



POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATOS AQUOSOS DE *Mentha pulegium* L. PELO TESTE DE *Allium cepa* L.

Marília Tedesco¹, Andrielle Wouters Kuhn¹, Anderson Rossi de Aguiar², Antonio Carlos Ferreira da Silva³, Solange Bosio Tedesco⁴

1. Graduandas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Maria (marilia_tedesco@hotmail.com)
2. Pós-Graduando do PPGAgrobiologia da Universidade Federal de Santa Maria
3. Professor Doutor do PPGAgrobiologia da Universidade Federal de Santa Maria
4. Professora Doutora do PPGAgronomia da Universidade Federal de Santa Maria Av. Roraima, 1000 CEP 97105-900 Santa Maria, RS. Brasil.

Recebido em: 06/10/2012 – Aprovado em: 15/11/2012 – Publicado em: 30/11/2012

RESUMO

Mentha pulegium, conhecida popularmente como poejinho, poejo-real e menta-selvagem é usada pela comunidade no combate à febre. Atua como digestivo, expectorante e anti-espasmódico, sendo também utilizado no tratamento da dispepsia flatulenta e cólica intestinal. O efeito antiproliferativo de infusões de poejo sobre o ciclo celular de *Allium cepa* foi avaliado, utilizando-se ramos de uma população dessa espécie. As infusões foram preparadas em três concentrações: 5,0 g/L (concentração usual como chá), 15g/L e 30 g/L, além de serem usados como controles água destilada (negativo) e glifosato 3% (positivo). Utilizaram-se cinco grupos de quatro bulbos de cebola, cada grupo correspondendo a um tratamento. Os bulbos foram enraizados em água destilada e então transferidos para os respectivos tratamentos onde permaneceram por 24 horas. As radículas foram coletadas, fixadas em etanol-ácido acético (3:1) por 24 h e armazenadas em álcool 70%. Foram analisadas 2000 células por grupo de bulbos, e os índices mitóticos calculados submetidos a análise estatística pelo teste χ^2 . Os resultados indicaram que os extratos aquosos de poejo nas concentrações estudadas possuem ação antiproliferativa sobre o ciclo celular de *Allium cepa*.

PALAVRAS-CHAVE: *Mentha pulegium*, sistema teste vegetal, atividade antiproliferativa, planta medicinal.

ANTIPROLIFERATIVE POTENTIAL OF AQUEOUS EXTRACTS FROM *Mentha pulegium* L. ON THE *Allium cepa* L. TEST

ABSTRACT

Mentha pulegium, popularly known as peppermint, is used by people in the treatment of diseases as medicinal plant. The antiproliferative effect of infusions of *M. pulegium* on the cell cycle of *Allium cepa* was evaluated using branches cultivated of a population of this species. Infusions were prepared in three concentrations: 5.0 g/L (usual tea concentration), 15g/L and 30 g/L. Distilled water and glyphosate 3% were used as negative and positive control, respectively. Five groups of four

onion bulbs were used, each group represents one of the treatments. Bulbs were grown in distilled water and transferred to the respective treatments for 24 h. Roots were collected and fixed in 3:1 (ethanol: acetic acid) for a 24 h period and stored in 70% ethanol under refrigeration. We analyzed 2000 cells for bulb group and mitotic indices were calculated and analyzed statistically using the test χ^2 . Results showed that the aqueous extracts of *M. pulegium* in the concentrations studied possess antiproliferative action on the cell cycle of *Allium cepa*.

KEYWORDS: *Mentha pulegium*, test system vegetal, antiproliferative activity, medicinal plant.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são muito utilizadas na medicina popular, sendo algumas vezes, a única fonte de medicação que a população tem acesso. No entanto, sua utilização inadequada e não controlada pode causar mais danos do que benefícios para saúde humana (AMORIM *et al.*, 2007; LANINI *et al.*, 2009).

A família Lamiaceae possui aproximadamente 4000 espécies distribuídas em 220 gêneros, cujas espécies são representadas em geral por ervas, subarbustos ou arbustos e encontram-se distribuídas em quase todas as regiões do globo, especialmente na região do Mediterrâneo e Ásia central (ALMEIDA & ALBUQUERQUE, 2002). As espécies desta família acumulam substâncias com grande diversidade estrutural, tais como esteroides, flavonoides, iridoides e terpenoides, incluindo os triterpenos pentacíclicos (ESEQUIVEL *et al.*, 1996). Estes últimos são conhecidos por apresentarem atividades antitumoral, anti-HIV, anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, entre outras (TOPÇU, 2006; CHEN, 2009; CONNOLLY & HILL, 2009).

O gênero *Mentha* (Lamiaceae) compreende aproximadamente 25 a 30 espécies que podem ser encontradas na América do Sul. Algumas delas produzem óleos voláteis que são de grande importância econômica nas indústrias farmacêutica e de alimentos (DORMAN *et al.*, 2003).

Mentha pulegium, conhecida popularmente como poejinho, poejo-real e menta-selvagem é usada pela comunidade no combate à febre (MOREIRA *et al.*, 2002). Atua como digestivo, expectorante e anti-espasmódico (LORENZI *et al.*, 2002). Também é tradicionalmente utilizado no tratamento da dispepsia flatulenta e cólica intestinal, devido às suas propriedades carminativas e antiespasmódica (NEWALL *et al.*, 1996).

Inúmeras plantas que são usadas em preparações fitoterápicas necessitam de um maior controle de qualidade, uma vez que a literatura científica indica que muitas destas podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (CAPASSO *et al.*, 2000). Em decorrência disso, a utilização de ensaios biológicos para o monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos químicos isolados tem sido freqüentemente incorporada à identificação e monitoramento de substâncias potencialmente tóxicas (NOLDIN *et al.*, 2003).

De acordo com SILVA *et al.*, (2003), a maioria dos biotestes buscam agentes que possam afetar os níveis fisiológico e molecular do organismo exposto e devido a universalidade do código genético, se o agente causar danos ao DNA, ele têm potencial genotóxico em qualquer tipo de células (animal, vegetal ou de microrganismos).

Devido a este intenso uso de plantas medicinais, estudos de toxicidade e mutagenicidade são necessários por contribuírem para sua utilização segura e

eficaz. O índice mitótico e índice de replicação são usados como indicadores de proliferação adequada das células (GADANO *et al.*, 2002), o qual pode ser medido através do sistema teste vegetal de *Allium cepa*. O método da aberração cromossômica em raízes de *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, WHO) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA & RODRIGUEZ, 1999; SILVA *et al.*, 2004).

Baseado nesse contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial genotóxico e antiproliferativo de extratos aquosos (infusões) da espécie *Mentha pulegium* pelo teste *in vivo* de *Allium cepa*.

METODOLOGIA

Coleta das plantas

Ramos de uma população de *Mentha pulegium* foram coletados no município de Tupanciretã, Rio Grande do Sul, Brasil. Foi depositada uma amostra testemunha (exsicata) no herbário SMDB (Santa Maria Departamento de Biologia), da UFSM. O experimento foi conduzido no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade, Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Preparo das infusões

Folhas secas de *Mentha pulegium* foram pesadas em balança de precisão, colocadas em um béquer (1L) e então adicionada água destilada à temperatura de 100°C, onde permaneceram em infusão por 10 minutos. Após, os extratos aquosos foram filtrados e resfriados à temperatura ambiente. As infusões foram preparadas em três concentrações: 5g/L, 15g/L e 30g/L, sendo 5g/L a concentração comumente utilizada pela população para o preparo de chás.

Ensaio biológico

Foram utilizados cinco grupos de quatro bulbos de *Allium cepa*, cada grupo correspondendo a um dos tratamentos. Os cinco grupos de bulbos foram colocados para enraizar em água destilada e após a emergência das raízes, cada grupo foi transferido para o seu respectivo tratamento. O primeiro grupo foi usado como controle negativo, mantendo-se em água destilada e os restantes, respectivamente, foram transferidos para os seguintes tratamentos: glifosato 3% (controle positivo), chá de 5g/L, chá de 15g/L e chá de 30g/L, onde permaneceram por 24 horas. Então, as radículas foram coletadas e fixadas em etanol:ácido acético (3:1) durante 24 horas. Após esse período, as raízes foram mantidas em álcool 70% e conservadas sob refrigeração até o preparo das lâminas.

Efeitos das infusões sobre o ciclo celular de *Allium cepa*

Foram preparadas duas lâminas por bulbo de cebola, utilizando-se uma raiz por lâmina. Para o preparo das lâminas, as radículas de *Allium cepa* foram hidrolisadas em HCl 1N por cinco minutos e, então, lavadas em água destilada e coradas com orceína acética 2%. A região meristemática das radículas foi fragmentada com o auxílio de agulhas histológicas, e a lamínula colocada sobre o material (GUERRA & SOUZA, 2002). Foi feita a análise de 500 células de cada

repetição (bulbo), totalizando 2000 células por tratamento. As lâminas foram avaliadas com auxílio de microscópio óptico com a objetiva de 40X, observando-se as células em interfase e divisão celular (mitose) para calcular o Índice Mitótico (IM), bem como, a ocorrência de aberrações celulares, como presença de pontes, cromossomos retardatários, micronúcleos, células binucleadas, entre outras.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste χ^2 , usando o pacote estatístico BioEstat 4.0 (AYRES & AYRES, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizou-se para a realização deste trabalho o sistema teste vegetal de *Allium cepa* para avaliar os efeitos dos extratos aquosos de *Mentha pulegium*. Os testes de citotoxicidade utilizando sistema teste vegetal *in vivo*, como o de *Allium cepa*, estão validados por vários pesquisadores que realizam de forma conjunta teste animal *in vitro* e os resultados obtidos são similares (VICENTINI *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos mostraram que os valores dos índices mitóticos variaram de 6,6% do controle em água a 0% para o extrato aquoso sob infusão na concentração de 30g/L (Tabela 1).

TABELA 1. Número de células nas diferentes fases do ciclo celular de células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* tratados com diferentes extratos de *Mentha pulegium*.

Tratamentos	Ciclo Celular (Fases)										Índice Mitótico (%)
	Intérfase		Prófase		Metáfase		Anáfase		Telófase		
	RE*	IR**	RE	IR	RE	IR	RE	IR	RE	IR	
Água (controle negativo)	1868	-	70	-	21	-	18	-	23	-	6,6 a
Glifosato (controle positivo)	1969	-	20	-	2	-	-	-	9	-	1,55 c
Chá 5g/L	1995	-	4	-	-	1	-	-	-	-	0,25 d
Chá 15g/L	1964	-	30	-	2	-	-	1	3	-	1,8 b
Chá 30g/L	2000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 e

*RE = Regular; **IR= Irregular.

*Irregularidades: quebra na metáfase e ponte na anáfase.

Foram encontradas somente duas células que apresentaram irregularidades cromossômicas durante a divisão celular, uma delas em metáfase e outra em anáfase (Tabela 1). O aparecimento dessas irregularidades cromossômicas não foi significativo. Outros autores, como LUBINI *et al.*, (2008); DALLA NORA *et al.*, (2010) e SOUZA *et al.*, (2010) encontraram atividade genotóxica pelo teste de *Allium cepa* em extratos de plantas em *Psychotria myriantha*, *Mikania glomerata* e *Artemisia verlotorum*, respectivamente.

O índice mitótico diferiu significativamente do controle em água de 6,6% para 0,25% ($\chi^2 = 9.284$) na concentração de 5g/L do extrato aquoso de poejo. Também houve diferença significativa entre o controle em água e o extrato aquoso de poejo na concentração de 15g/L ($\chi^2 = 15.001$). Além disso, a redução do índice mitótico também foi significativa entre os dois controles ($\chi^2 = 71.913$), água destilada (negativo) e glifosato 3% (positivo), onde a água apresentou índice mitótico de 6,6% e o glifosato de 1,55%.

Estudos de sensibilidade e de correlação do bioteste de *Allium cepa* e de outros biotestes são fundamentais para avaliar com precisão os riscos ambientais, assim como extrapolar os dados para outros organismos, incluindo seres humanos. Os testes para a detecção de riscos para a saúde humana são realizados com vários sistemas de teste, incluindo o de *Allium cepa* (LEME *et al.*, 2009).

Foi observado que houve decréscimo nos valores dos índices mitóticos para todos os tratamentos utilizados, sendo que na concentração de 30g/L a redução foi total (Tabela 1). O controle positivo diferiu do controle negativo, no entanto, os tratamentos com extratos de *Mentha pulegium* nas concentrações de 5g/L e 30g/L mostraram valores menores que o mesmo. A inibição da divisão celular observada através dos valores dos índices mitóticos em *Mentha pulegium* demonstra que essa espécie possui capacidade antiproliferativa. Resultados similares que demonstram a atividade antiproliferativa de espécies vegetais foram registrados por KNOLL, *et al.*, (2006) estudando *Pterocaulon polystachyum* (quitoco), onde observaram que os índices mitóticos em uma das populações estudadas foram reduzidos de 7,5% a 0,03%. Além disso, estudos de *Solidago microglossa* (erva-lanceta) foram realizados por BAGATINI *et al.*, (2009), onde também foi demonstrado que essa espécie, na maior concentração estudada, causou uma redução no índice mitótico comparado com os controles. Segundo FACHINETTO *et al.*, (2007) e SOUZA *et al.*, (2010), os índices mitóticos encontrados para as infusões de *Achyrocline satureioides* (marcela) e *Artemisia verlotorum* (infalivina), respectivamente, também apresentaram diminuição significativa quando comparados com o controle em água.

CONCLUSÃO

Através da análise dos resultados das infusões em diferentes concentrações de *Mentha pulegium* pelo sistema teste de *Allium cepa*, foi possível verificar a presença de atividade antiproliferativa e não genotóxica da espécie, indicando seu potencial para inibição do ciclo celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C.F.C.B.R.; ALBUQUERQUE, U.P. Check-list of the Family Lamiaceae in Pernambuco, Brazil. **Braz Arch Biol Technol.** 45(3):343-53, 2002.

AMORIM, M.F.D.; DINIZ, M.F.F.M.; ARAÚJO, M.S.T.; PITA, J.C.L.R.; DANTAS, J.G.; RAMALHO, J.A.; XAVIER, A.L.; PALOMARO, T.V.; JÚNIOR, N.L.B. The controvertible role of kava (*Piper methysticum* G. Foster) an anxiolytic herb, on toxic hepatitis. **Rev Bras Farmacogn**, 17: 448-454, 2007.

AYRES, M. **Bioestat 3.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas** (Brasília: Sociedade Civil Mamirauá), 2003.

BAGATINI, M.D.; FACHINETTO, J.M.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. **Rev. Bras. Farmacogn**. 19(2B): 632-636, 2009.

CABRERA, G.L.; RODRIGUEZ, D.M.G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutat Res-Fund Mol M**, 426: 211-214, 1999.

CAPASSO, R.; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**. v. 71, n.1. p. S58-S63, agos/2000.

CHEN, I. H.; LU, M. C.; DU, Y. C.; YEN, M. H.; WU, C. C.; CHEN, Y. H.; HUNG, C. S.; CHEN, S. L.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Cytotoxic Triterpenoids from the Stems of *Microtropis japonica*. **J. Nat. Prod**, 72:1231-6, 2009.

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. **Nat. Prod. Rep.**, 26, 1321, 2009.

DALLA NORA, G.; PASTORI, T.; LAUGHINGHOUSE, IV.H.D.; CANTO-DOROW, T.S.; TEDESCO, S.B. Antiproliferative and genotoxic effects of *Mikania glomerata* (Asteraceae). **Biocell**, 34(3): 95-101, 2010.

DORMAN, H.J.; KOŞAR, M.; KAHLOS, K.; HOLM, Y.; HILTUNEN, R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties and cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.4563-9, 2003.

ESEQUIVEL, B.; CALDERÓN, J. S.; SÁNCHEZ, A. A.; RAMAMOORTHY, T. P.; FLORES, E. A.; DOMÍNGUEZ, R. M. **Rev. Latinoam. Quim.**, 24, 44, 1996.

FACHINETTO, J.M.; BAGATINI, M.D.; DURIGON, J.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. 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.

GADANO, A.; GURNI, A.; LÓPEZ. P.; FERRARO. G.; CARBALLO, M. *In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*.L. **Ethnopharmacol**, 81: 11-16, 2002.

GUERRA, M., SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos: Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. (Ribeirão Preto: Ed. Funpec), 2002.

KNOLL, M.F.; SILVA, A.C.F.; CANTO-DOROW, T.S.; TEDESCO, S.B. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genet. Mol. Biol**, 29: 539-542, 2006.

LANINI, J.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; NAPPO, S.; CARLINI, E.A. "O que vêm da terra não faz mal" - relatos de problemas relacionados ao uso de plantas medicinais por raizeiros de Diadema/SP. **Rev Bras Farmacogn**, 19: 121-129, 2009.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, 682, 71–81. 2009

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002, 544p.

LUBINI, G.; FACHINETTO, J.M.; LAUGHINGHOUSE, IV.H.D.; PARANHOS, J.T.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO S.B. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. **Biologia**, 63(5): 647-651, 2008.

MOREIRA, R.C.T.; COSTA, L.C.B.; COSTA, R.C.S.; ROCHA, E.A. Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.21, n.3, p.1-7, 2002.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. *Herbal Medicines. A guide for Health-care Professionals*. London : **The Pharmaceutical Press**.1996.

NOLDIN, V.F.; MONACHE, F.D.; YUNES, R.A. Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L. cultivada no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v.26, n.3, p.331-334, 2003.

SILVA. C.R.; MONTEIRO. M.R.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO. A.; BEZERRA, R.J.A.C. Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. **Rev Bras Farmacogn**, 14(Supl. 1): 1-3. 2004.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicologia**. Porto Alegre, Alcance, 2003, 422p.

SOUZA, L.F.B.; LAUGHINGHOUSE IV.H.D.; PASTORI, T.; TEDESCO, M.; KUHN, A.W.; CANTO-DOROW, T.S.; TEDESCO, S.B. Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. **Int. J. Environ. Stud**, 67(6): 871-877, 2010.

TEIXEIRA, R.O.; CAMPAROTO, M.L.; MANTOVANI, M.S.; VICENTINI, V.E.P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. *in vivo* assays, **Genet Mol Biol**, 26: 551-555, 2003.

TOPÇU, G. Bioactive terpenoids from *Salvia* species. **J Nat Prod** 69: 482-487, 2006.

VICENTINI, V.E.P., CAMPAROTO, M.L., TEIXEIRA R.O., MANTOVANI, M.S. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, 23: 593-598, 2001.