

## Avaliação dos efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Solanum cordifolium* Dunal e *Solanum torvum* Sw.

Evaluation of the toxic, cytotoxic and genotoxic effects of the crude extract from *Solanum cordifolium* Dunal and *Solanum torvum* Sw.

Julia DC Marsiglia<sup>1</sup>, Ana Carolina C Loss<sup>1</sup>, Vítor S Stange<sup>1</sup>, Luciano Belcavello<sup>1</sup>, Any C Luz<sup>1</sup>, Maria do Carmo P Batitucci<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES. CEP 29.040-090. \*Autor para correspondência: [docarmo\\_batitucci@yahoo.com.br](mailto:docarmo_batitucci@yahoo.com.br)

**Resumo** O presente estudo teve avaliou os potenciais efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de folhas das espécies *Solanum cordifolium* e *Solanum torvum*, por meio da dose letal mediana (DL50) em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), do ensaio de *Allium cepa* (1, 2 e 3mg/mL) e da análise de micronúcleo em medula óssea de ratos Wistar (200mg/rato/dia). Os resultados do ensaio de *Allium cepa* demonstraram que a espécie *S. cordifolium* não apresenta efeito tóxico, citotóxico ou genotóxico em nenhuma das concentrações testadas, porém apresenta alta toxicidade no teste de DL50 (323mg/kg) além de apresentar efeito citotóxico em eritrócitos de medula óssea dos roedores. O extrato de *S. torvum* apresentou menor toxicidade nos testes de DL50 em camundongos (11.733mg/kg) além de apresentar efeito clastogênico nos ensaios de *Allium cepa* e de micronúcleo em medula de roedores.

**Palavras-chaves:** *Solanum*, aberrações cromossômicas, genotoxicidade, micronúcleo.

**Abstract** This study evaluated the toxic, cytotoxic and genotoxic effects of the hidroalcoholic crude extract from leaves of the species *Solanum cordifolium* and *Solanum torvum*, using the median lethal doses assay (ML50) in Swiss mice (*Mus musculus*), the *Allium cepa* test system (1, 2, and 3mg/mL) and the micronucleus assay on rat bone marrow cells. The results from the *Allium cepa* test showed that *S. cordifolium* do not present toxic, cytotoxic or genotoxic effects in the tested concentration, but have high toxicity in the LD50 test (323mg/kg) and present cytotoxic effect on rat bone marrow erythrocytes in the micronucleus assay. The extract from *S. torvum* presented less toxicity in the LD50 test in mice (11.733mg/kg), but presented clastogenic effect in the *Allium cepa* test and micronucleus assay.

**Keywords:** *Solanum*, toxicity, chromosome aberrations, genotoxicity, micronucleus.

### Introdução

A família Solanaceae é composta por cerca de 3.000 espécies e 90 gêneros de ervas (Joly 1977), sendo o gênero *Solanum* um dos maiores e mais complexos gêneros dessa família, com mais de 1.500 espécies (Agra e Bhattacharyya 1999). As solanáceas possuem diversas substâncias bioativas de interesse farmacológico, especialmente alcaloides e flavonoides (Carvalho et al. 2003). Estudos têm demonstrado que *S. torvum* apresenta alta atividade antimicrobiana (Ajaiyeoba 1999, Chah et al. 2000, Wiart et al. 2003), a qual pode ser relacionada à alta quantidade de alcaloides, taninos e esteroides presentes na planta (Ajaiyeoba 1999). Várias espécies, incluindo *Solanum cordifolium*, *Solanum torvum* e *Solanum stipulaceum*, revelaram ação hipotensora sobre o sistema cardiovascular (Ribeiro 2001, Batitucci 2003).

A avaliação da toxicidade e genotoxicidade de produtos naturais é um passo fundamental para que as indústrias farmacêuticas deliberem um novo agente terapêutico. Dentre os métodos disponíveis para avaliação destacam-se o ensaio em *Allium cepa* (cebola) e o teste de micronúcleo em células da medula óssea de roedores. O sistema teste vegetal de *A. cepa* é um excelente bioindicador para o primeiro screening da genotoxicidade de plantas medicinais, devido ao seu baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade, auxiliando os estudos de prevenção de danos à saúde humana (Bagatini et al. 2007, Leme e Marin-Morales 2009).

O teste de micronúcleo em células da medula óssea de

camundongos tem sido amplamente empregado e aceito pelas agências reguladoras e comunidade científica como parte da avaliação de segurança de um produto (Choy 2001, Mateuca *et al.* 2006, Valadares *et al.* 2007). Assim como o teste em *Allium cepa*, o ensaio do micronúcleo detecta tanto clastogenicidade – quebra de cromossomos, quanto aneuploidia ou segregação cromossômica anormal devido a disfunções no aparato mitótico (MacGregor *et al.* 1987, Hayashi *et al.* 1994, Krishna e Hayashi 2000, Morita *et al.* 2011). O aparecimento de micronúcleos nas células analisadas é uma consequência de danos cromossômicos, evidenciando claramente a manifestação de distúrbios do processo mitótico (Ribeiro 2003, Grover e Kaur 1999). Há uma correlação positiva entre o aumento da frequência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e em humanos (Azevedo *et al.* 2003, Bonassi *et al.* 2011).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos dos extratos hidroalcoólicos brutos de folhas de *S. torvum* e *S. cordifolium* por meio da análise do ciclo celular e aberrações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* e por meio do teste do micronúcleo, em células de medula óssea de ratos Wistar. Os resultados dessa avaliação poderão contribuir para a implantação de projetos que visem à utilização dessas espécies na produção de fármacos e para o planejamento das ações de orientação à população quanto ao uso de medicamentos produzidos à base de plantas.

---

## Métodos

### Obtenção do extrato

Os espécimes de *S. cordifolium* Dunal e *S. torvum* Sw. foram coletadas no município de Vila Velha, ES, Brasil. Exsiccatas foram depositadas no Herbário VIES da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob número de identificação 12357-1 para *S. cordifolium* e 12687-0 para *S. torvum*. As folhas das plantas foram secas em estufa, com circulação de ar, à 40°C, por 5 dias e, então, pulverizadas. Os extratos hidroalcoólicos brutos de folhas de *S. cordifolium* (EHSC) e de *S. torvum* (EHST) foram obtidos por maceração na proporção de 60g do material pulverizado e 700mL de etanol 70%, à temperatura ambiente (25 a 30°C), por 72h. Após esse período, as soluções foram filtradas e submetidas à rotaevaporação com pressão reduzida, à temperatura de 60°C. Os EHSC e EHST foram dissolvidos em água Milli-Q para obtenção das frações aquosas e as concentrações foram calculadas com base nas massas secas dos extratos obtidas previamente.

### Toxicidade aguda por meio da dose letal mediana (DL50)

Grupos de 10 camundongos (30-50g), obtidos no biotério da UFES, receberam doses de 20, 40, 80, 160, 320 e 500mg/kg

para EHSC e 1, 10, 100, 1000, 5000 e 10000mg/kg para EHST por via intraperitoneal, enquanto no grupo controle foi administrada solução salina. Os animais permaneceram nas gaiolas, em local com temperatura e ciclo claro-escuro controlados e alimentação ad libitum, por um período de 24h, após o qual foram observados e registrado o número de óbitos. A DL50 foi determinada segundo Litchfield e Wilcoxon (1949).

### Ensaio de *Allium cepa*

Para a avaliação dos efeitos tóxicos, citotóxicos e genotóxicos, sementes de *Allium cepa* foram submetidas à germinação em três concentrações (1, 2 e 3mg/mL) de EHSC e EHST em dois tratamentos: contínuo, no qual as sementes foram germinadas diretamente nas diferentes concentrações dos extratos e descontínuo, no qual as sementes foram inicialmente germinadas em água Milli-Q, até atingirem aproximadamente 0,5cm de comprimento, sendo posteriormente transferidas para as diferentes concentrações dos extratos. Após 20h (tratamento agudo), algumas raízes foram coletadas aleatoriamente e o restante das sementes permaneceu no extrato até completarem 72h (tratamento crônico). Os controles negativos (CN) correspondentes foram realizados com água Milli-Q. Após a coleta, as raízes foram fixadas em solução Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético) e as lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento comum suave, coradas pelo método de Feulgen.

A análise de toxicidade foi realizada por meio do índice de germinação (IG) das sementes submetidas ao tratamento contínuo com os extratos e água Milli-Q. Para análise do efeito citotóxico, calculou-se o índice mitótico (IM) pela relação entre o número de células em divisão e o número total de células analisadas. Para análise de genotoxicidade, calcularam-se os índices de efeito clastogênico (IEC) e de efeito aneugênico (IEA) por meio da relação entre o número de células aberrantes e o número total de células analisadas. No cálculo do IEC foram computadas células portadoras de micronúcleos ou quebras cromossômicas e no cálculo do IEA foram consideradas células com aderências, perdas, atrasos e pontes cromossômicas, C-metáfases, brotos nucleares e anáfases multipolares. Avaliou-se também o índice de morte celular (IMC), através da relação do número de células em apoptose e o número total de células observadas.

### Ensaio com roedores

O ensaio do micronúcleo foi realizado em medula óssea de ratos Wistar machos, provenientes do biotério da UFES, mantidos em gaiolas com água e ração ad libitum. Os animais foram separados em quatro grupos experimentais (n=5): controle negativo (CN, solução salina 0,9%), tratamento com EHSC (200mg/rato/dia) e tratamento com EHST (200mg/rato/dia) administrados por gavage, por 5 dias consecutivos em intervalos de 24h entre as doses. O grupo controle positivo (CP) foi realizado com ciclofosfamida, 50mg/kg; via intraperitoneal, 24h antes da eutanásia. Os animais foram sacrificados 24h após o último tratamento e as amostras de medula óssea foram coletadas dos fêmures para confecção das lâminas. As células foram

coradas com soluções de Giemsa e May Grünwald. Foram analisadas 2000 células por animal, computando-se o número de eritrócitos policromáticos micronucleados para avaliação de genotoxicidade e a relação entre o número de eritrócitos policromáticos e normocromáticos para avaliação de citotoxicidade.

#### Análise estatística

Os dados foram analisados usando o teste Qui-Quadrado, para o ensaio de *Allium cepa*, e o teste Kruskal-Wallis, para o ensaio de micronúcleo, com nível de significância 1%.

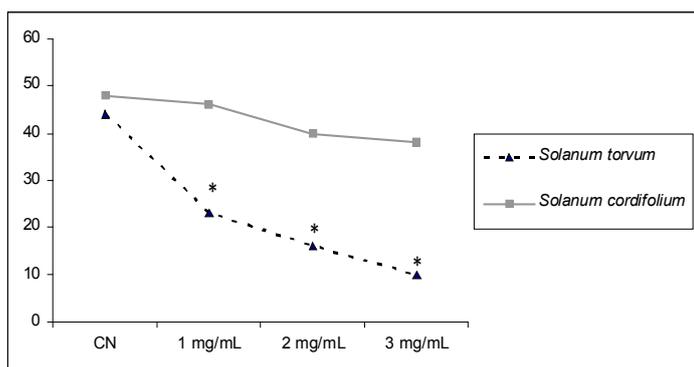
## Resultados e discussão

### Toxicidade Aguda - Dose Letal Mediana (DL50)

Os valores obtidos da dose letal mediana, em camundongos, para a espécie *S. cordifolium* foi 1.225mg/kg e para *S. torvum* foi 11.733mg/kg. A diferença na composição de fitocompostos entre espécies do gênero *Solanum* pode ser responsável pela diferença nos valores de DL50, refletindo em atividade biológica distinta, o que também foi demonstrado por Ajaiyeoba (1999), quando seus resultados indicaram que as concentrações de alcaloides, taninos e esteroides, maiores em *S. torvum* que em *S. macrocarpum*, levaram a um efeito distinto na atividade antimicrobiana dessas espécies.

### Ensaio de *Allium cepa*

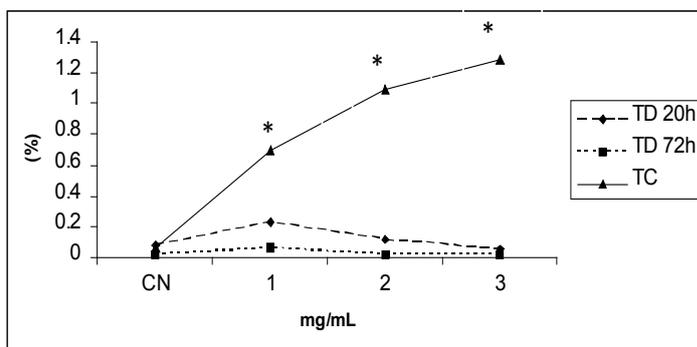
O índice de germinação das sementes de *A. cepa* expostas ao EHST decresceu significativamente, em comparação às sementes não expostas ao extrato, o que não ocorreu com o EHSC (Figura 1).



**Figura 1** Índice de Germinação (%) das sementes de *Allium cepa*, expostas ao tratamento contínuo com água Milli-Q (CN) e três concentrações (1, 2 e 3mg/mL) dos extratos hidroalcoólicos brutos de *S. cordifolium* e de *S. torvum*. \* – diferença significativa:  $p < 0,01$ .

Os índices mitóticos das células de *A. cepa* expostas às diferentes concentrações do EHSC e do EHST não foram estatisticamente diferentes do controle negativo (CN), tanto no tratamento contínuo quanto nos descontínuos, sugerindo que os extratos das espécies em estudo não afetam a divisão celular. O índice de efeito clastogênico (IEC) foi significativamente maior, em relação ao CN, apenas para o EHST, em todas as concentrações

testadas no tratamento contínuo. As células expostas aos extratos nos demais tratamentos não apresentaram diferenças significativas no IEC, quando comparadas ao CN (Figura 2).



**Figura 2** Índice de Efeito Clastogênico (IEC) para os tratamentos contínuo e descontínuos agudo (TD 20h) e crônico (TD 72h) com células de *Allium cepa* expostas a água Milli-Q (CN) e a três diferentes concentrações (1, 2 e 3mg/mL) de EHST. \* – diferença significativa,  $p < 0,01$ .

De acordo com Kovalchuck *et al.* (1998), a toxicidade, avaliada pela diminuição no índice de germinação não está sempre correlacionada com genotoxicidade, mas algumas aberrações cromossômicas podem ser acompanhadas da inibição de germinação. Nossos resultados, portanto, sugerem que para a espécie *S. torvum* há uma relação entre a queda no índice de germinação e o aumento do efeito clastogênico no sistema teste *A. cepa*.

Os índices de efeito aneugênico e morte celular dos tratamentos contínuo e descontínuos (agudo e crônico) com os extratos de *S. cordifolium* e *S. torvum*, não foram significativamente diferentes, quando comparados aos respectivos tratamentos controles, demonstrando que os extratos não possuem efeitos aneugênicos e não promovem morte celular. Tais resultados indicam que esses parâmetros não foram os mais adequados para a avaliação das espécies em estudo, uma vez que os resultados obtidos foram muito heterogêneos e não refletiram um padrão adequado de resposta (Tabela 1).

**Tabela 1** Índices de efeito aneugênico e de morte celular de células de *Allium cepa* expostas a tratamentos contínuo e descontínuos (agudo e crônico) com água Milli-Q (CN) e três concentrações (1, 2 e 3mg/mL) do EHSC.

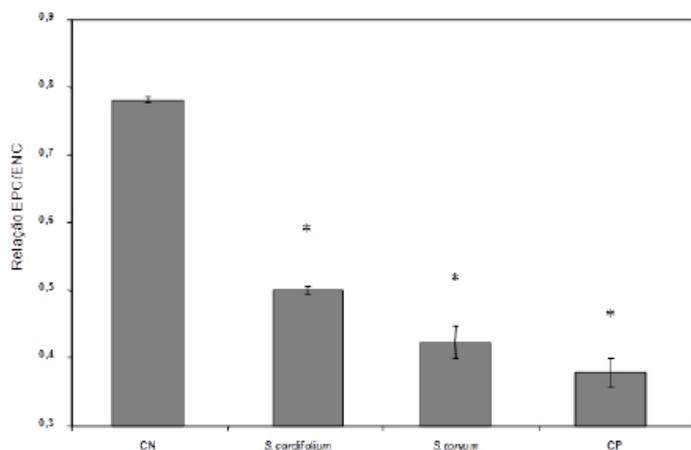
Tratamento	TD 20 horas (agudo)		TD 72 horas (crônico)		Tratamento Contínuo	
	IEA (%)	IMC (%)	IEA (%)	IMC (%)	IEA (%)	IMC (%)
CN	0,322	0,683	0,241	0	0,316	0
1 mg/mL	0,131	0,582	0,329	0	0,173	0
2 mg/mL	0,229	0,152	0,348	0,077	0,058	0
3 mg/mL	0,311	1,671	0,212	0	0,312	0,39

**Legenda:** TD: tratamento descontínuo; IEA: índice de efeito aneugênico; IEC: índice de efeito clastogênico; IMC: índice de morte celular.

### Ensaio de micronúcleo em medula óssea de roedores

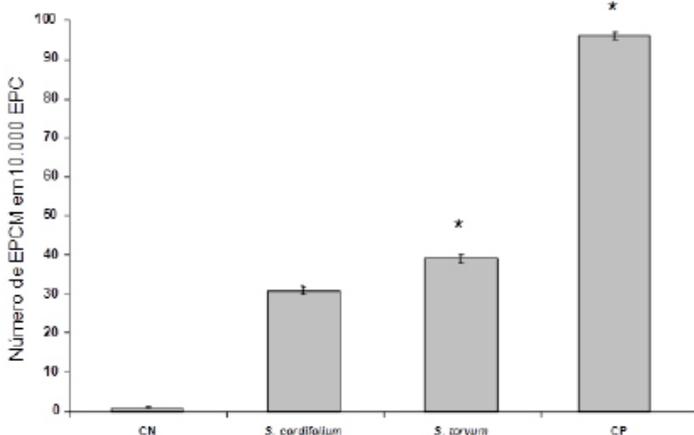
Os resultados do ensaio de micronúcleo revelaram alta citotoxicidade dos extratos de *S. cordifolium* e *S. torvum* em células de ratos Wistar, uma vez que a diminuição do número de eritrócitos policromáticos determinada pela ação dos extratos aproxima-se dos

valores encontrados para o controle positivo (Figura 3). No entanto, esses resultados são diferentes daqueles obtidos pelo teste de *A. cepa*, para ambos os extratos, sugerindo uma ação diferenciada em células vegetais e animais, situação que pode ser explicada pelas diferenças existentes entre os dois grupos celulares.



**Figura 3** Relação entre o número de eritrócitos policromáticos e o número de eritrócitos normocromáticos (EPC:ENC) estabelecida em 200 eritrócitos totais (EPC + ENC) por animal. \* – diferença significativa,  $p < 0,01$ .

A Figura 4 apresenta o número de eritrócitos policromáticos micronucleados em 10.000 eritrócitos policromáticos computados em medula óssea de ratos Wistar submetidos à administração de EHSC e EHST, na dose de 200mg/rato/dia e para os controles negativo e positivo.



**Figura 4** Frequência de micronúcleos em 10.000 eritrócitos policromáticos de medula óssea de ratos Wistar ( $n = 5$  animais/grupo) tratados durante cinco dias com solução salina (CN) ou com extrato hidroalcoólico bruto de *S. cordifolium* e *S. torvum* (200mg/rato/dia). Os animais do grupo controle positivo (CP) receberam uma única dose de ciclofosfamida (50mg/kg). \* – diferença significativa,  $p < 0,01$ .

Observamos que o EHST apresenta atividade clastogênica, verificada pelo aumento estatisticamente significativo no número de eritrócitos policromáticos micronucleados, enquanto o EHSC não promoveu esse efeito. Esse resultado corrobora aqueles observados no ensaio de *A. cepa*, para as espécies em estudo.

O fato de a espécie *S. melongena*, quando avaliada pelo teste de micronúcleo em ratos Wistar, não apresentar atividade genotóxica ou antigenotóxica (Chacon *et al.* 2002), aliado aos resultados encontrados no presente estudo, reforçam a ideia de

que cada espécie pode ter uma ação diferente sobre as células e de que os ensaios com extratos brutos podem apresentar resultados heterogêneos, decorrentes da complexidade de interações possíveis entre os diferentes compostos neles presentes e os componentes celulares dos organismos testes (Sixel e Pecinalli 2005).

Sugerimos que os efeitos tóxicos e citotóxicos das espécies *S. cordifolium* e *S. torvum* podem ser explicadas pela ação dos metabólitos secundários dessas plantas sobre os sistemas animais, uma vez que vários autores consideram que nos vegetais, alguns metabólitos, como os alcaloides e taninos, estão relacionados aos mecanismos de defesa contra herbivoria (Taiz e Zeiger 2004, Henriques *et al.* 2000).

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, concluímos que ambas as espécies apresentam efeitos danosos em pelo menos um dos bioensaios realizados, o que serve de alerta para a necessidade de estudos adequados de toxicidade e genotoxicidade, antes da utilização indiscriminada dessas plantas e de qualquer outro produto natural.

## Agradecimentos

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Espírito Santo – FAPES

## Referências

- Agra MF, Bhattacharyya J (1999) Ethnomedicinal and phytochemical investigation of the *Solanum* species in the Northeast of Brazil. In: Nee M *et al.* (ed) *Solanaceae* IV. Kew, Royal Botanic Gardens, pp 341–343.
- Ajaiyeoba EO (1999) Comparative phytochemical and antimicrobial studies of *Solanum macrocarpum* and *S. torvum* leaves. *Fitoterapia* 70: 184–186.
- Azevedo L, Gomes JC, Stringheta PC (2003) Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. *Food and Chemical Toxicology* 41: 1671–1976.
- Bagatini MD, Silva ACF, Tedesco SB (2007) Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17: 444–447.
- Batitucci MCP (2003) **Estudo dos efeitos cardiovasculares do extrato hidroalcoólico de plantas do gênero *Solanum*: Aspectos Fisiofarmacológicos e Citogenéticos**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, ES.
- Bonassi S, El-Zein R, Bolognesi C (2011) Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk, evidence from human studies. *Mutagenesis* 26: 93–100.
- Carvalho MG, Silva TMS, Braz-Filho R (2003) Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae). *Química Nova* 26: 517–522.
- Chacon DR, Libera AND, Cintra DEC (2002) Absence of genotoxic and antigenotoxic effects of a standardized extract of the medicinal plant *Solanum melongena* on peripheral blood and bone marrow cells of Wistar rats. *Cytologia* 67: 417–422.

- Chah KF, Muko KN, Oboegbulem SI (2000) Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruits. **Fitoterapia** 71: 187-189.
- Choy WN (2001) Regulatory genetic toxicology tests. In, Choy WN (ed) **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. New York: Marcel Dekker, p. 93-113.
- Grover IS, Kaur S (1999) Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected micronucleus assays. **Mutation Research** 426: 183-188.
- Hayashi M, Tice RR, MacGregor JT (1994) In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research** 312: 293-304.
- Henriques AT, Kerber VA, Moreno PRH (2000) Alcaloides: Generalidades e aspectos básicos. In, Simões CMO et al. (ed) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. São Carlos: Editora da UFSC, p. 641-656.
- Joly AB (1977) **Botânica**, introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional.
- Kovalchuck O, Kovalchuck I, Arkhipov A (1998) The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measure genotoxicity of soils of inhabited areas in Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research** 415: 47-57.
- Krishna G, Hayashi M (2000) In vivo rodent micronucleus assay, protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research** 455: 155-166.
- Leme DM, Marin-Morales MA (2009) *Allium cepa* test in environmental monitoring, a review on its application. **Mutation Research** 682: 71-81.
- Litchfield JT, Wilcoxon JR (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 96: 99-113 .
- MacGregor JT, Heddle JA, Hite M (1987) Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research** 189: 103-112.
- Mateuca R, Lombaert N, Aka PV (2006) Chromosomal changes, induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie** 88: 515-531.
- Morita T, MacGregor JT, Hayashi M (2011) Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow. *Mutagenesis* 26(1), 223-230.
- Ribeiro EAN (2001) **Estudos das ações cardiovasculares da fração aquosa do extrato etanólico do caule de *Solanum stipulaceum* Roem, Schult. (SOLANACEAE) em ratos**. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Produtos Naturais. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba (UFPB).
- Ribeiro LR (2003) Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: Ribeiro, LR, Salvadori DMF, Marques EK (org) **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da ULBRA, pp 173-200.
- Sixel PJ, Pecinalli NR (2005) Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Infarma** 16: 74-77.
- Taiz L, Zeiger E (2004) **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed.
- Valadares MC, Castro NC, Cunha LC (2007) *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** 43: 631-638.
- Wiat C, Mogana S, Khalifah S (2004) Antimicrobial screening of plants used for traditional medicine in the state of Perak, Peninsular Malaysia. **Fitoterapia** 75: 68-73.