



FACULDADE DE EDUCAÇÃO E MEIO AMBIENTE

NATILA FABIULA MARTINS RISCALLI

ANÁLISE MUTAGÊNICA DO EXTRATO DE *Costus spicatus*. (Jacq.)Sw. (Costaceae), ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM *Allium cepa*

ARIQUEMES – RO

2012

Natila Fabiula Martins Riscalli

ANÁLISE MUTAGÊNICA DO EXTRATO DE *Costus spicatus*. (Jacq.)Sw. (Costaceae), ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM *Allium cepa*

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Farmácia da Faculdade de Educação e Meio Ambiente – FAEMA, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Farmácia Generalista.
Prof. Orientador: Ms. Renato André Zan

ARIQUEMES – RO

2012

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária Elaine de Oliveira Machado CRB11/848, na Biblioteca “Júlio Bordignon”, da Faculdade de Educação e Meio Ambiente – FAEMA em Ariquemes/RO.

615.526

R595a

RISCALLI, Natila Fabiula Martins

Análise mutagênica do extrato do *Costus spicatus* (Jacq.) SW (*Costaceas*), através do teste de micronúcleo em *Allium cepa*. / Natila Fabiula Martins Riscalli – Ariquemes: [s.n], 2012.

30 f.il .; 30cm.

Monografia de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Faculdade de Educação e Meio Ambiente – FAEMA.

Orientador: Prof.º Ms. Renato André Zan

1. Mutagenidade 2. *Costus spicatus* 3. Micronúcleo 4. *Allium cepa*. I. RISCALLI, Natila Fabiula Martins. II. Faculdade de Educação e Meio Ambiente – FAEMA. III. Análise mutagênica do extrato do *Costus spicatus* (Jacq.) SW (*Costaceas*), através do teste de micronúcleo em *Allium cepa*.

Natila Fabiula Martins Riscalli

ANÁLISE MUTAGÊNICA DO EXTRATO DE *Costus spicatus*. (Jacq.)Sw. (Costaceae), ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM *Allium cepa*

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Química da Faculdade de Educação e Meio Ambiente – FAEMA, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Farmácia Generalista.
Prof. Orientador: Ms. Renato André Zan

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Orientador Ms. Renato André Zan
Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA

Prof. Ms. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti
Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA

Prof. Esp. Leandro José Ramos
Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA

Ariquemes, 28 de Junho de 2012.

Dedico este trabalho aos meus pais Izabel e Antonio, que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e que trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças nos momentos mais difíceis, fornecer a energia necessária para concluir mais esta etapa de minha vida.

A família, mãe e pai, que sempre me apoiaram e acreditaram na minha capacidade e em todos os momentos, de alegria ou tristeza, deram todo o apoio possível.

Não poderia deixar de agradecer aos meus amigos pessoas que nessa caminhada, sempre me apoiaram e contribuíram para meu crescimento como ser humano, pessoas que representam, pra mim, uma segunda família, obrigada a todos os amigos.

Ao professor Renato André Zan, que tanto colaborou indicando o melhor caminho, apontando opções diferentes e sempre me mantendo motivada.

Agradeço a todos os professores que fazem e fizeram parte de minha formação acadêmica, tendo paciência e tolerância diante dos fatos que vieram a ocorrer durante essa caminhada e que sempre fizeram de tudo para manter uma energia extra em cada acadêmico, a “motivação”.

A todos os técnicos do laboratório da FAEMA.

E a todas as pessoas que de forma direta ou indiretamente acabou por colaborar.

***Imagine uma nova história para sua vida e
acredite nela.***

PAULO COELHO

RESUMO

O objetivo do trabalho é avaliar o potencial mutagênico através das análises de micronúcleo em *Allium cepa* da planta *Costus spicatus* popularmente conhecida como cana-de-macaco. O estudo foi realizado através do extrato das folhas e tratamentos de infusão, decocção e maceração da *Costus spicatus*. A avaliação mutagênica foi feita através do estudo de 4 doses diferentes do extrato, sendo 0,5 µL, 10 µL, 25 µL, 50 µL diluídos em 50mL de H₂O mineral sendo 10 repetições diferentes para cada concentração e fez o comparativo do controle negativo com água mineral pura e o controle positivo com sulfeto de ferro (FESO₄) e dos processos usuais da planta em pessoas que utilizam como medicamento, sendo esses a infusão, decocção, maceração.

As lâminas foram analisadas em microscopia óptica, com objetiva de 40x e ocular de 10x tendo um aumento de 400x. Sendo que os micronúcleos foram observados a cada 1000 células por lâmina. Constatou-se que dos tratamentos com pequenas e altas doses do extrato da folha de *Costus spicatus*, apresentaram significâncias em relação ao controle negativo, apenas as doses de 10 µL e 50 µL apresentaram significância sendo que nas dosagens 0,5 µL e 25 µL não apresentou significância em relação ao controle negativo. Já na avaliação de infusão, decocção, maceração não foi apresentada significância em relação ao controle negativo.

Palavras-chaves: Mutagenicidade, *Costus spicatus*, Micronúcleo e *Allium cepa*.

ABSTRACT

The objective is to evaluate the mutagenic potential of the analyzes dare micronucleus *Allium cepa* plant *Costus spicatus* popularly known as cane monkey. The study was carried out with the extract of *Costus spicatus*, with the same objective evaluation of the mutagenicity of its pure extract. The assessment of mutagenicity was made by studying four different doses of the extract, and 0,5 μL , 10 μL , 25 μL , 50 μL diluted in 50 mL of H₂O and mineral 10 different replicates for each concentration and also made a comparison of control negative with pure mineral water and a positive control with iron sulfide (FeSO₄) and the usual processes of the plant people use as medicine, these being the infusion, decoction, maceration. The slides were examined under an optical microscope with a 40x objective and 10x eyepiece with a 400x magnification. Since the micronuclei were observed at 1000 cells per slide. It was found that treatment with small and high doses of leaf extract of *Costus spicatus* showed significant in relation to the negative control, only the doses of 10 μL and 50 μL of which were significant at doses 0,5 μL and 25 μL not showed significance for the negative control. In the evaluation of infusion, decoction, maceration was not given significance in relation to the negative control

Key words: Mutagenicity, *Costus spicatus*, Micronucleus and *Allium cepa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- A) <i>Costus spicatus</i>	12
Figura 2- Formação de micronúcleos em células.....	15
Figura 3- A) excisada de <i>C. spicatus</i> (THE NEW YORK, 2012); B) flor de <i>C. spicatus</i> ; C) folhas de <i>C. spicatus</i>	18
Figura 4- A) álcool metílico; B) folhas de <i>C. spicatus</i> ; C) Rotaevaporação e obtenção do extrato.....	19
Figura 5- A) germinação de <i>A. cepa</i> , em extrato da folha de <i>C. spicatus</i> ; B) detalhe da germinação do <i>A. cepa</i> ; C) detalhe da germinação do <i>A. cepa</i>	21
Figura 6- Micronúcleo em célula de <i>A. cepa</i> (ocular:10x, objetiva 40x).	22
Figura 7- Média de números de micronúcleos encontrados em 1000 células de <i>A.</i> <i>cepa</i> , por dosagem em amostra de extrato de folha de <i>Costus spicatus</i> . Significativo para **($P < 0,01$) e ***($P < 0,001$).....	24
Figura 8- Média de números de micronúcleos encontrados em 1000 células de <i>A.</i> <i>cepa</i> , por dosagem em amostra de extrato da folha de <i>Costus spicatus</i>	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
<i>A.Cepa</i>	<i>Allium cepa</i>
<i>C . spicatus</i>	<i>Costus spicatus</i>
RO	Rondônia
FAEMA	Faculdade de Educação e Meio Ambiente
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
HCL	Ácido clorídrico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
2 REVISÃO DE LITERATURA	Erro! Indicador não definido.
2.1 <i>Costus spicatus</i>	Erro! Indicador não definido.
2.1.1 Aspectos etnofarmacologico	13
2.2 MUTAGENICIDADE	Erro! Indicador não definido.
2.3 TESTE DE MICRONÚCLEO EM <i>Allium. cepa</i>	15
3 OBJETIVOS	Erro! Indicador não definido.
3.1 OBJETIVO GERAL	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4 METODOLOGIA	Erro! Indicador não definido.
4.1 ÁREA DE ESTUDO.....	17
4.2 CLASSIFICAÇÃO CIENTIFICA.....	17
4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO	Erro! Indicador não definido.
4.4 ANÁLISE MUTAGÊNICA	19
4.5 ANÁLISES ESTATISTICA.....	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 EXTRATO	Erro! Indicador não definido.
5.2 MUTAGENICIDADE.....	23
CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

INTRODUÇÃO

A descoberta de novos fármacos vem atendendo às necessidades que as novas enfermidades têm a atribuir, devendo passar por triagem inicial para identificação de algumas substâncias.

O Brasil se destaca pela sua biodiversidade e, por isso, torna-se imprescindível a avaliação das potencialidades químicas das plantas brasileiras, em especial da Mata Atlântica. (FÃO et. al. 2012).

Algumas como a referida *Costus spicatus*, pertence a família Costaceae, conhecida popularmente como cana-de-macaco ou cana-do-brejo. (DI STASI; LIMA, 2002), sendo que essa família pertence à ordem Zingiberales, que consiste de oito famílias de monocotiledôneas: Zingiberaceae, Costaceae, Marantaceae, Cannaceae, Lowiaceae, Musaceae, Heliconiaceae e Strelitziaceae. (ARAÚJO, 2007). A planta é utilizada na medicina popular, principalmente na região Amazônica, sua ação é depurativa e diurética, aliviando infecções urinárias e auxiliando na eliminação de pedras renais. (LORENZI; MATOS, 2002).

Segundo Poletto et. al. (2011), as substâncias tóxicas podem provocar consequências indesejáveis ao material genético, como mutações celulares, evidenciadas pela presença de micronúcleos nas células, estes são pequenos corpos contendo Ácido Desoxirribonucléico (DNA) e se formam a partir da perda de partes de cromossomos, ou cromossomos inteiros que não se prendem ao fuso mitótico durante a anáfase, onde são envolvidos por uma membrana nuclear formando um pequeno núcleo.

Determinados testes são realizados para identificar e quantificar a presença de micronúcleos, o teste de micronúcleo em *Allium cepa* é bem aceito devido sua reprodução celular e assemelha-se com a reprodução celular em humanos. (FISKESJO, 1993).

A *C.spicatus* chama atenção pela sua composição química e seu aspecto etnofarmacológico, e atrai o interesse de pesquisadores, pois se constatou em seus rizomas uma nova fonte de diosgeninas, um percurso de hormônio esferoidal. (GASPARRI, 2005).

Empregou-se o teste em *A. cepa*, devido ao baixo custo, disponibilidade de *A. cepa*, não exigência de equipamentos elaborados e de aprovação em Comitê de

Ética e Pesquisa (CEP), aplicabilidade em vários cursos (química, farmácia, enfermagem, entre outros), boa ligação com resultados de outros testes, bem visto pela comunidade científica mundial, além do curto período de tempo necessário para a preparação do teste.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Costus spicatus*

Britto (2011) descreve que a planta *Costus spicatus* pertence a família Zinziberaceae/Costaceae que inclui mais de 52 gêneros distribuídos em 1.100 espécies, popularmente chamada no Brasil de cana-do-brejo. Sua denominação cana-do-brejo ou cana-de-macaco é usada para demonstrar os gêneros que estão distribuídos em duas subfamílias.

✓Costaceae, que se encontram as espécies dos gêneros *Costus* especialmente *spicatus* denominada cana-do-brejo uma espécie nativa encontrada em locais úmidos da região de Mata Atlântica. (DI STASI; LIMA,2002)

✓Zinziberaceae, que incluem os gêneros Zingiber, Alpinia, Hedychium, Curcuma, Renealmia e Riedelia, com varias espécies medicinais. (DI STASI; LIMA,2002) (Figura 1).



Figura 1. *Costus spicatus*.
Fonte: Izabel Vinha Martins Riscalli

Segundo Britto (2011) é uma planta perene, rizomatosa, ereta, não ramificada, de 1 a 2m de altura, nativa na mata Atlântica. Apresentam folhas alternas, membranáceas, dotadas de bainhas papiráceas, velutina em ambas as faces, de 25 a 40 cm de comprimento por 6 a 10 cm de largura. Tem inflorescências em espigas terminais estrobiliformes, com grandes brácteas vistosas de cor vermelha, que protegem as flores de cor amarelada.

Uma planta que se multiplica tanto por sementes como por rizomas, e é cultivada como ornamental, tanto para jardins como para produção de flor de corte, suas folhas, hastes e rizomas são empregados na medicina tradicional de longa data, especialmente na região Amazônica. (LORENZI; MATOS, 2002).

Largamente distribuída entre os trópicos, particularmente no sudeste da Ásia, sendo que esta espécie cresce naturalmente em lugares úmidos e sombrios, particularmente em matas. (HOLTTUM, 1950).

É utilizada popularmente para ter uma ação diurética e depurativa, com o alívio a de infecções urinárias e para expulsar pedras renais. É uma planta que atrai a atenção de pesquisadores, pois constatou em seus rizomas uma nova fonte de diosgenina, um precursor de hormônios esteroidais. (GASPARRI, 2005).

2.1.1 Aspectos Etnofarmacológicos

Na Mata Atlântica, a infusão das folhas é usada contra hipertensão e o decocto de suas folhas, contra diarreia. A infusão obtida dos colmos é usada contra hepatite e cólicas intestinais. (DI STASI; LIMA, 2002).

No Brasil, a *Costus spiralis* tem registros de uso de raízes e rizomas como diurético, analgésico, para bexiga e uretra, bem como para ajudar no processo de exclusão de cálculo renal. (CORRÊA, 1984).

Segundo o conhecimento empírico, a cana-de-macaco também é essencial no tratamento do *diabetes mellitus* e sua decocção é empregada para aliviar irritações vaginais, leucorreia e tratamento de úlcera (SILVEIRA; RIEDER, 2009).

Corrêa (1984) descreve que o suco das folhas da planta é favorável contra a arteriosclerose e como um calmante, e suas folhas frescas são úteis no uso de resolução de abscessos.

Britto (2011) relata que a composição química da *Costus spicatus* além de inuliana, de ácido oxálico, taninos, sistosterol, saponinas, sapogeninas, mucilagens e pectinas.

2.2 MUTAGENICIDADE

A toxicidade de cada planta depende de sua substância, composição química e biológica, tem aptidão de ser prejudicial, causando danos graves ao organismo. (BOORHEM,1999)

Os efeitos tóxicos, só se manifestam em organismos se o agente tóxico alcançar locais específicos do organismo, em concentrações e tempo suficiente para produzir algum tipo de efeito. (BARROS; DAVINO 2008). A via de administração, duração e frequência de exposição, são os fatores importantes onde influenciam a toxicidade ao organismo mesmo ele sendo encontrado no interior das células, não está livre de sofrer constantes alterações e mutações. (POLETTO et al, 2011).

Substâncias mutagênicas podem acarretar danos celulares aos organismos vivos que estão frequentemente expostos a estes danos, onde comumente são induzidos por agentes físicos, químicos ou biológicos que afeta os processos como a transcrição e duplicação gênica e alterações cromossômicas, levando aos processos cancerosos e morte celular. As substâncias que causam lesões nos materiais genéticos são conhecidas como genotóxicas. (COSTA; MENK, 2000;).

Poletto et. al. (2011) definem mutação como uma alteração na estrutura do material genético, sendo esta quase sempre prejudicial, especialmente em organismos multicelulares, nos quais a alteração genética está mais inclinada a perturbar o desenvolvimento e a fisiologia extremamente complexos.

Os micronúcleos são observados em microscópio óptico, onde podemos visualizar pequenos corpos contendo DNA e localizados no citoplasma, sendo os mesmos originados de fragmentos cromossômicos acêntricos, resultantes de quebras isocromatídicas, cromatídicas, ou de disfunções do fuso mitótico, sendo que, em cada célula, aparecerá mais de uma vez. (DIETZ et al., 2000).

2.3 TESTE DE MICRONÚCLEO EM *Allium cepa*

O teste de micronúcleo em *Allium cepa*, detecta a mutagênese cromossômica, sendo aceito em estudos de efeitos citotóxicos de plantas medicinais. (BARROS et al., 2005).

No código genético, se um agente pode causar danos ao DNA, este tem potencial genotóxico em qualquer tipo de célula animal, vegetal ou microorganismos. (BALIEIRO et al., 2010).

O teste de *Allium cepa* pode ser usado para avaliar o potencial mutagênico de muitos compostos químicos, sendo necessário fazer avaliações para aumentar a segurança no uso que a população frequentemente faz de variadas plantas. (STURBELLE et al., 2010).

Embora existam diferenças entre o metabolismo de animais e plantas, existem similitudes, e que a ativação de pró-mutagênicos em plantas possui alta importância, visto que seres humanos consomem plantas tratadas com agentes químicos, ressaltando a relevância e a utilidade de sistemas de testes vegetais na avaliação de genotoxicidade. (FISKESJÖ, 1994).

O micronúcleo significa células em divisão, como resultado de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos, ou consequências de cromossomos inteiros, que não se prendem ao fuso mitótico e dessa forma não atingem os pólos das células durante a mitose ou a meiose. Um cromossomo inteiro ou fragmento cromossômico acêntrico não se une ao novo núcleo, capaz de constituir um pequeno núcleo individual, chamado de micronúcleo (Figura 2). (VILLELA et al., 2003).

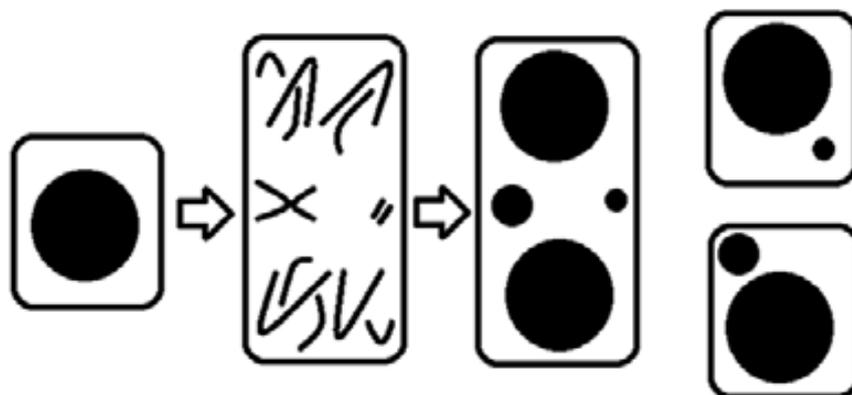


Figura 2. Formação de micronúcleos em célula

FONTE: Poletto et. al. 2011

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a mutagenicidade do extrato *Costus spicatus* obtido de formas variadas, através do teste micronúcleo em *A. cepa*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato puro da folha de *Costus spicatus*;
- Determinar a mutagenicidade do extrato obtido a partir das folhas de *Costus spicatus*;
- Determinar a mutagenicidade do extrato obtido por decocção das folhas de *Costus spicatus*;
- Determinar a mutagenicidade do extrato obtido por infusão das folhas de *Costus spicatus*;
- Determinar a mutagenicidade do extrato obtido por maceração das folhas de *Costus spicatus*.

4 METODOLOGIA

As etapas dos experimentos compreendem as obtenções de extratos vegetais com os ensaios biológicos da *C. spicatus*.

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado em Ariquemes, município que pertence a região do Vale do Jamari, que está localizada na região centro norte do estado de Rondônia, a 203 quilômetros de Porto Velho, sendo composta pelos municípios: Campo Novo de Rondônia, Buritis, Monte Negro, Alto Paraíso, Cacaupândia, Cujubim, Rio Crespo, Machadinho do Oeste e Ariquemes.

4.2 CLASSIFICAÇÃO CIENTÍFICA

A identificação da espécie em estudo foi realizada com base no C. V. Starr Virtual Herbarium, que é um sistema online que reúne fotos em alta qualidade de exsicatas das coleções William and Lynda Steere Herbarium, desenvolvido por The New York Botanical Garden. (THE NEW YORK HERBARIUM, 2012).

Dentro do sistema foi selecionada a (Família: Costaceae; Gênero: *spicatus*), onde foi possível encontrar 37 espécies, as mesmas foram comparadas com o espécime coletado, confirmando a espécie *Costus spicatus* (Jacq.)Sw.

A exsicata analisada tem as seguintes especificações (no: 6699; Family: Costaceae; Collector: D. E. Atha; NY Specimen ID: 01087178; location: PORTO RICO: Municipio Ciales. Reserva Tres Picachos; (THE NEW YORK, 2012) (Figura 3).



Figura 3. A) exsicata de *Costus spicatus* (THE NEW YORK, 2012); B) flor de *C.spicatus*; C) folhas *C. spicatus*.

Imagem: Natila Fabiula Martins Riscalli

4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO

As folhas da *Costus spicatus* foram coletadas no dia 14 de Março de 2012 no município de Ariquemes, Rondônia (RO), e encaminhado ao laboratório de bioquímica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente (FAEMA).

As folhas foram cortadas em torno de 3 cm, e postas para secar em estufas por 120 horas a 40°C até total perda de umidade, posteriormente foram trituradas para uma maior superfície de contato.

Utilizou-se metanol como solvente extrator devido suas características de polaridade, permitindo extração de maior número de compostos.

As amostras foram deixadas em metanol por 48 horas em um recipiente fechado até ensaios posteriores.

O extrato puro foi obtido a partir da evaporação do solvente, sendo utilizado o Evaporador Rotativo (Q344B-QUIMIS) (Figura 4)



Figura 4. A) álcool metílico; B) folhas de *Costus spicatus*; C) Rotaevaporação e obtenção do extrato.

Imagem: Natila Fabiula Martins Riscalli

4.4 ANÁLISE MUTAGÊNICA

Empregou-se o teste em *A. cepa*, devido ao baixo custo, disponibilidade de *A. cepa*, não exigência de equipamentos elaborados e de aprovação em Comitê de Ética e Pesquisa (CEP), aplicabilidade em vários cursos (química, farmácia, enfermagem, entre outros), boa ligação com resultados de outros testes, bem visto pela comunidade científica mundial, além do curto período de tempo necessário para a preparação do teste.

Os testes de micronúcleo foram realizados segundo a metodologia descrita por (MENEGUETTI et al, 2011).

Foram utilizadas exemplares de *Allium cepa* (cebolas) de tamanho pequeno, uniforme, de mesma origem, não germinadas e saudáveis, adquiridas no mercado do município de Ariquemes, Rondônia, Brasil.

Os bulbos foram postos a germinar sobre frascos apropriados e esterilizados com a parte inferior mergulhada na solução de 50 mL água mineral e substrato em teste (extrato vegetal).

O experimento foi realizado com folhas da *Costus spicatus*, tendo como seu controle a água mineral.

O extrato foi dividido em 04 doses diferentes, com 10 repetições de cada, sendo o primeiro experimento contendo apenas água mineral (CN), do segundo ao quinto 50 mL de H₂O mineral, 0,5 µL, 10 µL, 25 µL, 50 µL, o sexto contem 50mL Sulfato de Ferro (FeSO₄), o sétimo foi realizado infusão, o oitavo decocção, e o último em maceração. (Figura 5).

Foram postas a germinar por um período de 48 horas, após o início dos testes, em temperatura de 25°C, os meristemas foram coletados quando atingiram comprimento de 0,5 a 3 cm, os mesmos foram coletados para análise de micronúcleos, sendo realizado a lavagem em água destilada das mesmas, e em seguida realizou-se a hidrólise dos mesmos em uma solução de HCl a 1 N por 10 minutos em banho-maria a 60C^o, sendo que os tubos de ensaio foram resfriados em água corrente.

Após a lavagem dos meristemas hidrolisados em água destilada foram feitos esfregaços em lâminas, e aguardado por cerca de 30 minutos para sua secagem em uma temperatura ambiente.

Em seguida as mesmas foram coradas, segundo Meneguetti et al., (2011), com o Kit Panótico Rápido LB que é composto de três recipientes: primeiro triarilmetano a 0,1 %, segundo xatenos a 0,1% e terceiro tiazinas a 0,1 %, sendo que cada laminas mergulhadas 10 vezes em cada recipiente com submersão de 1 segundo de duração na sequência acima descrita.

Sendo que posteriormente as lâminas foram lavadas em água destilada e postas a secar em temperatura ambiente.

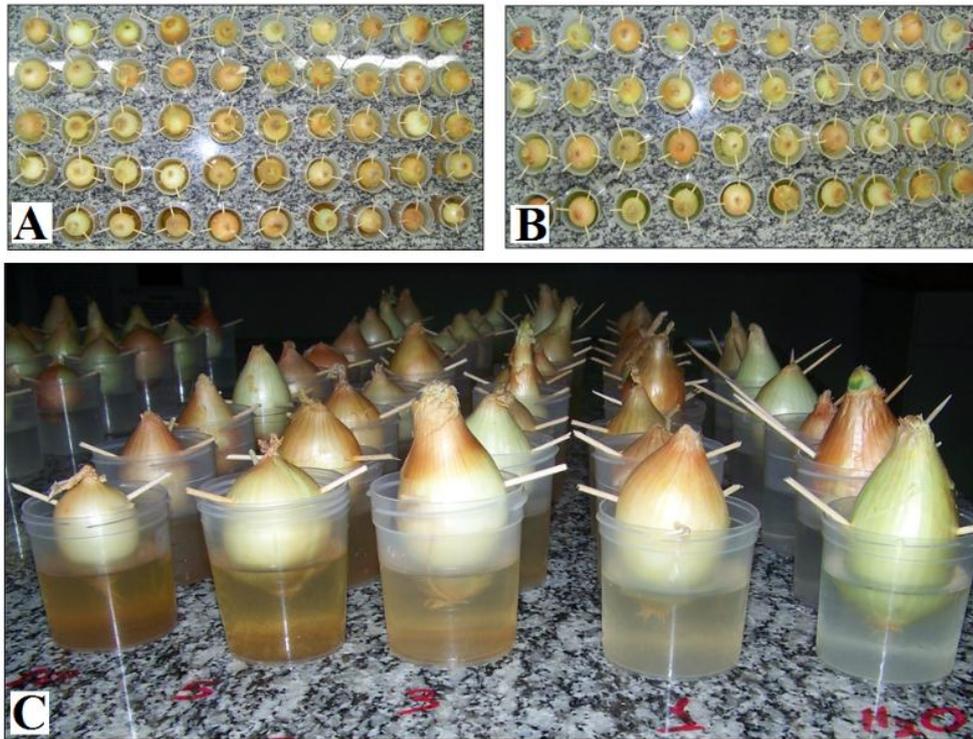


Figura 5. A) germinação de *A. cepa*, em extrato da folha de *Costus spicatus*; B) detalhe da germinação do *A. cepa* ; C) detalhe da germinação do *A. cepa*
 Imagem: Natila Fabiula Martins Riscalli

Em cada repetição das 04 doses, dos 02 controles e da infusão, decocção e maceração, foram preparadas duas lâminas, com um total de 180 sendo 20 para cada dose analisada.

O tratamento de infusão foi realizado da seguinte forma: pegou-se três folhas que foram cortadas em torno de três centímetros e reservadas enquanto a água estava fervendo. Em seguida jogou-se as folhas no béquer, e deixou ferver por alguns segundos, deixando descansar por 10 minutos. Posteriormente filtrou-se e utilizou-se o filtrado para a execução das análises.

Para o tratamento de decocção cortou-se três folhas em torno de três centímetros e colocou-se em um béquer com água fria, aquecendo-se até a ebulição, onde aguardou-se em torno de 10 minutos antes de cessar a ebulição.

No tratamento de maceração cortou-se três folhas em torno de 1 centímetro logo após macerou-se em grau com auxílio do pistilo transferindo-se para um béquer com água, deixando-se em repouso por 24 horas.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, com objetiva de 40x e ocular de 10x sendo seu aumento de 400x. E à avaliação das lâminas foram

observado á presença de micronúcleos em 1000 células, em interfase, por bulbo. (Figura 6).

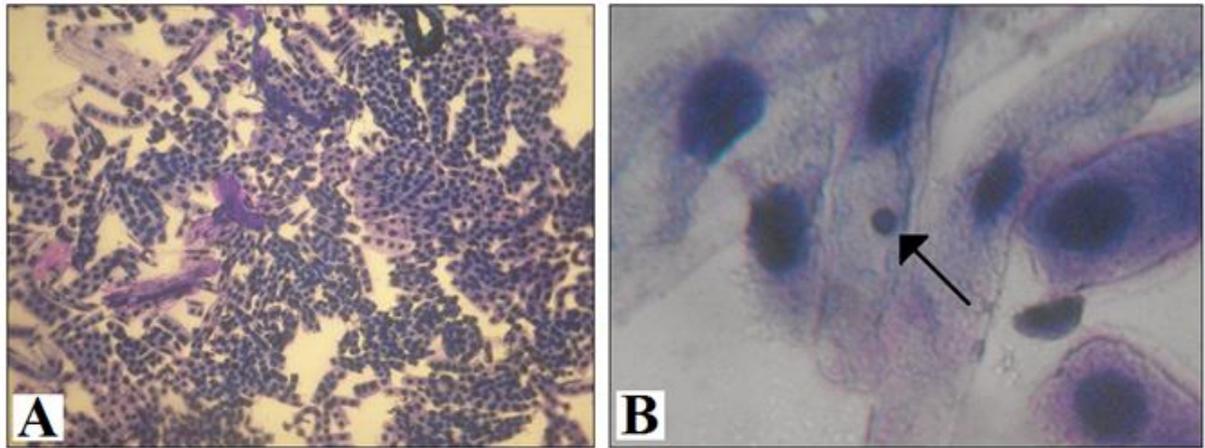


Figura 6. A) Células de *A. cepa* (ocular:10x, objetiva 10x), B) Micronúcleo em célula de *A. cepa* (ocular:10x, objetiva 40x)
Imagem: Meneguetti et. al. 2012

Durante as análises, não se tinha o conhecimento dos tratamentos aplicados nas lâminas que se analisava, para não haver influência sobre os resultados, uma vez que para tratamentos com concentrações elevadas pode-se ocorrer a alto – influência para mais micronúcleos.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi realizada a variância (ANOVA) e o teste TUKEY, feito pelo Software Graphad PRISM 5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRATO

Após a retirada do solvente (metanol), com o uso de evaporador rotativo a uma temperatura constante de 50°C, obteve-se uma quantidade de 22,44g de extrato a partir de 230g de folha seca após a secagem de 1,605 Kg de folha verde, obtendo um rendimento de 9,75 % de extrato puro em relação a folha seca e 1,39% em relação a folha verde.

5.2 MUTAGENICIDADE

Os resultados obtidos através da análise mutagênica do extrato da folha de *Costus spicatus* estão representados na (Tabela 1).

Tabela 1. Número e média de micronúcleo, em *A. cepa* a cada 1000 células por lâminas em tratamentos realizados com extrato da folha de *Costus spicatus*.

	H ₂ O (CN)	FeSO ₄ (CP)	0,5 µL	10 µL	25µL	50 µL
Frasco 01	0	1	0	2	0	2
	0	0	0	1	0	3
Frasco 02	0	2	1	2	2	0
	1	0	0	1	0	1
Frasco 03	1	0	0	0	1	2
	0	0	0	3	2	1
Frasco 04	0	1	0	1	0	4
	0	0	0	2	0	2
Frasco 05	1	0	1	2	2	1
	0	3	0	1	1	0
Frasco 06	0	0	1	3	2	0
	0	1	0	0	1	2
Frasco 07	1	0	0	4	3	0
	0	0	0	1	0	0
Frasco 08	0	1	2	3	1	0
	0	2	0	3	0	3
Frasco 09	0	0	1	0	0	2
	0	2	0	4	1	0
Frasco 10	0	3	0	2	1	3
Total	4	16	6	35	17	26
Média	0,4	1,6	0,6	3,5	1,7	2,6

Fonte: Natila Fabiula Martins Riscalli

Observando os dados da Tabela 1, nota-se a presença média de 0,5 micronúcleo por lâmina no (CN) contendo H₂O, mostrando que o mesmo, está dentro da normalidade. Para os tratamentos contendo 0,5 µL e 25 µL de extrato, obteve-se respectivamente 0,5 e 1,7 micronúcleos por 1000 células, micronúcleos por 1000 células ($P>0,05$), levando em consideração o desvio padrão, não houve significância estatística dos mesmos em relação ao controle negativo, já nas doses de 10 µL e 50 µL obteve-se respectivamente 3,5 e 2,6 micronúcleos por 1000 células ($P<0,001$), levando em consideração o desvio padrão, houve uma significância estatística dos mesmos em relação ao controle negativo, evidenciando assim, um potencial mutagênico nas respectivas doses (Figura 7).

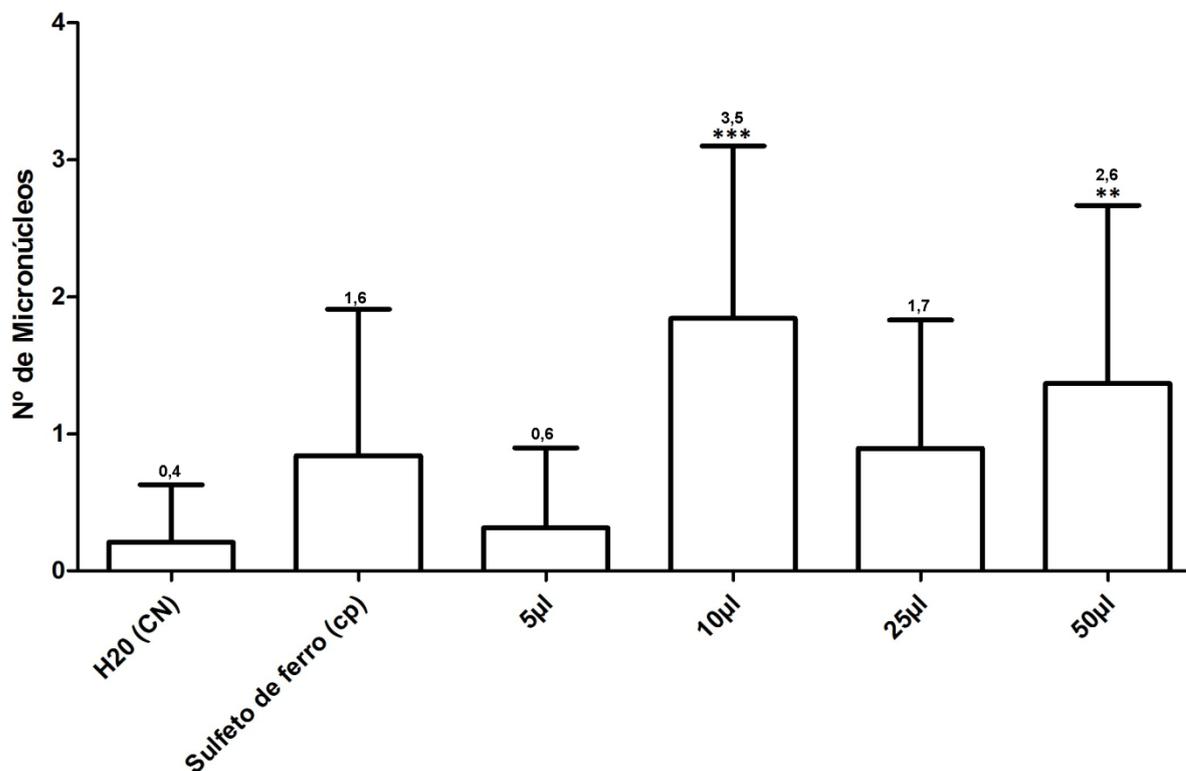


Figura 7. Média de números de micronúcleos encontrados em 1000 células de *A. cepa*, por dosagem em amostra de extrato de folha de *Costus spicatus*. Significativo para **($P<0,01$) e ***($P<0,001$)

Os resultados obtidos através da análise mutagênica de infusão, decocção e maceração de *Costus spicatus* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Número e média de micronúcleo, em *A. cepa* a cada 1000 células por lâminas e tratamentos de infusão, decocção e maceração de *Costus spicatus*.

	H ₂ O (CN)	FeSO ₄ (CP)	INFUSÃO	DECOCÇÃO	MACERAÇÃO
Frasco 01	0	1	0	0	1
	0	0	0	1	2
Frasco 02	0	2	0	0	0
	1	0	0	0	1
Frasco 03	1	0	1	2	0
	0	0	0	0	2
Frasco 04	0	1	0	1	1
	0	0	2	1	0
Frasco 05	1	0	0	0	0
	0	3	1	0	1
Frasco 06	0	0	0	0	0
	0	1	0	1	0
Frasco 07	1	0	1	0	1
	0	0	0	1	0
Frasco 08	0	1	2	2	3
	0	2	0	1	0
Frasco 09	0	0	1	0	1
	0	2	0	2	1
Frasco 10	0	3	0	0	0
Total	4	16	8	12	14
Média	0,4	1,6	0,8	1,2	1,4

Fonte: Natila Fabiula Martins Riscalli

Analisando a Tabela 2, nota-se a presença de 0,4 micronúcleos, em média, por lâminas no (CN), mostrando que o mesmo, está dentro da normalidade. Para os tratamentos contendo infusão, decocção e maceração de extrato, obteve-se respectivamente 0,8; 1,2 e 1,4 micronúcleos por 1000 células ($P>0,05$), levando em consideração o desvio padrão, não houve significância estatística dos mesmos em relação ao controle negativo, evidenciando assim, que não potencial mutagênico nas respectivas doses (Figura 8).

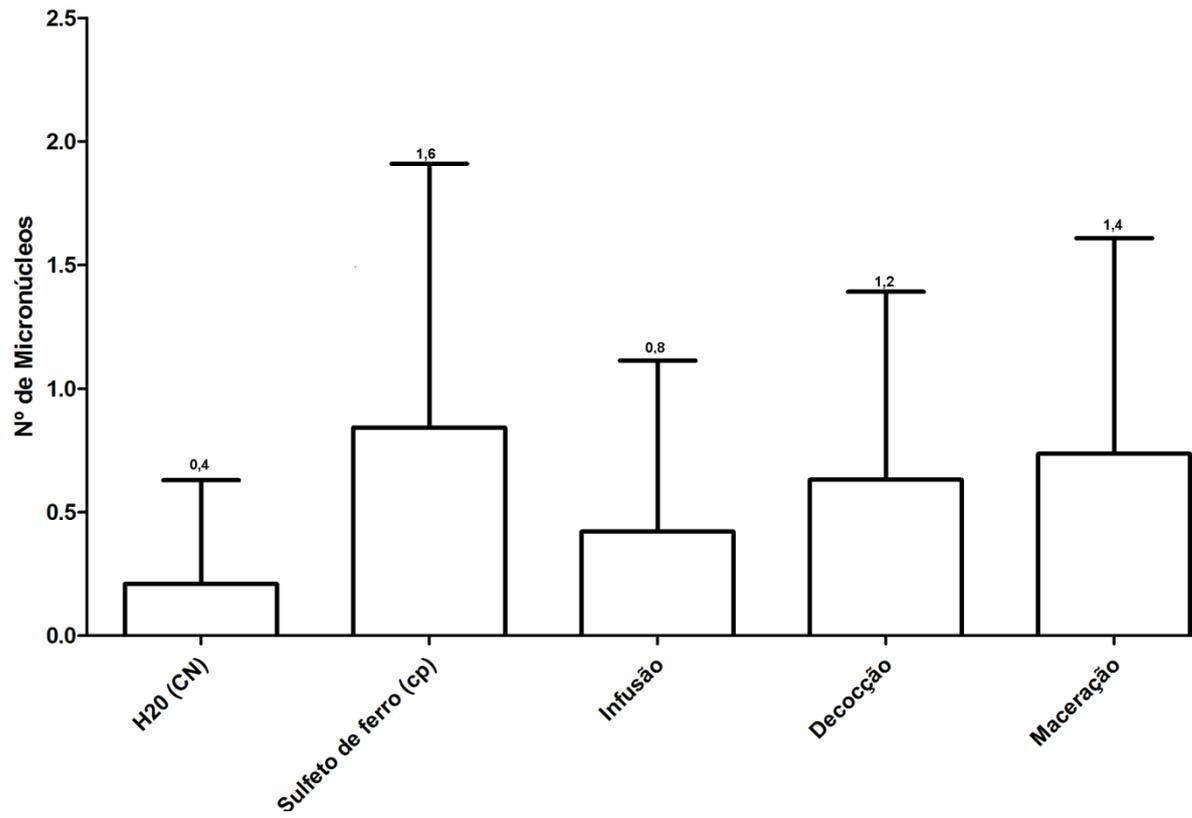


Figura 8. Média de números de micronúcleos encontrados em 1000 células de *A. cepa*, tratamento em amostra de extrato da folha de *Costus spicatus*.

CONCLUSÃO

O estudo partiu da análise mutagênica nas doses 0,5 µL, 10 µL, 25 µL, 50 µL e nos tratamentos de infusão, decocção e maceração onde com pequenas doses como os de doses altas do extrato da folha de *C. spicatus*, apresentaram significâncias em relação ao controle negativo, apenas as doses de 10 µL e 50 µL apresentaram significância entre as diferentes doses avaliadas, sendo que as dosagens de 0,5 µL e 25µL não apresentaram significância, já para os tratamento de infusão, decocção, maceração não obteve-se significância (CN) em nem um dos casos, mostrando que são necessários mais estudos para se certificar a mutagenicidade da planta, pois o presente estudo é preliminar e futuros estudos precisam ser realizados para investigações mais conclusivas, por estas doses apresentarem mutagenicidade em relação as outras doses estudadas.

REFERÊNCIAS

- ARAUJO, F. P.; OLIVEIRA, P. E. Biologia floral de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (Costaceae) e mecanismos para evitar a autopolinização. **Rev. bras. Bot.**, 30(1), p. 61-70. 2007.
- BALIEIRO, F. P; BARBOSA, S; FREITAS, N. C; RIBEIRO, L. O; BEIJO, L. A; SANTOS, B. R. Influência de extratos foliares de barbatimão sobre a germinação e ciclo celular de *Allium cepa*. **XIX congresso de pós-graduação da UFLA**, 2010. Disponível em: <www.sbpcnet.org.br/livro/lavras/resumos/1689.pdf>. Acesso em 22/05/12.
- BARROS, S. B. M; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: Oga, S; CAMARGO, M.M.A; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2008. p.59-70.
- BARROS, S; ROPKE, C. D; SAWADA, T. C. H; SILVA, V. V; PEREIRA, S. M. M; BARROS, S. B. M. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L. Miq (Pariparoba). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 41, n. 1, jan./mar., 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v41n1/v41n1a04.pdf>>. Acesso em 20/05/12
- BOORHEM, R.L. Reader's Digest – **Segredos e Virtudes das Plantas Medicinais**. Reader's Digest Brasil Ltda., Rio de Janeiro, 1999. p.416.
- BRITO, R. M. **Efeito da fração aquosa das folhas de *Costus spicatus* (Jacq.) roscoe sobre a função contrátil do coração de mamíferos**, Dissertação Mestrado – UFSE – Aracaju – p.25 2011.
- CORRÊA, P.M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultiváveis**. Imprensa Nacional do Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro. p.4324, 1984.
- COSTA, R. M. A; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: ciência e desenvolvimento**, 3:24-26, 2000. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio12/biomonitor.pdf>>. Acesso em 20/05/12.
- DIETZ, J; DIEHL, A. S; PROLLA, J. C; FURTADO, C. D; FURTADO, A.D. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. **Rev Ass Med Brasil**; 46(3): 207-11. 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ramb/v46n3/3078.pdf>>. Acesso em 20/05/12.
- DI STASI, L.C., LIMA, H. C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na mata atlântica**, 2º Edição, revista e ampliada, Editora UNESP, p.52, 2002.

FÃO, F.; ZAN, R. A.; BRONDANI, F. M. M.; RAMOS, L. J.; MENEGUETTI, D. U. O. **Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (müll. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental**, SaBios: Rev. Saúde e Biol., 7(1), p.91-98, 2012.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test. I: Wastewater Monitoring. **Environ Toxicol Water Qual** 8: 291-298, 1993.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test II: Assesmente of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environ Toxicol Water Qual** 9: 234-241, 1994.

GASPARI, S. **Estudos das atividades antioxidantes e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal de *Costus spicatus***. 2005. 79f. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular) - Universidade Luterana do Brasil, Canoas. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/tese_susana.pdf>. Acesso em: 21/05/12.

HOLTTUM, R.E. The Zingiberaceae of the Malay Península. **Gardens Bulletin of Singapore**, v. 13, p. 1-249, 1950.

LORENZI, H., MATOS, F.J. DE ABREU. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; ZAN, R. A.; RAMOS L. J.; **Adaptation of the Micronucleus Technique in *Allium Cepa*, For Mutagenicity Analysis of the Jamari River Valley, Western Amazon, Brazil**. J Environment Analytic Toxicol 2:127. 2012.

POLETO, P. O.; DINIZ, A. P.; BERNARDON, B.; ZAN, R. A.; RAMOS, L. J.; MENEGUETTI, D. U. O. **Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (mart. Ex benth. J. f. macbr: fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *allium cepa***, Rev. Pesquisa e Criação., 10(1), p.163-175, 2011

SILVEIRA, T. T. S.; RIEDER, A. 2ª. Jornada Científica da UNIMAT. Anais. **Bioatividade do extrato foliar de cana-do-brejo (*Costus spiralis* (JACQ.) ROSCOE) em *Spodoptera frugiperda* (J.E.SMITH,1797)**, 2009.

STURBELLE, R. T; PINHO D. S; RESTANI R. G; OLIVERIA G. R; GARCIAS, G. L; MARTINO-ROTH, M. G.. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol.20. n.3, 2010. 415p. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v20n3/a19v20n3.pdf>>. Acesso em 21/05/12.

THE NEW YORK. **Botanical Garden**. Disponível em: <http://sweetgum.nybg.org/vh/specimen_list.php?QueryName=BasicQuery&QueryPage=http%3A%2F%2Fsciweb.nybg.org%2Fscience%2Fvii2.asp&Restriction=NybRecordType+%3D+%27Specimen%27&StartAt=1&any=SummaryData%7CAdmWebMe>

tadata&QueryTerms=costus+spicatus&QueryOption=any&Submit=Search>. Acesso em 22/06/2012.

UFMG. Micronúcleos. Disponível em
<[HTTP://www.icb.ufmg.br/biq/prodap/2003/micronucleos/sobremn.html](http://www.icb.ufmg.br/biq/prodap/2003/micronucleos/sobremn.html)> Acesso em
15/06/12.

VILLELA, V. I; LAU, A; SILVEIRA, J; PRÁ, D; ROLLA, H. C; SILVEIRA, D. J. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. *In*: Silva J, Edrtmann B, Henriques JAP (org.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. p. 158-159, 2003.