

TOXICIDADE DO ÓLEO DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas*) EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *Lactuca sativa*

**Carolina Mastella Botelho¹, Larissa Fonseca Andrade Vieira², Marcel José Palmieri³
Bruno Galvêa Laviola⁴, Milene Miranda Praça Fontes⁵**

¹Universidade Federal do Espírito Santo - Centro de Ciências Agrárias, Alegre – ES, Brasil,
carol-cmb@hotmail.com

²Universidade Federal do Espírito Santo - Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Produção Vegetal,
Alegre – ES, Brasil, larissa_lavras@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, Lavras – MG, Brasil,
marcelpalmieri@yahoo.com.br

⁴Embrapa Agroenergia, Brasília-DF, Brasil, bruno.laviola@embrapa.br

⁵Universidade Federal do Espírito Santo - Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Produção Vegetal,
Alegre – ES, Brasil, milenemiranda@yahoo.com.br

Resumo- O pinhão-manso tem se destacado como uma oleaginosa potencial para a produção de biocombustível. Além do óleo extraído das sementes, que pode ser utilizado como biodiesel, a torta produzida pode ser utilizada na alimentação animal. No entanto, estudos revelaram que as sementes de pinhão manso são tóxicas e essa toxicidade tem sido testada em animais, levando-os à morte. Variedades de pinhão-manso sem compostos tóxicos estão sendo desenvolvidas no Brasil e para a realização de testes de ausência de toxicidade modelos vegetais são uma alternativa. O presente trabalho teve como objetivo verificar a ação do óleo de pinhão-manso em células meristemáticas do modelo vegetal *Lactuca sativa*. O índice mitótico e alterações cromossômicas foram avaliados. Foi observado que o óleo de pinhão-manso é capaz de diminuir o percentual de células em divisão na região meristemática de raízes de alface e aumentar a frequência de células com aberrações cromossômicas ou nucleares.

Palavras-chave: efeito citotóxico, efeito genotóxico, *Lactuca sativa*, índice mitótico

Área do Conhecimento: Mutagênese - Ciências Biológicas

Introdução

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) tem se apresentado como uma oleaginosa importante sendo usado como fonte alternativa de óleo para a produção de biodiesel (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009). O óleo é extraído das sementes e como resultado da extração é gerada a torta, uma fase sólida, rica em proteína que pode ser aproveitada como suplemento protéico na ração animal (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009). No entanto, estudos com diversos animais demonstraram que as sementes de pinhão-manso são tóxicas. Esta toxicidade vem sendo relacionada com a presença de vários fatores nos grãos, dentre eles a curcina (uma proteína) e estéres de forbol (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009).

O éster de forbol é considerado o principal componente tóxico do pinhão-manso. Ele é uma substância lipossolúvel, motivo pelo qual é extraído juntamente com óleo (dose de 0.3 a 0.6mL) (BEGG; GASKIN, 2009). Logo, por ter grande concentração deste composto tóxico o óleo deve ser manipulado com cuidado, tendo em vista que em ratos foi observado DL50 de apenas 6mL/Kg do animal (GANDHI et al, 1995).

A torta do pinhão-manso teria grande potencial para ser utilizada aproveitada fonte de proteína na nutrição de ruminantes, viabilizando e incentivando a expansão do cultivo da espécie. No entanto, apresenta cerca de 6 a 14% de óleo residual, resultante da extração mecânica, inviabilizando seu aproveitamento (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009).

Neste contexto, como a maioria das variedades existentes no Brasil contem altos teores de éster de forbol nas sementes e são consideradas tóxicas, a Embrapa Agroenergia vem desenvolvendo pesquisas a fim de atenuar e até mesmo eliminar os fatores tóxicos na torta diminuindo os riscos de impactos ambientais e contribuindo para a valorização do co-produto na nutrição animal (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009). A fim de certificar-se da eficiência dos processos de detoxificação, testes *in vivo* com modelos animais devem ser empregados (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009). Considerando que os testes de toxicidade em animais leva a morte dos mesmos, alternativas para análise do potencial tóxico do óleo de pinhão manso devem ser consideradas.

Neste sentido, os bioensaios com plantas superiores apresentam-se como excelente

ferramenta para análise de toxicidade de substâncias químicas a compostos complexos. Além da utilização de plantas como modelos de estudo ser vantajosa, pois os testes realizados são baratos, rápidos e fáceis de serem conduzidos, os bioensaios vegetais são tão sensíveis como outros testes utilizados para o mesmo fim e apresentam boa correlação com os modelos animais (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SOUSA, SILVA E VICCINI, 2009). Os bioensaios com modelos vegetais permitem avaliar o potencial tóxico da substância testada através da avaliação de danos ao DNA, observando a presença de aberrações cromossômicas e distúrbios no ciclo mitótico, sendo possível verificar se o composto estudado é genotóxico, mutagênico ou carcinogênico (LIU et al., 2005; LEME E MARIN-MORALES, 2009).

Diante do exposto, este trabalho faz parte de uma iniciativa da UFES em parceria com a Embrapa Agroenergia, que objetiva verificar a eficiência de bioensaios vegetais para avaliar a toxicidade do óleo do pinhão-manso a fim de incorporar estes testes na validação dos experimentos de detoxificação. Desarte, o intuito do trabalho foi verificar a ação do óleo de pinhão-manso em células meristemáticas do modelo vegetal *Lactuca sativa*.

Metodologia

Material: Sementes de alface, variedade Grandes Lagos Americana (Isla Sementes), foram adquiridas em casas comerciais e germinadas em placas de Petri, cobertas com papel alumínio, a $24^{\circ} \pm 2C$, em câmara de germinação (B.O.D.), na presença de 5 mL de água destilada ou dos tratamentos com diferentes concentrações de óleo de *Jatropha curcas*.

Métodos: Seis concentrações de óleo foram testadas quanto a sua toxicidade: óleo 1 (5%), óleo 2 (20%), óleo 3 (35%), óleo 4 (50%), óleo 5 (65%) e óleo 6 (80%). O óleo foi intensamente misturado com água destilada e aplicado em papel filtro. Como tratamento controle foi utilizada a água destilada. Após 48 horas de tratamento as raízes foram coletadas e fixadas em Etanol: Ácido Acético (3:1), sendo armazenadas no freezer por pelo menos 24 horas. Para análise citogenética as lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e coradas com Orceína acética 2%. Foram avaliadas em torno de 5000 células meristemáticas para cada tratamento sendo observadas e anotadas as diferentes fases da divisão mitótica, possíveis alterações cromossômicas e nucleares. O índice mitótico (IM) foi obtido dividindo o número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo total de células avaliadas em cada tratamento. A frequência de alterações cromossômicas e

nucleares foi obtida dividindo o número de alteração (cromossômica e nuclear, respectivamente) pelo número total de células avaliadas.

Avaliação Estatística: Para todos os parâmetros avaliados foi feito análise de variância e testes de média a fim de comparar os tratamentos avaliados com o controle. Foi empregado o teste de Tukey a 1% de probabilidade ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de significância.

Resultados

O número total de células observadas em cada tratamento e o IM médio dos mesmos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Total de células avaliadas e média do índice mitótico de células meristemáticas de raízes de alface após tratamentos com diferentes concentrações de óleo de pinhão manso

Tratamentos	Total de células	Índice Mitótico
Controle	5968	8.85 \pm 0.99
Óleo 1	4257	5.61 \pm 0.69*
Óleo 2	4264	3.93 \pm 0.59*
Óleo 3	5153	3.95 \pm 0.41*
Óleo 4	4849	3.66 \pm 0.71*
Óleo 5	4677	2.52 \pm 0.63*
Óleo 6	4370	2.49 \pm 0.91*

As médias seguidas de (*) são significativamente diferentes do controle pelo teste de Tukey ($p < 0.01$).

Foi observado que o óleo de pinhão-manso é capaz de alterar o percentual de células em divisão na região meristemática de raízes de alface, utilizada como sistema teste. A diminuição do IM é dependente da concentração de óleo aplicada: quanto maior a quantidade de óleo utilizada, menor o IM. Redução significativa (Tukey, $p < 0.01$) já é observada na menor concentração de óleo testada (5%). Esta redução no IM vai de 36.61%, observada na primeira concentração de óleo aplicada, a 71.86% para o tratamento de maior concentração (80%). Observou-se ainda que a segunda concentração de óleo (20%) reduz em torno de 50% (redução observada é de 55.6%) a frequência de células em divisão quando comparado com o controle.

Em adição a atividade mitodepressiva o óleo de pinhão-manso apresentou atividade citotóxica. Foram observadas alterações no ciclo celular e no núcleo interfásico em células de raízes tratadas

com óleo. A Tabela 2 mostra que a frequência de alterações nas células meristemáticas aumentou significativamente com o aumento da concentração de óleo empregado. Para as alterações cromossômicas aumento significativo foi observado já na menor concentração de óleo de pinhão-mansão aplicada (5%). As aberrações mais frequentemente observadas ocorreram durante a metáfase, destacando-se a ocorrência de c-metáfases e cromossomos pegajosos.

Dentre as alterações nucleares a condensação do núcleo, formando núcleos arredondados e fortemente corados, foi mais freqüente. Neste caso aumento significativo, quando comparado com o controle, foi observado a partir da segunda concentração aplicada (20% de óleo).

Tabela 2 – Frequência média de alterações cromossômicas e nucleares observadas em células meristemáticas de raízes de alface após tratamentos com diferentes concentrações de óleo de pinhão-mansão

Óleo	Alterações Cromossômicas	Alterações Nucleares
Controle	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Óleo 1	1.09 ± 0.87*	0.59 ± 0.31
Óleo 2	0.95 ± 0.34*	9.11 ± 5.49*
Óleo 3	1.28 ± 0.83*	7.94 ± 2.85*
Óleo 4	1.17 ± 0.77*	11.35 ± 4.61*
Óleo 5	1.27 ± 0.62*	12.89 ± 4.07*
Óleo 6	0.79 ± 0.01	5.71 ± 1.55*

As médias seguidas de (*) são significativamente diferentes do controle pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

Discussão

A análise do ciclo celular de células meristemáticas do modelo vegetal *Lactuca sativa* submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de óleo extraídos de sementes de pinhão-mansão mostrou efeitos citotóxicos e genotóxicos do mesmo.

O óleo de pinhão-mansão é conhecido por ser tóxico devido à presença do composto éster de forbol. O ensaio citogenético realizado neste estudo mostrou que o óleo atua de alguma forma no DNA em função das alterações cromossômicas e nucleares observadas, sendo, portanto genotóxico, e que ainda altera o funcionamento de estruturas celulares, atuando como substância citotóxica.

As análises de aberrações cromossômicas e de índice mitótico permitiram a avaliação de

diferentes *endpoints*. A redução do índice de células em divisão demonstra um efeito mitodepressivo do óleo (CAMPOS ET AL, 2009). Este efeito pode estar relacionado com o efeito do éster de forbol como um ativador das muitas isoformas da proteína quinase - C (PKC) (ZHANG, et al., 1995; ANDREW et al., 2009). PKCs atuam como reguladoras de muitos processos celulares, incluindo a transição de fases dentro do ciclo celular.

A presença de cromossomos pegajosos reflete o efeito genotóxico do óleo de pinhão-mansão. Os cromossomos pegajosos representam uma alteração na estrutura cromossômica que promove a perda das características normais de condensação dos cromossomos, causando a formação de aglomerados (BABICH et al, 1997). O aspecto pegajoso é consequência da ação do composto tóxico sobre a estrutura físico-química do DNA e/ou de proteínas levando a formação de complexos com grupos fosfato no DNA, a condensação do DNA ou a formação de ligações inter e intra cromatídicas (EL-GHAMERY et al, 2003). Esta alteração é geral e irreversível podendo levar a morte celular. A ocorrência de núcleos condensados é uma característica que pode ser atribuída ao processo de morte celular programada da célula, demonstrando mais uma vez a ação tóxica do óleo (ANDRADE et al, 2011).

Outra alteração cromossômica que foi frequente é a c-metáfase. Este tipo de alteração é assim denominada em função da observação de cromossomos espalhados no equador da célula à semelhança de células tratadas com o anti-tubulínico colchicina. A observação de células com c-metáfase indica que o agente tóxico está agindo nas fibras do fuso impedindo a continuação do ciclo mitótico. Como consequência desse distúrbio, ocorre a paralização do ciclo celular em metáfase e os cromossomos são vistos muito condensados com o centrômero bem definido e espalhados no interior da célula (FISKEJÖ, 1985).

Neste sentido, as análises citogenéticas realizadas no bioensaio com *Lactuca sativa* confirmaram a toxicidade do óleo de pinhão-mansão, demonstrando que ele exerce efeito aneugênico nas células atuando nas proteínas celulares (ancoradas aos cromossomos ou do fuso mitótico) (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Conclusão

O trabalho apresentado representou a primeira abordagem do efeito tóxico do óleo de pinhão mansão através de bioensaios vegetais. Foi possível demonstrar que as análises citogenéticas são eficientes para mostrar o efeito tóxico do óleo podendo ser utilizada na avaliação de toxicidade e

na avaliação da eficiência dos processos de detoxificação.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq e a FAPES pelo apoio financeiro.

Referências

- ANDRADE, L.F., DAVIDE, L.C., GEDRAIT, L.S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum and inorganic oxides present in Spent Pot Liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotox. Environ. Saf.**, 73, p.626-631, 2010.

- ANDRADE-VIEIRA, L. F., GEDRAIT, L. S., CAMPOS, J. M. S., DAVIDE, L. C. Spent Pot Liners (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.882 - 888, 2011.

- ANDREW, J.K., et al. Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. **J. of Exp. Environ. Botany** 60, p.1-9, 2009.

- BABICH, H., SEGAOLI, M. A., FOX, K. D. The *Allium* test – A simple, eukaryote genotoxicity assay. **Am Biol Teach**. p. 59, 580-583, 1997.

- BEGG, J., GASKIN, T. *Jatropha Curcas*.(PIM570). In: CHEMICAL Safety Information from Intergovernmental Organizations. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/pims/plant/jcurc.htm>> Acessado em: 08 jun. 2011.

- BEUTLER J.A., et al. Distribution of phorbol ester bioactivity in the Euphorbiaceae. **Phytotherapy Research** 3, p. 188-192,1989.

- CAMPOS, J. M. S., DAVIDE, L. C., SOARES, G. L. G., VICCINI, L. F. Mutagenic effects due to allelopathic action of fern (Gleicheniaceae) extracts. **Allelopathy Journal**. 22, p.143-152, 2008.

- EI-GHAMERY, A.A., EI-KHOY, M.A., EI-YOUSSEER, M.A.A. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. **Mutat. Res**. 537, p.29-41, 2003.

- FISKESJO, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**. 102, p.99-112, 1985.

- GANDHI, V.M., CHERIAN, K.M., MULKY, M.J. Toxicological studies on ratanjyot oil. **Food Chem. Toxicol**. p.33, 39–42.

- LEME, D. M., MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mut. Res**. 682, p.71–81, 2009.

- LIU, W., LI, P.J., QI, X.M., ZHOU, Q.X., ZHEG, L., SUN, T.H., YANG, Y.S. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. **Chemosphere** 61, p.158-167, 2005.

- MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G. Uso Potencial e Toxicidade da Torta de Pinhão-mansão. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009. (Embrapa Agroenergia. Comunicado técnico, 1). Disponível em: <http://www.cnpae.embrapa.br/publicacoes-para-download/ct_01.pdf/view>. Acesso em: 15 jun. 2011.

- SOUSA, S.M.; SILVA, P.S.; VICCINI, L.F. Cytogenotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemon grass) aqueous extracts in vegetal test systems. Anais da Academia Brasileira de Ciências 82(2): p. 305-311, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aabc/v82n2/06.pdf>> Acesso em: 9 jan. 2011.

- ZHANG G., et al. Crystal structure of the Cys2 activator-binding domain of protein kinase Cd in complex with phorbol ester. **Cell** 81, p. 917-924,1995.