

ELISABETSKY, E. Resenha: Fitoterapia com base científica. **Ciência Hoje**, v.31, n.182, p.78-79, mai. 2002.

FAGUNDES, F. A. et al., *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos.

Revista Eletrônica de Farmácia, v.2, n.1, p.24-29, 2005.

GARÍN-AGUILAR, M. E. et al. Effect of crude extracts of *Erythrina americana* Mill. on aggressive behavior in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.69, p.189-194, 2000.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 371-381 , mar./abr. 2007.

LABIENIEC, M., GABRYELAK, T. Effects of tannins on chinese hamster cell line B14.

Mutation Research, v.539, n.1, p.127-135, 2003.

LAPA, A. J. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al.

Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS;

Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p.247-262.

LEITE, E. M. A.; AMORIM, L. C. A. Noções básicas de Toxicologia. Universidade Federal de Minas Gerais. 2006. Disponível em:

<<http://www.farmacia.ufmg.br/lato/Apostila%20Toxicologia%20Geral%20.doc>>. Acesso em: 10 mar. 2008.

LEITE, K. R. et al. Avaliação da atividade mutagênica e genotóxica de *Ginkgo biloba* L.

pelo teste do micronúcleo em camundongos. **Revista de Biologia Neotropical**, v.3, n.2, p.157-162, 2006.

LIMA, M. R. F. de et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p.137-147, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 544 p.

MATOS, F. de S.; PANTALEÃO, S. de M. **Avaliação do efeito genotóxico de *Erythrina velutina* pelo teste de micronúcleo *in vivo***. In: 18º Encontro de Iniciação Científica e 4º

Encontro de Pós-Graduação, Universidade Federal de Sergipe, 2008. Disponível em:

<www.posgrap.ufs.br/down/Livro_Resumos_18EIC_4EPG.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2008.

- PINO-RODRIGUEZ, S. et al. Preliminary phytochemical screening and in vitro antitumor activity of *Erythrina fusca* Lour. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.23, n.2, p.453-458, 2004.
- RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p.173-200.
- SAIDU, K. et al. Antiplasmodial, analgesic, and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the stem bark of *Erythrina senegalensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.275–280, 2000.
- SANCHEZ-LAMAR, A. et al. Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, p.416–422, 2008.
- SILVA, S. R. et al. **Plantas medicinais do Brasil**: aspectos gerais sobre legislação e comércio. Brasília: Ministério de Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Alemanha e IBAMA, 2001.
- TUROLLA, M. S. dos R.; NASCIMENTO, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.2, p. 289-306, abr./jun., 2006.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C, MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Revista Química Nova**, v.28, n.3, p. 519-528, mai./jun. 2005.
- SILVA, F. T. **Avaliação clínica da potencial atividade ansiolítica do extrato seco de *Erythrina velutina***. 2008. 22 p. Relatório Final (Projeto de Pesquisa) – Laboratório de Fisiologia do Comportamento, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.
- Disponível em: <www.fapitec.se.gov.br/modules/wfdownloads/visit.php?cid=11&lid=234>.
- Acesso em: 10 nov. 2008.

Potenciais efeitos alelopáticos e mutagênicos de *Erythrina mulungu* (Mart ex. Benth) em *Allium cepa* (L.)

Ana Paula De Bona^{(1)*}, Maria do Carmo Pimentel Batitucci⁽¹⁾, Marcieni Ataíde de Andrade⁽²⁾

* E-mail: apdebona@yahoo.com.br; tel: 27 3335-7495

(1) Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, nº 1468, Campus de Maruípe, 29040-090, Vitória, ES. (2) Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, nº 1468, Campus de Maruípe, 29040-090, Vitória, ES.

RESUMO: O presente trabalho visou avaliar os potenciais efeitos alelopáticos e mutagênicos dos extratos hidroalcoólicos de folhas e inflorescências de *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth.) sobre *Allium cepa* (L.). A análise alelopática, consistiu de 8 tratamentos (0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6 mg/mL e água destilada) com cinco repetições de 20 sementes cada. As variáveis analisadas foram velocidade de germinação (IVG), primeira contagem, porcentagem de germinação (G) e média radicular. Para a análise mutagênica, as sementes foram submetidas ao tratamento contínuo e descontínuo (20 e 72 horas) para 2 concentrações (0,4 e 0,6 mg/mL) dos extratos e para a água destilada (CN). Os resultados indicaram atividade alelopática das folhas e inflorescências sobre o crescimento da raiz. Com relação à atividade mutagênica, observou-se redução do índice mitótico e ausência de efeito aneugênico em ambos os órgãos e presença de efeito clastogênico nas inflorescências.

Unitermos: *Erythrina mulungu*, alelopatia, mutagênese, *Allium cepa*

ABSTRACT: “Potential allelopathic and mutagenic effects of *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth.) in *Allium cepa* (L).” This study aimed to assess the potential allelopathic and mutagenic effects of hydroalcoholic extracts of leaves and inflorescences of *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth.) on *Allium cepa* (L.). The analysis allelopathy consisted of 8 treatments (0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6 mg/mL and distilled water) with five repetitions of 20 seeds each. The variables were analyzed germination speed, the first count, the germination percentage and the media root. For the mutagenic analysis, the seeds were submitted to the continuous and discontinuous treatment (20 and

72 hours) for 2 concentrations (0,4 and 0,6 mg/mL) of the extracts and the distilled water. The results indicated allelopathic activity of the leaves and inflorescences on the growth of root. Regarding the mutagenic activity, was observed reduction of mitotic index and lack of aneugenic effect in both bodies and presence of clastogenic effect on the inflorescences.

Keywords: *Erythrina mulungu*, allelopathy, mutagenesis, *Allium cepa*

INTRODUÇÃO

Atualmente, a fitoterapia tem sido revalorizada (Carvalho, 2004; Bieski, 2005; Turolla; Nascimento, 2006) e segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 80% da população mundial, a utilizam *in natura* ou através de formulações medicamentosas como principal recurso no atendimento básico de saúde (Elisabetsky, 2002). Isto se deve ao fato de ser um tratamento acessível e classificado, de acordo com o senso comum, como natural, não perigoso à saúde e isento de reações adversas e/ou contra-indicações.

Contudo, muitas plantas que possuem poder curativo podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (Capasso et al., 2000), podendo levar a diversos tipos de agravos à saúde, tais como, reações alérgicas ou tóxicas, efeitos adversos, interações medicamentosas e efeitos mutagênicos (Alves, 2004). Esta toxicidade é atribuída à diversidade de compostos químicos oriundos do metabolismo secundário, que atuam tanto como princípios ativos em medicamentos (Ferreira; Aquila, 2000) quanto como compostos tóxicos, causando toxicidade sobre várias plantas e/ou animais (Chou; Kuo, 1986 apud Souza et al., 2005).

A *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth., planta encontrada na parte central do Brasil e popularmente conhecida como mulungu, é uma espécie utilizada farmacologicamente como sedativa e hipotensiva (Lorenzi; Matos, 2002) e pertence ao gênero escolhido como árvore-símbolo da Embrapa Agrobiologia, devido às inúmeras aplicações ligadas à agroecologia, sendo recomendado como moirão vivo, no enriquecimento e arborização de pastagens, na recuperação de matas ciliares e de ecossistemas degradados e na manutenção da fauna silvestre (Neves, 2006).

Contudo, é um gênero composto por espécies que manifestam tanto potencial tóxico quanto alelopático.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os potenciais efeitos alelopáticos e mutagênicos dos extratos hidroalcoólicos de folhas e inflorescências de *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth.) sobre a germinação, desenvolvimento inicial e índice mitótico de *Allium cepa* (L.).

MATERIAL E MÉTODOS

Folhas e Inflorescências de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth foram coletados no Horto Municipal de Vitória, localizado no município de Cariacica-ES. Os extratos hidroalcoólicos, foram obtidos através da maceração de 60 g do pó da folha e da inflorescência em 700 mL de etanol 70%, a temperatura ambiente (25 a 30°C), e ao abrigo da luz, por 72 horas. Após esse período, foi realizada a filtração a vácuo dos extratos e a fase líquida foi submetida à rotaevaporação a pressão reduzida e temperatura de 60°C. Os extratos foram levados à estufa para completa secagem e mantidos na geladeira até o momento da realização dos protocolos experimentais. As concentrações e doses dos extratos utilizadas neste estudo foram baseadas em sua massa seca. Os extratos foram dissolvidos em água destilada para obtenção das frações aquosas.

Para a análise alelopática, as sementes de cebola foram acondicionadas em placas de petri, forradas com papel filtro, e embebidas diretamente em extrato vegetal (nas concentrações de 0,6 mg/mL; 0,4 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,05 mg/mL e 0,025 mg/mL) e em água destilada (controle negativo). O delineamento foi inteiramente casualizado, composto de 8 tratamentos e cinco repetições com 20 sementes cada.

As variáveis analisadas foram índice de velocidade de germinação (IVG), teste de primeira contagem, porcentagem de germinação (G) e média da radícula. As sementes foram consideradas germinadas quando a protrusão da radícula através do tegumento se tornou visível (Adegas; Voll; Prete, 2003; Alves et al., 2004). As contagens foram diárias e no mesmo horário até o 6º e 12º dia

após a implantação do experimento para o teste de primeira contagem e porcentagem de germinação, respectivamente (Souza, 2005).

A porcentagem de germinação foi calculada de acordo com Labouriau; Valadares (1976, apud Linhares et al., 2005):

$$G = \frac{\text{número total de sementes germinadas}}{\text{número total de sementes colocadas a germinar}} \times 100$$

A determinação do índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes foi feita conforme Maguire (1962, apud Fontes; Davide; Davide, 2001; Adegas et al., 2003) através da fórmula:

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \frac{G_3}{N_3} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$$

Onde G_1 , G_2 , G_3 e G_n correspondem ao número de sementes germinadas no 1º, 2º, 3º e último dia do experimento, e N_1 , N_2 , N_3 e N_n correspondem ao número de dias após a implantação do experimento.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias através do teste de Tukey, com $\alpha \geq 0,05$ para as diferenças estatísticas significativas, utilizando-se o pacote computacional ASSISTAT (Silva, 2007).

Para a análise mutagênica, as sementes de cebola foram submetidas a dois tipos de tratamentos: 1- Tratamento Contínuo: embebição e germinação das sementes diretamente na água destilada (controle negativo) e nos extratos vegetais (0,4 mg/mL e 0,6 mg/mL); 2. Tratamento Descontínuo: sementes inicialmente germinadas em água destilada até atingirem cerca de 1 cm de protusão radicular, sendo posteriormente transferidas para os tratamentos com os extratos (0,4 mg/mL e 0,6 mg/mL). Após 20 horas (tratamento agudo), algumas sementes foram coletadas aleatoriamente e o restante permaneceu recebendo o tratamento correspondente por 72 horas (tratamento crônico). As raízes foram fixadas em Carnoy 3:1 (álcool:ácido acético) por 24 horas à temperatura ambiente e, após esse período foram acondicionadas na geladeira.

A preparação do material para posterior análise foi realizada segundo metodologia descrita por Fontes, Davide e Davide (2001), com algumas modificações. Para a preparação citológica, as raízes foram lavadas em água destilada e submetidas à hidrólise com HCl 1N a 60°C por 5 minutos. Após esse período as raízes foram lavadas em água destilada e coradas com reagente de Schiff por 2 horas em local escuro. Todas as lâminas foram confeccionadas pelo método do esmagamento suave (Guerra; Souza, 2002), e a região meristemática excisada foi macerada em 1 gota de carmim acético 1%. As lamínulas foram descoladas em nitrogênio líquido e as lâminas foram tornadas permanentes utilizando-se entellan.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, com objetiva de aumento de 40X. Para cada lâmina foram avaliadas 1000 células, perfazendo um total de 5000 células por tratamento.

As células foram analisadas quanto à presença de alterações morfológicas e cromossômicas. Para análise do efeito citotóxico foi utilizado o Índice Mitótico (IM) e para análise do efeito genotóxico foram usados o Índice de Efeito Aneugênico (IEA) e Índice de Efeito Clastogênico (IEC).

O IM foi determinado através da fórmula:

$$\text{IM} = \frac{\text{número de células em divisão} \times 100}{\text{total de células analisadas}}$$

Calculou-se o IEA, considerando-se anáfase multipolar, c-metáfase, aderência, atraso, célula binucleada e perda como células aneugênicas, através da fórmula:

$$\text{IEA} = \frac{\text{número de células aneugênicas} \times 100}{\text{total de células analisadas}}$$

Considerou-se ponte, quebra, micronúcleo e morte celular como células clastogênicas e calculou-se o IEC através da fórmula:

$$\text{IEC} = \frac{\text{número de células clastogênicas} \times 100}{\text{total de células analisadas}}$$

A análise estatística foi realizada através do método Qui-Quadrado (χ^2) (Beiguelman, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas sementes de cebola tratadas com o extrato das folhas de *E. mulungu*, observou-se que a porcentagem de germinação não foi afetada pelas diferentes concentrações. Contudo, o teste de primeira contagem e o índice de velocidade de germinação, indicativos de vigor das sementes, revelaram diferenças significativas, principalmente na maior concentração analisada. Da mesma forma, observou-se uma tendência de redução do crescimento normal da raiz, com o aumento da concentração (Tabela 1).

Inserir Tabela 1: Teste de Primeira Contagem (PC), Porcentagem de Germinação (G), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Comprimento da Radícula (CR) de sementes de *Allium cepa* (L.) submetidas a tratamento com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da folha de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth.

Nas sementes de cebola tratadas com o extrato das inflorescências, não se observou alteração na porcentagem de germinação, bem como no teste de primeira contagem e no índice de velocidade de germinação. O comprimento da radícula, por sua vez, apresentou redução em relação ao crescimento normal, porém, não foi dose-dependente (Tabela 2).

Inserir Tabela 2: Teste de Primeira Contagem (PC), Porcentagem de Germinação (G), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Comprimento da Radícula (CR) de sementes de *Allium cepa* (L.) submetidas a tratamento com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da inflorescência de *Erythrina. mulungu* Mart. ex Benth.

Os dados de porcentagem de germinação são corroborados por Payne & Foley (1992, apud García-Mateos; Peña-Valdivia; Soto-Hernandez, 2002), os quais observaram que o extrato da semente de *E. americana* não inibiu a germinação do milho e do feijão e por Soares et al. (2002) e Virtuoso (2005), que observaram, respectivamente, que extrato das folhas de *E. speciosa* e os extratos e frações das cascas de *E. velutina* não inibiram a germinação de sementes de alface.

Resultados similares, em relação ao desenvolvimento normal da plântula, foram encontrados por Anthofer, Hanson e Jutzi (1998), que detectaram efeitos inibidores de *E. abyssinica* sobre o desenvolvimento de plântulas de trigo e por Soares et al. (2002) e Virtuoso (2005) que evidenciaram, respectivamente, o efeito alelopático de folhas de *E. speciosa* e casca de *E. velutina* sobre o desenvolvimento de plântulas de alface. Esses resultados ratificam o fato de muitas vezes o

efeito alelopático não incidir sobre a porcentagem de germinação, mas sim sobre a sua velocidade ou outro aspecto do processo (Ferreira; Aquila, 2000).

Dessa forma, um método eficiente para avaliar o efeito alelopático é a análise do índice mitótico, pois a redução do crescimento da planta é associada a uma forte inibição da mitose e/ou rompimento da estrutura das organelas (Almeida et al., 2008). Esse conhecimento é importante pois compostos alelopáticos podem ter potencial genotóxico e mutagênico (Nunes e Araújo, 2003 apud Souza et al., 2005).

A análise do índice mitótico do tratamento contínuo (figura 1) demonstrou redução desse índice em ambos os órgãos analisados, sendo obtido valores inferiores para o tratamento com as inflorescências. O efeito dos extratos, nas concentrações testadas, foi suficiente para retardar os processos de prolongamento da raiz.

Esses resultados são, em parte, distintos dos encontrados por De Bona (2006). A autora, analisando a tintura de *E. mulungu*, produzida a partir das folhas, não observou, na menor dose utilizada (60 mg/mL), diferença significativa do índice mitótico em relação à água destilada. Contudo foi detectada uma redução do desenvolvimento radicular normal. Além disso, as maiores concentrações (120 mg/mL e 240 mg/mL) inibiram a germinação da semente. Dessa forma, pode-se sugerir que o efeito alelopático da tintura sobre a germinação da semente, foi ocasionada pelo teor de álcool no fitoterápico.

Inserir Figura 1: Índice Mitótico (%) do controle negativo (CN) e das diferentes concentrações (0,4 e 0,6 mg/mL) dos extratos hidroalcoólicos de inflorescências e de folhas de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth. mediante tratamento contínuo. Diferença significativa em relação ao controle negativo: ** $p < 0,01$; Diferença significativa em relação à concentração de 0,4 mg/mL: # $p < 0,05$.

O índice de efeito aneugênico das folhas e das inflorescências e o índice de efeito clastogênico das folhas não diferiu estatisticamente do controle, em nenhuma das concentrações analisadas. Por outro lado, o índice de efeito clastogênico das inflorescências, apresentou valores superiores ao controle negativo apenas na concentração de 0,4 mg/mL (tabela 3). Esse resultado deveu-se à presença de células em morte celular, que pode ter contribuído para a redução do índice mitótico nessa concentração.

Inserir Tabela 3: Índice de Efeito Aneugênico – IEA (%) e Índice de Efeito Clastogênico – IEC (%) do controle negativo (CN) e das diferentes concentrações (0,4 e 0,6 mg/mL) dos extratos hidroalcoólicos de inflorescências e de folhas de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth. mediante tratamento contínuo. Diferença significativa em relação ao controle negativo: ** p<0,01.

A ausência de efeitos aneugênicos e clastogênicos nas folhas, coincide com a ausência dos mesmos na tintura (De Bona, 2006), indicando que as folhas, mediante tratamento contínuo, não apresentam propriedades clastogênicas e aneugênicas.

No tratamento descontínuo com o extrato das folhas de *E. mulungu*, houve redução significativa do índice mitótico em ambas as concentrações no tratamento de 72 horas, e para o tratamento 0,6 mg/mL de 20 horas (Figura 2).

Inserir Figura 2: Índice Mitótico (%) do controle negativo (CN) e das diferentes concentrações (0,4 e 0,6 mg/mL) do extrato hidroalcoólico de folhas de *Erythrina mulungu* Mart. Ex Benth. mediante tratamento descontínuo agudo (20 h) e crônico (72 h). Diferença significativa em relação ao controle negativo: ** p<0,01.

Da mesma forma, o tratamento descontínuo com as duas maiores doses da tintura (120 mg/mL e 240 mg/mL), apresentou redução do índice mitótico (De Bona, 2006). Assim, os dados permitem sugerir que a interferência da tintura na divisão celular, com conseqüente efeito sobre o desenvolvimento radicular, é ocasionada pelo composto vegetal, com contribuição do álcool presente na formulação do fitoterápico.

Para os índices de efeito aneugênico e clastogênico não houve diferença estatística entre as concentrações do extrato das folhas analisadas e a água destilada (tabela 4).

Inserir Tabela 4: Índice de Efeito Aneugênico – IEA (%) e Índice de Efeito Clastogênico – IEC (%) do controle negativo (CN) e das diferentes concentrações (0,4 e 0,6 mg/mL) do extrato hidroalcoólico de folhas de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth. mediante tratamento descontínuo agudo (20 h) e crônico (72 h).

Esses resultados são, em parte, similares aos encontrados por De Bona (2006), que não observou efeito aneugênico nas doses expostas aos tratamento agudo e crônico. Porém, indicou presença de efeito clastogênico, causada pela incidência de micronúcleos, quebras, células com núcleo anormal, células em processo de morte celular e células em divisão com aspecto alterado, dependendo da dosagem analisada. Assim, possivelmente, esse efeito clastogênico observado no tratamento com a tintura pode ser atribuído ao álcool.

Com relação ao extrato das inflorescências de *Erythrina mulungu*, houve redução significativa do índice mitótico e uma tendência à diminuição da mesma com o aumento da concentração (figura 3).

Inserir Figura 3: Índice Mitótico (%) do controle negativo (CN) e das diferentes concentrações (0,4 e 0,6 mg/mL) do extrato hidroalcoólico de inflorescências de *Erythrina mulungu* Mart. Ex Benth. mediante tratamento descontínuo agudo (20 h) e crônico (72 h). Diferença significativa em relação ao controle negativo: ** p<0,01.

Apesar de tanto a inflorescência quanto as folhas incidirem sobre o ciclo celular de cebola, observou-se que o extrato das folhas é menos citotóxico que o das inflorescências.

Com relação ao índice de efeito aneugênico, não foram observadas alterações significativas das concentrações expostas aos tratamentos agudo e crônico em relação ao controle. Contudo, o índice de efeito clastogênico, que não diferiu do controle no tratamento de 20 horas, apresentou aumento significativo no tratamento de 72 horas, em ambas as concentrações analisadas. O índice teve significância devido à presença de células em processo de morte celular, e apresentou tendência de aumento com a concentração (tabela 5).

Inserir Tabela 5: Índice de Efeito Aneugênico – IEA (%) e Índice de Efeito Clastogênico – IEC (%) do controle negativo (CN) e das diferentes concentrações (0,4 e 0,6 mg/mL) do extrato hidroalcoólico de inflorescências de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth. mediante tratamento descontínuo agudo (20 h) e crônico (72 h). Diferença significativa em relação ao controle negativo: ** p<0,01.

Dentre os compostos com atividade alelopática, as folhas possuem saponinas, fenóis, taninos, flavonóides, alcalóides e cumarinas que podem ser os responsáveis pelo potencial alelopático apresentado por ela no crescimento inicial de cebola. As inflorescências, por sua vez, possuem metabólitos capazes de alterar a permeabilidade da membrana plasmática das células meristemáticas de *Allium cepa* ou capazes de atuar no citoesqueleto dessas células, levando-as à morte. Esse efeito pode ser devido a presença de fenóis, taninos, flavonóides, alcalóides, cumarinas e glicosídeos.

Assim, esses resultados demonstram a existência de um padrão diferenciado de síntese e/ou conteúdo de substâncias alelopáticas entre os órgãos, o que acarreta uma toxicidade diferencial das substâncias alelopáticas entre as folhas e as inflorescências. Além disso, para um manejo mais

adequado de áreas degradadas ou agrícolas, é importante que o emprego de *E. mulungu* seja efetuado de forma cautelosa, pois o efeito alelopático pode ocorrer sobre as demais espécies, prejudicando o estabelecimento das mesmas e reduzindo a eficiência dos reflorestamentos.

Em suma, a análise desses dados permite apontar, que tanto o extrato hidroalcoólico das folhas, quanto o das inflorescências, nas concentrações analisadas, apresentam atividade alelopática sobre o desenvolvimento da cebola e não apresentam-se como agentes aneugênicos, uma vez que não induzem alterações no fuso mitótico. Todavia, o extrato das inflorescências, diferente do das folhas, demonstra um potente efeito mutagênico, visto pelo aumento da incidência de alterações na estrutura do cromossomo.

AGRADECIMENTO

Ao Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do Município de Vitória – FACITEC, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

Adegas FS, Voll E, Prete, CEC 2003. Embebição e germinação de sementes de picão preto (*Bidens pilosa*). *Planta Daninha* 21(1): 21-25.

Ameida GD et al 2008. Estresse oxidativo em células vegetais mediante aleloquímicos. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. 61(1):4237-4247.

Alves M da CS et al 2004. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. *Pesq Agropec Bras* 39(11):1083-1086.

Alves ND da C 2004. *Avaliação da adequação técnica das indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinais do estado do Rio de Janeiro a partir dos instrumentos regulamentatórios específicos*. Rio de Janeiro, 83 p. Dissertação de Mestrado Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz.

- Anthofer J, Hanson J, Jutzi SC 1998. Wheat growth as influenced by application of agroforestry-tree prunings in Ethiopian highlands. *Agroforestry Systems* 40:1–18.
- Beiguelman B 2006. *Curso Prático de Bioestatística*. 5.ed. Ribeirão Preto: FUNPEC.
- Bieski IGC 2005. *Plantas medicinais e aromáticas no sistema único de saúde da região sul de Cuiabá- MT*. Lavras, 92 p. Monografia Graduação *Lato Sensu* em Plantas Mediciniais: manejo, uso e manipulação, Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras.
- Capasso R. et al 2000. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia* 71: S58-S65.
- Carvalho JE de 2004. *Toxicidade pré-clínica: fitoterápicos e alimentos com propriedades funcionais ou de saúde*. Disponível em: <www.abma.com.br/2004/notes/205.pdf>. Acesso em: 7 mar. 2008.
- De Bona AP 2006. Avaliação dos possíveis efeitos mutagênicos da tintura de *Erythrina mulungu* Mart. ex Bent. em *Allium cepa*. Vitória, 48p. Monografia de Bacharelado Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo.
- Elisabetsky E 2002. Resenha: Fitoterapia com base científica. *Ciência Hoje* 31 (182): 78-79.
- Ferreira AG, Áquila MEA 2000. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 175-204.
- Fontes BPD, Davide LC, Davide AC 2001. Fisiologia e citogenética de sementes envelhecidas de *Araucaria angustifolia*. *Ciência e Agrotecnologia* 25 (2):346-355.
- García-Mateos R, Peña-Valdivia CBP, Soto-Hernandez, M 2002. Phytotoxicity of crude alkaloid fractions from *Erythrina americana*. *Journal of the Mexican Chemical Society* 46 (1): 4-9.
- Gobbo-Neto L, Lopes NP 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 30 (2): 371-381.
- Guerra M, Souza MJ de 2002. *Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana*. Ribeirão Preto: FUNPEC.
- Linhares PCF et al 2005. Substratos na emergência e no vigor de plântulas de girassol. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 5 (1): 1º semestre.

- Lorenzi H, Matos FJA 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. São Paulo: Instituto Plantarum.
- Neves MCP 2006. *Erythrina*. EMBRAPA AGROBIOLOGIA. Disponível em: <<http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/leguminosas/eritrina.html>>. Acesso em: 12 out. 2006.
- Silva F de AS e 2007. *ASSISTAT: Assistência Estatística. Versão 7.4 Beta*. Universidade Federal de Campina Grande.
- Soares GLG et al 2002. Potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de algumas leguminosas arbóreas brasileiras. *Revista Floresta e Ambiente* 9 (1): 119-126.
- Souza SAM 2005. *Bioteste na avaliação da fitotoxicidade de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul*. Pelotas, 89f. Monografia Bacharel em Ciências Biológicas Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.
- Souza SAM et al 2005. Atividade alelopática e citotóxica do extrato aquoso de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.). *Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde* 11 (3/4): 7-14.
- Turolla MS dos R, Nascimento E de S 2006. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42 (2): 289-306.
- Virtuoso S 2005. *Estudo fitoquímico e biológico das cascas de Erythrina velutina Willd. – Fabaceae (Leguminosae - Papilionoideae)*. Curitiba, 124f. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

Tabelas

Tabela 1: Teste de Primeira Contagem (PC), Porcentagem de Germinação (G), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Comprimento da Radícula (CR) de sementes de *Allium cepa* (L.) submetidas a tratamento com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da folha de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth.

Tratamento	PC	G	IVG	CR
CN	98a	100a	7.008ab	6.9940a
0.025 mg/mL	97a	99a	6.698abc	6.6474a
0.05 mg/mL	98a	99a	6.856abc	6.7224a
0.1 mg/mL	95ab	98a	6.576abc	6.3496ab
0.2 mg/mL	98a	100a	7.166a	6.4160ab
0.3 mg/mL	96ab	98a	6.718abc	6.7574a
0.4 mg/mL	95ab	97a	6.162 bc	6.3244ab
0.6 mg/mL	86 b	96a	5.990 c	5.1410 b

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 2: Teste de Primeira Contagem (PC), Porcentagem de Germinação (G), Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Comprimento da Radícula (CR) de sementes de *Allium cepa* (L.) submetidas a tratamento com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico da inflorescência de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth.

Tratamento	PC	G	IVG	CR
CN	98a	100a	7.008a	6.9940a
0.025 mg/mL	99a	100a	6.900a	5.2150b
0.05 mg/mL	100a	100a	7.266a	4.7660b
0.1 mg/mL	98a	98a	7.218a	5.0096b
0.2 mg/mL	95a	98a	6.702a	5.2516b
0.3 mg/mL	98a	98a	7.114a	5.2636b
0.4 mg/mL	94a	95a	6.550a	5.3528b
0.6 mg/mL	96a	97a	6.660a	5.6012b

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 3: Índice de Efeito Aneugênico – IEA (%) e Índice de Efeito Clastogênico – IEC (%) do controle negativo (CN) e das diferentes concentrações (0,4 e 0,6 mg/mL) dos extratos hidroalcoólicos de inflorescências e de folhas de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth. mediante tratamento contínuo. Diferença significativa em relação ao controle negativo: ** $p < 0,01$.

	FOLHA		INFLORESCÊNCIA	
	IEA	IEC	IEA	IEC
CN	0,32 ± 0,15	0,02 ± 0,02	0,32 ± 0,15	0,02 ± 0,02
0,4 mg/mL	0,04 ± 0	0,11 ± 0,09	0,14 ± 0	0,90 ± 0,40 (**)
0,6 mg/mL	0 ± 0	0,12 ± 0	0 ± 0	0,17 ± 0,18

Tabela 4: Índice de Efeito Aneugênico – IEA (%) e Índice de Efeito Clastogênico – IEC (%) do controle negativo (CN) e das diferentes concentrações (0,4 e 0,6 mg/mL) do extrato hidroalcoólico de folhas de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth. mediante tratamento descontínuo agudo (20 h) e crônico (72 h).

	20 horas		72 horas	
	IEA	IEC	IEA	IEC
CN	0,32 ± 0,15	0,02 ± 0,02	0,32 ± 0,15	0,02 ± 0,02
0,4 mg/mL	0,06 ± 0,04	0 ± 0	0,03 ± 0,03	0 ± 0
0,6 mg/mL	0,03 ± 0,03	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Tabela 5: Índice de Efeito Aneugênico – IEA (%) e Índice de Efeito Clastogênico – IEC (%) do controle negativo (CN) e das diferentes concentrações (0,4 e 0,6 mg/mL) Do extrato hidroAlcoólico de inflorescências de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth. mediante tratamento descontínuo agudo (20 h) e crônico (72 h). Diferença significativa em relação ao controle negativo: ** $p < 0,01$.

	20 horas		72 horas	
	IEA	IEC	IEA	IEC
CN	0,32 ± 0,15	0,02 ± 0,02	0,32 ± 0,15	0,02 ± 0,02
0,4 mg/mL	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,48 ± 0,30 (**)
0,6 mg/mL	0,04 ± 0,03	0,02 ± 0,02	0 ± 0	0,70 ± 0,44 (**)

Figuras

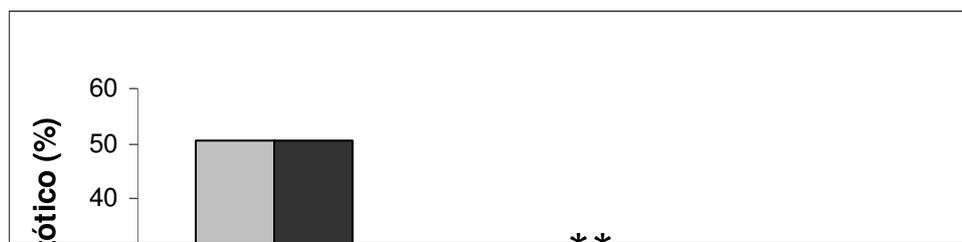


Figura 1: Índice Mitótico (%) do controle negativo (CN) e das diferentes concentrações (0,4 e 0,6 mg/mL) dos extratos hidroacóolicos de inflorescências e de folhas de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth. mediante tratamento contínuo. Diferença significativa em relação ao controle negativo: ** p<0,01; Diferença significativa em relação à concentração de 0,4 mg/mL: # p,0,05.

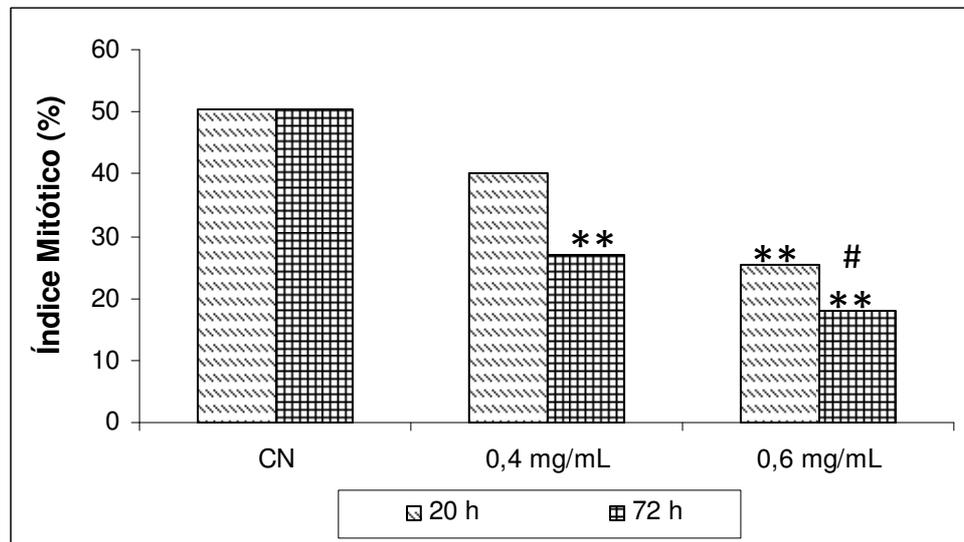


Figura 2: Índice Mitótico (%) do controle negativo (CN) e das diferentes concentrações (0,4 e 0,6 mg/mL) do extrato hidroalcoólico de folhas de *Erythrina mulungu* Mart. Ex Benth. mediante tratamento descontínuo agudo (20 h) e crônico (72 h). Diferença significativa em relação ao controle negativo: ** p<0,01.

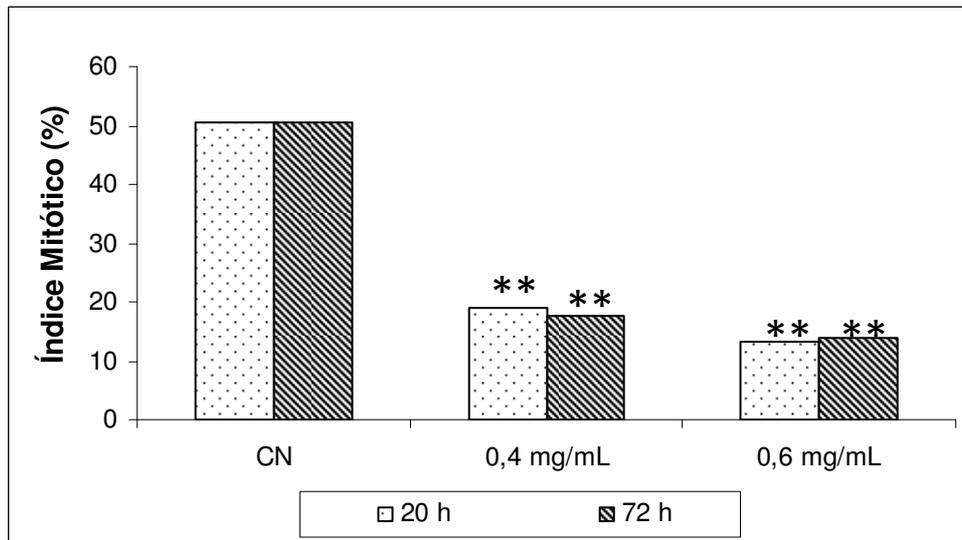


Figura 3: Índice Mitótico (%) do controle negativo (CN) e das diferentes concentrações (0,4 e 0,6 mg/mL) do extrato hidroalcoólico de inflorescências de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth. mediante tratamento descontínuo agudo (20 h) e crônico (72 h). Diferença significativa em relação ao controle negativo: ** $p < 0,01$.

5 CONCLUSÕES

A prospecção fitoquímica preliminar, para a identificação de alguns grupos de metabólitos secundários, indicou para o extrato hidroalcoólico das folhas, a presença de saponina espumídica, açúcares redutores, fenóis e taninos, proteínas e aminoácidos, flavonóides, alcalóides, depsídeos e depsidonas, derivados de cumarina, esteróides e triterpenos.

Nas inflorescências, identificou-se a presença de açúcares redutores, fenóis e taninos, proteínas e aminoácidos, flavonóides, alcalóides, depsídeos e depsidonas, derivados de cumarina, glicosídeos cardiotônicos e glicosídeos antraquinônicos.

Em relação às classes dos flavonóides, observou-se nas folhas a presença de catequinas e flavonas, chalconas e xantonas, e nas inflorescências, a presença de antocianinas e antocianidinas, chalconas e auronas, flavanonóis, leucoantocianidinas e flavanonas

Ambos os extratos apresentaram potencial alelopático, que não incidiu sobre a porcentagem final de germinação, mas sim sobre o desenvolvimento da planta, afetando a velocidade de germinação e o comprimento da radícula no tratamento com a folha, e apenas o comprimento da radícula, no tratamento com as inflorescências.

A análise mutagênica realizada através do sistema-teste *Allium cepa*, demonstram que tanto as folhas quanto as inflorescências são citotóxicas, sendo estas últimas mais tóxicas que as anteriores. Além disso, nenhum dos extratos apresenta potencial aneugênico. As inflorescências, por sua vez, demonstram potente efeito mutagênico.

O ensaio de toxicidade aguda em camundongos (DL_{50}), determinou para as folhas baixa toxicidade e para as inflorescências, toxicidade moderada, com uma DL_{50} igual a 1,37 g/kg.

A análise da medula óssea de roedores indica ausência de citotoxicidade para as folhas e inflorescências e potencialidade genotóxica dose-dependente para as folhas e independente da dose para as inflorescências.

REFERÊNCIAS

ADEGAS, F.S.; VOLL, E.; PRETE, C.E.C. Embebição e germinação de sementes de picão preto (*Bidens pilosa*). **Planta Daninha**, Viçosa, v.21, n.1, p.21-25, 2003

ALVES, M. da C. S. et al. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.

ALVES, N. D. da C. Avaliação da adequação técnica das indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinais do estado do Rio de Janeiro a partir dos instrumentos regulamentatórios específicos. 2004. 83 f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz.

ANTHOFER, J.; HANSON, J.; JUTZI, S. C. Wheat growth as influenced by application of agroforestry-tree prunings in Ethiopian highlands. **Agroforestry Systems**, Nova Iorque, v. 40, p.1–18, 1998.

ARAUJO NETO, V. et al. **Prospecção fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante do extrato das folhas de *Erythrina Velutina Willd.*** In: 18º Encontro de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-Graduação, Universidade Federal de Sergipe, 2008. Disponível em: www.posgrap.ufs.br/down/Livro_Resumos_18EIC_4EPG.pdf. Acesso em: 10 nov. 2008.

BARBOSA, L. M. Considerações gerais e modelos de recuperação de formações ciliares. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO FILHO, H. de F. **Matas ciliares: conservação e recuperação**. São Paulo: EDUSP/Fapesp, 2000. p.289-312.

BARBOSA, W. L. R. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Revista Científica da UFPA**, Belém, v.4, p.1-19, 2004.

BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. 5.ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2006. 274 p.

BIESKI, I. G. C.; Plantas medicinais e aromáticas no sistema único de saúde da região sul de Cuiabá- MT. 2005. 92 f. Monografia (Graduação *Lato Sensu* em Plantas Medicinais: manejo, uso e manipulação) - Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAPASSO, R. et al. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, Amsterdam, v.71, p.S58-S65, 2000.

CARVALHO, J. E. de. Toxicidade pré-clínica: fitoterápicos e alimentos com propriedades funcionais ou de saúde. 2004. Disponível em: <www.abma.com.br/2004/notes/205.pdf>. Acesso em: 7 mar. 2008.

CERUTTI, S. M. et al. Análise da toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico bruto de *Erythrina falcata* em camundongos (*Mus musculus*). **Revista de Farmácia e Biologia [Lecta-USF](#)**, Bragança Paulista, v.18, n.2, p.75-83, jul./dez. 2000.

DE BONA, A. P. Avaliação dos possíveis efeitos mutagênicos da tintura de *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth. em *Allium cepa*. 2006. 48 f. Monografia (Graduação de Bacharel em Ciências Biológicas) – Laboratório de Citogenética Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

ELISABETSKY, E. Resenha: Fitoterapia com base científica. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.31, n.182, p.78-79, mai. 2002.

FACHINETTO, J. M. *et al.* Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (*Asteraceae*) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.17, n.1, p.49-54, jan./mar. 2007.

FAGUNDES, F. A. et al., *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v.2, n.1, p.24-29, 2005.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.12, Edição Especial, p.175-204, 2000.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, Sweden, v.102, n.1, p.99-112, 1985.

FONTES, B. P. D.; DAVIDE, L. C.; DAVIDE, A. C. Fisiologia e citogenética de sementes envelhecidas de *Araucaria angustifolia*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.2, p.346-355, mar./abr. 2001.

GARÍN-AGUILAR, M. E. et al. Effect of crude extracts of *Erythrina americana* Mill. on aggressive behavior in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v.69, p.189-194, 2000.

GARCÍA-MATEOS, R.; SOTO-HERNÁNDEZ, M.; VÁZQUEZ, M. M. Toxicidad de los extractos de las semillas de *Eythrina americana*. **Ciencia Ergo Sum**, Toluca, v.7, n.2, p.166-170, jul. 2000.

_____; PEÑA-VALDIVIA, C. B. P.; SOTO-HERNANDEZ, M. Phytotoxicity of crude alkaloid fractions from *Erythrina americana*. **Journal of the Mexican Chemical Society**, Mexico, v.46, n.1, p.4-9, jan./mar. 2002.

_____ et al. Toxicidad de alcaloides de *Erythrina americana* en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Revista Fitotecnia Mexicana**, Chapingo, v.27, n.4, p.297-303, out./dez. 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 371-381, mar./abr. 2007.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. de. **Como observar cromossomos**: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 134 p.

LABIENIEC, M., GABRYELAK, T. Effects of tannins on chinese hamster cell line B14. **Mutation Research**, Netherlands, v.539, n.1, p.127-135, 2003.

LAPA, A. J. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p.247-262.

LEITE, E. M. A; AMORIM, L. C. A. Noções básicas de Toxicologia. Universidade Federal de Minas Gerais. 2006. Disponível em:
<<http://www.farmacia.ufmg.br/lato/Apostila%20Toxicologia%20Geral%20.doc>>.
Acesso em: 10 mar. 2008.

LEITE, K. R. et al. Avaliação da atividade mutagênica e genotóxica de *Ginkgo biloba* L. pelo teste do micronúcleo em camundongos. **Revista de Biologia Neotropical**, Goiânia, v.3, n.2, p.157-162, 2006.

LIMA, M. R. F. de et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v.105, p.137-147, 2006.

LINHARES, P. C. F. et al. Substratos na emergência e no vigor de plântulas de girassol. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v.5, n.1, 1º semestre 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas cultivadas. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 544 p.

MA, T. H. et al. The improved *Allium* / *Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, Netherlands, v.334, n.2, p.185-195.

MATOS, F. de S.; PANTALEÃO, S. de M. **Avaliação do efeito genotóxico de *Erythrina velutina* pelo teste de micronúcleo *in vivo***. In: 18º Encontro de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-Graduação, Universidade Federal de Sergipe, 2008. Disponível em:

<www.posgrap.ufs.br/down/Livro_Resumos_18EIC_4EPG.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2008.

MORITA, T. et al. Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Groups 1, 2A and 2B): The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. **Mutation Research**, Amsterdam, v.389, n.1, 1997.

NEVES, M. C. P. *Erythrina*. EMBRAPA AGROBIOLOGIA, Rio de Janeiro, 2006. Disponível em:

<<http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/leguminosas/eritrina.html>>. Acesso em: 12 out. 2006.

PINO-RODRIGUEZ, S. et al. Preliminary phytochemical screening and in vitro antitumor activity of *Erythrina fusca* Lour. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, Buenos Aires, v.23, n.2, p.453-458, 2004b.

REZENDE, C. de P. et al. Alelopatia e suas interações na formação e manejo de pastagens. **Boletim Agropecuário da Universidade Federal de Lavras**, Lavras, n.54, p.1-55, mai. 2003.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p.173-200.

SAIDU, K. et al. Antiplasmodial, analgesic, and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the stem bark of *Erythrina senegalensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v.71, p.275–280, 2000.

SANCHEZ-LAMAR, A. et al. Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v.115, p.416–422, 2008.

SILVA, F. de A. S. e. **ASSISTAT**: Assistência Estatística. Versão 7.4 Beta. Universidade Federal de Campina Grande, 2007.

SILVA, F. M.; AQUILA, M. E. A. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n.4, p.547-555, 2006.

SILVA, F. T. **Avaliação clínica da potencial atividade ansiolítica do extrato seco de Erythrina velutina**. 2008. 22 p. Relatório Final (Projeto de Pesquisa) – Laboratório de Fisiologia do Comportamento, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão. Disponível em: www.fapitec.se.gov.br/modules/wfdownloads/visit.php?cid=11&lid=234. Acesso em: 10 nov. 2008.

SILVA, S. R. et al. **Plantas medicinais do Brasil**: aspectos gerais sobre legislação e comércio. Brasília: Ministério de Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Alemanha e IBAMA, 2001.

SOARES, G. L. G. et al. Potencial alelopático do extrato aquoso de folhas de algumas leguminosas arbóreas brasileiras. **Revista Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v.9, n.1, p.119-126, jan./dez. 2002.

SOUZA, S. A. M. Bioteste na avaliação da fitotoxicidade de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul. 2005. 89f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

_____ et al. Atividade alelopática e citotóxica do extrato aquoso de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.). **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v.11, n.3/4, p. 7-14, set./dez. 2005.

TEIXEIRA, R. de O. et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.26, n.4, p..551-555, 2003.

TORAL, O.; WENCOMO, H. Especies de *Erythrina* para la ganadería tropical. **Revista Pastos y Forrajes**, Cuba, v.22, n.2, p.87-103, abr./jun. 1999.

TUROLLA, M. S. dos R.; NASCIMENTO, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.42, n.2, p. 289-306, abr./jun., 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C, MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Revista Química Nova**, São Paulo, v.28, n.3, p. 519-528, mai./jun. 2005.

VIRTUOSO, S. Estudo fitoquímico e biológico das cascas de *Erythrina velutina* Willd. – Fabaceae (*Leguminosae - Papilionoideae*). 2005. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

WHITTAKER, R. H.; FEENY, P. P. Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science*, Washington, v.171, n.3973, fev. 1971.