



REF - ISSN 1808-0804 Vol. X (3), 20 - 29, 2013.

**ESTUDO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS E
CITOTÓXICOS DO CONFREI (*SYMPHYTUM
OFFICINALE*) NO CICLO CELULAR DE *ALLIUM
CEPA***

STUDY OF THE MUTAGENIC AND CYTOTOXIC EFFECTS OF THE COMFREY
(*SYMPHYTUM OFFICINALE*) IN THE CELL CYCLE OF *ALLIUM CEPA*

*ESTUDIO DE LOS EFECTOS MUTAGÊNICOS Y CITOTÓXICOS DEL COMFREY
(SYMPHYTUM OFFICINALE) EN EL CICLO CELULAR DE ALLIUM CEPA*

**¹Natália Souza Dias, ¹Thaysa Cardoso Silva, ¹Geraldo dos Passos Barcelos
Filho, ¹Juliany Ferreira Badreddine, ¹Hemilianna Hadassa Silva Matozinho,
¹Meyrelles Rodrigues Resende, ¹Fernando Oliveira Gomes**

¹Graduação em Medicina pela Universidade Federal de Goiás. Goiânia, Goiás

Enviado em 30/08/2012, Aceito em 19/07/2013

RESUMO

A planta denominada Confrei (*Symphytumofficinale*) tem sido usada na medicina popular para tratar principalmente doenças músculo-esqueléticas, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, analgésica, antiexsudativa. Entretanto, estudos têm associado vários efeitos adversos aos chamados alcalóidespirrolizidínicos, presentes na planta, os quais

são mutagênicos. Sendo assim, este estudo analisou e confirmou os efeitos citotóxicos e mutagênicos do Confrei no ciclo celular da cebola (*Allium cepa*). Conclui-se, com o experimento, que o uso oral do Confrei pode trazer efeitos maléficos para o organismo.

Palavras-chave: Confrei, Fitoterapia, *Allium cepa*.

ABSTRACT

The plant called comfrey (*Symphytumofficinale*) has been used in folk medicine to treat mainly musculo-skeletal diseases due to its anti-inflammatory, analgesic, antiexsudativa. However, studies have various adverse effects associated with so-called pyrrolizidine alkaloids present in plants, which are mutagenic. Therefore, this study analyzed and confirmed the cytotoxic and mutagenic effects of comfrey in the cell cycle of onion (*Allium cepa*). We conclude with the experiment, the oral use of comfrey can bring harmful effects to the body.

Keywords: Comfrey, Phytotherapy, *Allium cepa*.

RESUMEN

La planta llamada consuelda (*Symphytumofficinale*) se ha utilizado en la medicina popular para el tratamiento de las enfermedades músculo-esqueléticas, principalmente debido a su anti-inflamatorio, analgésico antiexsudativa,. Sin embargo, los estudios tienen diversos efectos adversos asociados con alcaloides de pirrolizidina llamados presentes en las plantas, que son mutagênicos. Por lo tanto, este estudio analizó y confirmó los efectos citotóxicos y mutagênicos de consuelda en el ciclo celular de cebolla (*Allium cepa*). Concluimos con el experimento, el uso oral de consuelda puede traer efectos nocivos para el organismo.

Palabras clave: Consuelda, Fitoterapia, *Allium cepa*.

INTRODUÇÃO

Na década de 1990 a Organização Mundial de Saúde (OMS) confirmou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento faziam uso de plantas com fins medicinais, que, na maioria das vezes, era a única forma de acesso aos cuidados da saúde⁽¹⁾.

Mesmo com o avanço da medicina alopática, a maioria das plantas medicinais ainda não possui validade científica, ou seja, não foram pesquisadas e não têm ações farmacológicas comprovadas em testes científicos pré-clínicos e clínicos. Além de serem usadas como medicamentos em países nos quais não existem outras

opções de terapêutica, as plantas medicinais também têm se difundido em lojas de produtos naturais e farmácias com rotulagem industrializada em todo o mundo⁽¹⁾. Muitas vezes essas plantas são vendidas baseadas em promessas de benefícios seguros, pelo fato de serem remédios naturais, usados há milênios. Com auxílio de propagandas que asseguram saúde e vida longa, o consumo desses produtos tem aumentado rapidamente em todo o mundo⁽²⁾.

Nos Estados Unidos e Europa o uso de plantas medicinais é comum, mas existem normas para certificação e controle de qualidade das preparações vegetais que são extremamente rígidas. No entanto, o Brasil não tem essa mesma preocupação, apesar dessa forma de tratamento ser muito difundida. Na verdade, são poucas as ervas da flora nativa que possuem alguma comprovação de suas propriedades farmacológicas e, mesmo assim, existe um forte estímulo a esse consumo por comerciantes e pelos próprios usuários, existindo pouco controle da comercialização em feiras livres, mercados públicos, lojas de produtos naturais⁽¹⁾. Afinal, o pensamento errôneo de que não há toxicidade nos fitoterápicos, o qual é compartilhado pela maioria da população, acaba sendo um problema sério de saúde pública, pois as plantas medicinais podem esconder

também muitos riscos à saúde, evidenciando a necessidade de muitas pesquisas na área da fitoterapia⁽²⁾.

Por isso desenvolvemos este estudo, no qual o alvo de estudo é o Confrei, uma erva denominada *Symphytum officinale*, pertencente à família Boraginaceae. É de origem europeia, mais precisamente Portugal e Inglaterra, e da Ásia temperada. É uma planta perene, conhecida no Brasil como Confrei, Consolda-maior, Consólida-maior, Orelha-de-asno, Erva-do-cardeal, Língua-de-vaca e Orelha-de-burro⁽³⁾. Tem aproximadamente noventa centímetros de altura, sendo que suas folhas e raízes são usadas de várias maneiras terapêuticas desde o século XVI⁽⁴⁾.

O Confrei, na medicina popular, é conhecido por ser usado para tratar principalmente doenças musculoesqueléticas, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, analgésica e antiexsudativa. Por isso, as folhas são usadas em chás, sucos e saladas no caso de doenças gastrointestinais, disenterias, inflamações, reumatismo, hemorroidas, tosse, bronquite, irregularidades menstruais, entre outros. Já as raízes têm propriedade hemostática, podendo ser usada em ferimentos abertos, equimoses e fraturas de ossos⁽⁵⁾.

Foi descoberto que o Confrei tem propriedades cicatrizantes por causa da

alantoína, que estimula o crescimento de tecidos novos e sadios, atuando como regeneradora. Possui também, entre seus vários componentes farmacológicos, o ácido rosmarínico e taninos, sendo que o ácido rosmarínico é um polifenol antioxidante natural, e os dois compostos são agentes anti-inflamatórios, com atividade hemostática⁽¹⁾.

Por outro lado, existem alguns estudos que mostram vários efeitos adversos do Confrei. Foi observado que, após ingestão por via oral da planta, podem ocorrer diversos sintomas, como anorexia, letargia, dor abdominal, destruição dos hepatócitos, trombose e carcinogênese⁽⁶⁾. Somado a isso, existem evidências de que a planta pode causar riscos para mulheres grávidas por estimular a motilidade uterina, provocando aborto⁽¹⁾.

Foi verificado que o Confrei possui os chamados alcaloides pirrolizidínicos, que foram descobertos a partir da

MÉTODOS

Este estudo baseou-se na análise dos potenciais efeitos genotóxicos e mutagênicos do Confrei no ciclo celular da cebola (*Allium cepa*).

De acordo com Grant⁽⁷⁾, *Allium cepa* é um eficiente sistema de teste utilizado para avaliação do potencial genotóxico, citotóxico e mutagênico de substâncias, devido a sua sensibilidade e

década de 1980 e são hepatotóxicos, carcinogênicos e mutagênicos⁽¹⁾. Por causa desses compostos existem diversos casos de morte ocasionados por cirrose, como consequência de grave doença hepática veno-oclusiva, além de hamangiossarcoma com metástase pulmonar, o que levou a OMS a condenar o uso dessa planta por via oral^(1,5).

Em suma, reforça-se a importância de estudar e pesquisar as plantas medicinais, como o Confrei. Afinal, elucidar os benefícios e malefícios do uso dessa planta, dita "medicinal", é essencial para orientar a população e até mesmo no momento de instituir uma terapêutica baseada nessa planta. Nesse sentido, este estudo busca fazer a análise e melhor esclarecimento dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da *Symphytum officinale*.

boa correlação com sistemas de teste em mamíferos.

Para possibilitar a avaliação dos efeitos ou danos que agentes mutagênicos podem causar, faz-se necessário que a amostra esteja em constante divisão mitótica, o que é uma característica da *A. cepa*. O índice de alterações celulares é usado como indicador de proliferação das células, o

que pode ser facilmente medido através do sistema de teste vegetal⁽⁸⁾.

O sistema-teste de *A. cepa* consiste na incubação da raiz do vegetal em solução da substância cujo potencial citotóxico e mutagênico pretende-se analisar. Nesse sentido, é feito o estudo do controle negativo, controle positivo e o devido teste com a amostra.

Obtenção das raízes de *Allium cepa*

Nessa primeira etapa foram selecionadas três cebolas com tamanhos e pesos semelhantes. Em seguida, foi retirada a casca e os catáfilos secos dessas cebolas, com auxílio de um estilete. Após esse procedimento, as regiões dos pratos das cebolas foram colocadas em contato direto com água destilada, em recipientes distintos, devidamente identificados como "controle positivo", "controle negativo" e "tratamento". Assim permaneceu por três dias, sendo que as raízes das cebolas já haviam crescido relativamente uniformes, possibilitando a continuação do estudo.

Preparação das amostras

Foi preparada a amostra do "tratamento" para a obtenção de solução aquosa de extrato de Confrei, obtida a partir das folhas, com concentração de 1 mg/mL, foi diluído 50 g extrato de Confrei em 50 mL de água destilada e, em seguida, colocou-se as

raízes da cebola do "tratamento" em contato direto com a solução obtida.

Em outra etapa foi preparada a solução do "controle positivo" através da diluição de 0,05 mg de nitrato de cromo em 50 mL de água destilada, obtendo-se uma solução com concentração de 0,01 mg/mL. Em seguida, foram colocadas as raízes da cebola em contato direto com a solução obtida.

Por fim, foi feita a preparação do "controle negativo", que se trata de um controle sem tratamento, ou seja, foi apenas trocada a água destilada e a mesma cebola foi recolocada em contato direto com a água.

As amostras foram armazenadas durante três dias em temperatura ambiente, estando as raízes em contato com suas respectivas soluções, para posterior análise das mesmas.

Preparação das raízes

Esta etapa consistiu em retirar, com auxílio de um estilete, as raízes de cebola que cresceram em meio aos seus respectivos tratamentos. Para isso, cortou-se, aproximadamente, 0,5 cm da extremidade inferior da raiz, tendo em vista que nessa porção há um grande número de células em divisão mitótica.

Para a fixação das raízes, utilizou-se solução fixadora de Carnoy's (1:3, Ácido acético:Álcool etílico), na qual as raízes de cebola foram imersas, por no mínimo 20 minutos.

Após a fixação das raízes da cebola, estas foram submetidas à solução para hidrólise ácida (em 60 mL de ácido clorídrico a 1M) seguida de banho-maria por 10 minutos, a 60°C e, novamente, foram submetidas à solução fixadora de Carnoy's.

Montagem e observação das lâminas das raízes

Fragmentou-se a região terminal das raízes de cada amostra, com auxílio de um estilete, em suas respectivas lâminas etiquetadas e, em seguida, foi colocada uma gota da solução de coloração com orceína a 1% (em ácido acético) no material fragmentado de cada amostra. Colocaram-se as lamínulas por cima, a fim de que ocorresse a coloração, deixando o material descansar por 15 minutos.

Para a montagem final das lâminas, lâmina e lamínula juntas foram envoltas em várias dobras de papel absorvente e pressionadas com o polegar, para que houvesse esmagamento do material contido entre elas. Houve cuidado especial para evitar a quebra da lamínula e/ou seu deslizamento sobre a amostra. Em seguida, o excesso de corante foi limpo e a lamínula selada com esmalte.

A observação microscópica das células meristemáticas foi realizada considerando as regiões com maior proporção de divisões mitóticas e as células em intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase, além das possíveis alterações presentes.

Figura 1 – Foto microscópica (aumento de 400x).



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observação das lâminas

Foi feita a análise de cem (100) células de cada bulbo – “controle positivo”, “controle negativo”,

“tratamento” – totalizando trezentas (300) células observadas. As três lâminas, obtidas a partir das três cebolas, foram avaliadas observando-se as células em suas fases da mitose (interfase, prófase, metáfase, anáfase, telófase), com auxílio de um microscópio óptico, com objetiva de 100X, em imersão.

Cálculo do Índice de Alterações Cromossômicas (IAC)

Sabendo que IAC é: $\frac{\text{Número de células alteradas}}{\text{Total de células observadas}}$, obtivemos os seguintes resultados, mostrados no quadro abaixo:

Amostras:	Tratamento	Controle Negativo	Controle Positivo
IAC:	$\frac{93}{100}$	$\frac{13}{100}$	$\frac{52}{100}$

O “controle negativo” no caso do teste de *A. cepa* significa a incubação da raiz da cebola em água, sem tratamento específico, objetivando-se a análise do crescimento natural do vegetal, o que então serve como parâmetro para estudo concomitante de raízes com crescimento em meio a soluções de outras substâncias.

A partir da raiz do “controle negativo”, prepararam-se lâminas histológicas com o intuito de possibilitar o devido estudo das fases normais do ciclo celular e mitose. Não surpreendeu, portanto, o IAC para as raízes do “controle negativo” ter sido o menor (13/100). Contudo o índice ainda foi maior do que o esperado, afinal não havia nenhum agente agressor na solução. Portanto, esse pequeno número

de células alteradas, principalmente a vacuolização, se deveu, provavelmente, a algum erro cometido durante a preparação da solução, das raízes, ou mesmo da maneira como as raízes foram armazenadas.

O “controle positivo” em teste de *A. cepa* consiste na incubação de raízes de cebola em solução aquosa com substância de comprovada mutagenicidade, o que prevê o crescimento anormal das células meristemáticas, funcionando como parâmetro de ação genotóxica quando em comparação com a solução que se pretende estudar.

Neste trabalho, para a devida avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de Confrei, utilizou-se como

“controle positivo” uma solução de nitrato de cromo. Tal substância apresenta potencial de mutagenicidade em vegetais superiores, evidenciado por várias pesquisas, sendo considerado neste trabalho como parâmetro de indicadores de genotoxicidade para avaliação dos efeitos celulares com a solução de Confrei. O cromo (Cr) afeta o ciclo mitótico em *A. cepa* e induz a formação de micronúcleos e aberrações cromossômicas, como as descritas seguir⁽⁹⁾.

Os eventos indicadores indiretos de mutagenicidade de compostos químicos podem ser evidenciados pelos parâmetros microscópicos de anormalidades do ciclo celular: aderências cromossômicas, pontes e fragmentações cromossômicas, anáfases prematuras e C-metáfases. Indicadores diretos de alterações no conteúdo genético das células são caracterizados por quebras cromossômicas e formação de micronúcleos⁽¹⁰⁾.

A ação inibitória de substâncias genotóxicas sobre os fusos mitóticos de células meristemáticas de *A. cepa* geram as anormalidades como metáfases multipolares, atrasos e pontes cromossômicas, além de distribuição anormal dos cromossomos, poliploidias e aneuploidias. A formação de células binucleadas é decorrente da inibição da citocinese por agentes genotóxicos. Já os micronúcleos são resultantes de

fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal durante o ciclo de divisão celular, podendo ser consequência de defeitos na formação do fuso mitótico⁽¹¹⁾. Quando há necrose celular, pode-se identificar a vacuolização citoplasmática. Já quando a célula sofre apoptose, ocorre primeiramente a redução no tamanho da célula, com posterior fragmentação nuclear, formando os corpos apoptóticos. A frequência com que cada uma dessas aberrações cromossômicas é percebida demonstra se a substância é ou não citotóxica às células meristemáticas de *A. cepa*⁽¹²⁾.

Neste trabalho, as raízes que cresceram no “controle positivo”, na presença do agente mutagênico nitrato de cromo, apresentaram alto IAC (52/100), constituindo o parâmetro de mutagenicidade para o devido estudo.

Como objetivo direto deste trabalho, fez-se análise da fitotoxicidade de extrato aquoso da planta medicinal Confrei. Tal vegetal apresenta alcalóides pirrolizidínicos em sua constituição (como licopsamina, intermedina e seus acetil-derivados e, ainda, sinfitina), os quais são hepatotóxicos, podendo levar inclusive ao surgimento de câncer hepático⁽¹³⁾. Assim, a análise das lâminas com células meristemáticas de *A. Cepa* tratadas com solução de Confrei, procurou evidenciar possíveis aberrações

cromossômicas, em devida comparação com os efeitos mutagênicos evidenciados no "controle positivo" de nitrato de cromo.

As raízes que cresceram em contato com o extrato fluido de Confrei, chamadas de "tratamento", apresentaram na avaliação histológica as várias formas de aberrações cromossômicas descritas anteriormente, revelando maior índice de alterações entre as amostras, ou seja, maior IAC

CONCLUSÃO

Este estudo permitiu a compreensão objetiva de que os fitoterápicos não são inócuos. Pelo contrário, tem se observado que muitas plantas medicinais, vendidas e usadas indiscriminadamente pela população, podem causar graves efeitos colaterais,

(93/100). Afinal, vários trabalhos já haviam comprovado a presença de vários compostos que possuem altíssimos potenciais carcinogênicos e mutagênicos⁽¹⁾.

Além disso, esta pesquisa nos permitiu identificar que o potencial mutagênico e citotóxico do Confreié ainda maior do que do nitrato de cromo, fato que evidencia o grande perigo da ingestão da planta.

podendo haver inclusive potencial genotóxico ou mutagênico, como apresentado pelo Confrei. Nesse sentido, faz-se necessário a realização e difusão de novos estudos sobre as plantas medicinais para que, dessa forma, uma orientação efetiva seja feita à população pelo uso racional dos chamados medicamentos naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pinto AC, Veiga JuniorVF, Maciel, MAM. Plantas Medicinais: Cura Segura? Quim. Nova. 2005; 28(3): 519-528.
2. Rodrigues HG, Meireles CG, Lima JTS, Toledo GP, Cardoso JL, Gomes SL. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. Rev. bras. plantas med. 2011; 13(3): 359-366.
3. Toledo ACO, Duarte MR, Nakashima T. Análise farmacognóstica da droga e do extrato fluido das folhas de *Symphytumofficinale*L. (Boraginaceae). Ver. brasfarmacogn. 2003;13(Supl.2): 1-2.
4. Gomes MFPL, Massoco CO, Xavier JG, Bonamin LV. Comfrey (*SymphytumOfficinale*. L.) and Experimental Hepatic Carcinogenesis: A Short-term Carcinogenesis Model Study. Advance Access Publication. 2007; 7(2): 197-202.

5. Smith DB, Jacobson BH. Effect of a blend of comfrey root extract (*Symphytum officinale* L.) and tannic acid creams in the treatment of osteoarthritis of the knee: randomized, placebo-controlled, double-blind, multiclinical trials. *Journal of Chiropractic Medicine*. 2011;(10): 147-156.
6. Oliveira FQ, Gonçalves, LA. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev. Eletr. Farm.*[Internet]. 2006 [citado 2012 ago 12];3(2):36-41. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/view/2074/2016>.
7. Grant W. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Genotoxic Program. *Mutation Research*. 1982; 281: 89-92.
8. Bagatini MD, Silva ACF, Tedesco SB. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2007: 444-447.
9. Matsumoto ST. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*. 2006; 29: 148-158.
10. Caritá R, Marin-Morales MA. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere*. 2008; 72(5): 722-725.
11. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*. 2000; 455: 81-95.
12. Ventura BC. Investigação da mutagenicidade do azocorante comercial BDCP (Black Dye Commercial Product), antes e após tratamento microbiano, utilizando o sistema teste de *Allium cepa* [Tese]. Rio Claro: Instituto de Biociências/ Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2009. 205p.
13. Pozetti ZL. *Symphytum officinale*, sua toxicologia e a respectiva patogênese registrada na literatura homeopática. *Pesqui. homeopática*. 1991; 6(1): 29-33.