

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 feita 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 ± 0.99
Óleo 1	4257	5.61 ± 0.69*
Óleo 2	4264	3.93 ± 0.59*
Óleo 3	5153	3.95 ± 0.41*
Óleo 4	4849	3.66 ± 0.71*
Óleo 5	4677	2.52 ± 0.63*
Óleo 6	4370	2.49 ± 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 manso 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-YOUSER, 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 Toxidez da Torta de Pinhão-manso. 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.