



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS**  
**ESCOLA DE FORMAÇÃO DE PROFESSORES E HUMANIDADES**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**FERNANDA DE PAULA AMORIM**

---

---

O Uso de Ovos de *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758)  
na Avaliação do Potencial Mutagênico do Extrato de  
*Brosimum gaudichaudii* (Moraceae).

---

---

**Goiânia**  
**2021**

**FERNANDA DE PAULA AMORIM**

---

---

O Uso de Ovos de *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758) na  
Avaliação do Potencial Mutagênico do Extrato de *Brosimum*  
*gaudichaudii* (Moraceae).

---

---

Monografia apresentada à Escola de Formação  
de Professores e Humanidades da Pontifícia  
Universidade Católica de Goiás como requisito  
parcial à obtenção do título de licenciatura em  
biologia.

Orientador: Dr. Cláudio Carlos da Silva

Coorientadora: Ms. Rafaela Sousa Mendes

**Goiânia**

**2021**

Dedico a **Deus** pela sua presença constante em minha vida, graça, misericórdia e por seu amor sem fim.

A minha filha **Alice de Paula Azevedo** que é minha maior fonte de amor.

Ao meu melhor amigo e amor da minha vida **Gildeone Gonzaga de Azevedo**.

Aos meus pais **Francisco Amorim da Costa** e **Maria Aparecida de Paula Amorim** pelo amor sacrificial e por sempre acreditarem em mim.

*Agradeço primeiramente a **Deus**, por me sustentar e ser meu consolo, por ser meu auxílio e fortaleza, pela sua graça e misericórdia que me alcançaram e o seu amor que me libertou, toda honra, glória e louvor sejam dados a ti Senhor, com todo o meu ser eu te agradeço.*

*A minha filha **Alice de Paula Azevedo** que teve que abdicar muitas vezes de seu tempo comigo para que eu pudesse realizar esse trabalho com dedicação, obrigada por ser a melhor filha e o melhor presente que eu poderia receber. Eu jamais teria chegado aqui sem você, que é a minha maior fonte de amor e é esse amor que me motiva a sempre procurar crescimento para que possamos desfrutar juntas de um futuro melhor, eu te amo demais.*

*Ao **Gildeone Gonzaga de Azevedo** por ser meu parceiro e melhor amigo, o homem dos meus sonhos. Agradeço por sempre me apoiar, por sempre estar ao meu lado e compreender as minhas crises, por me amar incondicionalmente e nunca colocar obstáculos quando se trata de cuidar de mim, por amar a nossa filha e desenvolver o papel de pai da melhor forma possível! Sem você, vida, esse trabalho jamais teria sido desenvolvido. Com todo o meu amor, obrigada!*

*Aos meus pais **Francisco Amorim da Costa e Maria Aparecida de Paula Amorim** que se sacrificaram tanto, que financeiramente nunca deixaram me faltar nada, que me deram incentivos para que eu pudesse continuar e não me deixaram desistir. Obrigada por me ensinarem o que é amor sacrificial, obrigada por serem os melhores pais do mundo e um grande exemplo na minha vida. Eu amo demais vocês.*

*Ao meu irmão **Frederico Augusto de Paula Amorim**, que é um dos homens mais inteligentes que eu conheço, que me inspira e que é responsável por me fazer feliz sempre que sentamos pra jogarmos conversa fora, que é o único irmão que tenho e é um grande exemplo de irmão mais velho. Eu amo você.*

*A minha coorientadora e grande amiga Ms. **Rafaela Souza Mendes** que é com certeza um dos alicerces da minha vida, que passou dias sentada comigo escrevendo esse trabalho e comendo chocolate, compreendendo cada dificuldade minha, que me viu chorar, pensar em desistir e desesperar várias vezes e que com toda sabedoria me acalmou. Sem todo esse apoio eu jamais teria conseguido concluir a parte teórica deste trabalho. É uma honra ter você participando de umas*

*das maiores conquistas da minha vida tão de pertinho e espero tê-la em várias outras. Eu te amo muito.*

*A minha amiga **Ana Paula da Silva Valverde** que sempre, desde sempre, esteve ao meu lado, que é uma confidente, que é de minha total confiança e é amada por mim e por todos da minha família. Uma amiga que topa tudo e que faz parte da minha rede de apoio, que acredita no meu potencial e nunca me deixa ficar pra baixo e desistir. Amiga a nossa conexão e amor não pertencem a esse mundo, você é para mim um presente enviado por Deus e a nossa amizade é uma raridade. Eu te amo.*

*A minha amiga **Luiza Manuelle Damasceno da Silva** que se entregou para que esse TCC fosse realizado em tempo, passou dias, finais de semana e feriados comigo fazendo as análises para que tudo saísse no tempo certo, pelos almoços e quebra de dietas, os momentos de muita descontração e risadas com certeza sem você eu jamais teria terminado a parte prática do meu trabalho, você alegra meus dias, dizem que encontrar verdadeiros amigos é como encontrar uma joia de grande valor e eu encontrei você. Te amo.*

*A Turma 2016/2 (Turma do fundão) que fizeram meus últimos anos super agradáveis, pela nossa união e parceria, pelos lanches e vaquinhas para o refrigerante, a melhor e melhor turma universitária que já existiu sem dúvidas! Em especial agradeço a **Gustavo Leonel Marinho**, que é um amigo que sempre me ouviu e sempre foi paciente comigo, ao **Vinícius Lima e Silva**, que é um dos meus maiores protetores e ao **Diego Michel Fernandes da Silva** que sempre me socorreu durante esses anos nas matérias e nas questões da vida. Eu amo cada um de vocês grandemente.*

*Ao meu orientador Prof. Dr. **Cláudio Carlos da Silva**, que é o ser mais iluminado que eu conheço, um ser humano sem igual, que sempre está com um sorriso no rosto e sempre paciente, disposto a encarar os desafios da melhor forma. Gratidão eterna.*

*Ao Professor Dr. **Alex Silva da Cruz** pelo privilégio que foi tê-lo como professor, pelo carinho, respeito e admiração que você conquistou sem nenhum esforço, por saber respeitar a singularidade de cada aluno e que me inspirou e inspira para que eu procure ser uma profissional cada vez mais qualificada, é visível o seu amor pela sua*

*profissão e pelo que você faz e com certeza isso faz toda a diferença na vida acadêmica dos seus alunos, você é um professor amado e admirado por cada aluno, marcou a minha graduação de uma forma extremamente positiva. Durante a graduação eu sempre dizia para os meus amigos “Quando eu crescer, eu vou ser igual o professor Alex” e espero inspirar outras pessoas, assim como você faz. A você minha imensa gratidão.*

*A professora **Lysa Bernardes Minasi**, pela paciência e atenção durante esse processo intenso de documentação e por estar sempre disposta a esclarecer minhas dúvidas, que é muito querida e estimada por mim. Obrigada.*

*A minha professora **Ms. Deize Evangelista Araújo**, que foi minha professora no ensino médio, e foi a mais importante incentivadora e responsável pela profissão que eu escolhi, que nunca saiu dos meus pensamentos e do meu coração eu carrego por você uma estima enorme, e será um privilégio e honra tê-la na composição da minha banca examinadora. Muito obrigada por fazer parte da escolha mais importante na minha vida profissional.*

*Ao **Corpo Docente da PUC Goiás** que com certeza sem cada um desses professores eu jamais concluiria esse curso e realizaria meu maior sonho. Em especial ao professor Ms. **Hélder Lúcio Rodrigues Silva**, coordenador do curso de Biologia – Licenciatura da PUC Goiás, que também estará na composição da minha banca examinadora e que é um professor muito querido por mim. Obrigada.*

*Ao **Núcleo de Pesquisas Replicon**, pelos aprendizados e amizades que ali fiz.*

*Experiência literária cura a ferida, sem prejudicar o privilégio de individualidade [...]. Ao ler a grande literatura, eu me torno mil homens e, mesmo assim, continuo a ser eu mesmo.*

**C. S. Lewis**

## RESUMO

---

As plantas com aplicação medicinal têm sido utilizadas como uma alternativa fitoterápica há muitos séculos. A falta de recursos e, as vezes de eficácia dos tratamentos alopáticos para diversas enfermidades, tem levado as pessoas a buscarem formas alternativas de tratamentos, o uso de fitoterápicos. *Brosimum gaudichaudii* (Mamacadela) é uma planta de uso medicinal amplamente encontrada no Centro-Oeste brasileiro, sendo as raízes a parte da planta mais utilizada para fitoterapia. Contudo o consumo de chás e infusões devem ser monitorados, objetivando alertar a população consumidora sobre os possíveis efeitos prejudiciais para saúde dos usuários, já que estes constantemente estão expostos às substâncias que podem apresentar um potencial mutagênico e/ou genotóxico, que podem ocasionar graves danos à saúde. Diante disso, a finalidade deste estudo foi investigar alterações nucleares em eritrócitos de aves durante o desenvolvimento embrionário e quantificar a atividade mutagênica e citotóxica de diferentes concentrações do extrato de *Brosimum gaudichaudii* por meio do Teste de Micronúcleo, aplicando a técnica de esfregaço sanguíneo. Para a avaliação dos efeitos citotóxicos e mutagênicos, os dados obtidos foram tabulados no *software Excel® da Microsoft* (EUA) e expressos como média e desvio padrão em porcentagem. O Teste do Micronúcleo em eritrócitos embrionários de *Gallus gallus domesticus* indicaram atividade mutagênica ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos controles não expostos. Diante disto, é necessário de ampliar os estudos para melhor compreensão da ação mutagênica, genotóxica e citotóxica que o extrato de *B. gaudichaudii* pode induzir no organismo, objetivando o estabelecimento de doses mais seguras para o consumo humano.

Palavras Chaves:

*Brosimum gaudichaudii*. Teste de Micronúcleo. Desenvolvimento embrionário. Mutagenicidade. Genotoxicidade.

## ABSTRACT

---

Plants with medicinal applications have been used as a herbal alternative for many centuries. The lack of resources and sometimes the effectiveness of allopathic treatments for various diseases has led people to seek alternative forms of treatment, the use of herbal medicines. *Brosimum gaudichaudii* (Mamacadela) is a medicinal plant widely found in the Brazilian Midwest, with the roots being the most used part of the plant for phytotherapy. However, the consumption of teas and infusions must be monitored, aiming to alert the consuming population about the possible harmful effects on the health of users, as they are constantly exposed to substances that may have a mutagenic and/or genotoxic potential, which can cause serious damage the health. Therefore, the purpose of this study was to investigate nuclear alterations in erythrocytes of birds during embryonic development and to quantify the mutagenic and cytotoxic activity of different concentrations of *Brosimum gaudichaudii* extract through the Micronucleus Test, applying the blood smear technique. For the evaluation of cytotoxic and mutagenic effects, the data obtained were tabulated in Excel® software from Microsoft (USA) and expressed as mean and standard deviation in percentage. The Micronucleus Test in embryonic erythrocytes of *Gallus gallus domesticus* indicated mutagenic activity ( $p < 0.05$ ) when compared to unexposed controls. Therefore, it is necessary to expand studies to better understand the mutagenic, genotoxic and cytotoxic action that the extract of *B. gaudichaudii* can induce in the body, aiming to establish safer doses for human consumption.

### **Keywords:**

*Brosimum gaudichaudii*. Micronucleus Test. Fetal develop. Mutagenicity. Genotoxicity.

---

---

## Sumário

<b>RESUMO</b> .....	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>13</b>
2.1 REGIÃO CENTRO OESTE BRASILEIRO .....	13
2.2 CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS DE <i>Brosimum gaudichaudii</i> (MAMACADELA) .....	15
2.3 USO DE BIOMARCADORES DE CITOTOXICIDADE, MUTAGENICIDADE E GENOTOXICIDADE .....	17
2.3.1 TESTE DO MICRONÚCLEO (MN).....	18
2.3.2 O USO DE OVOS DE AVES COMO BIOINDICADORES .....	21
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1 ASPÉCTOS ÉTICOS .....	24
4.2 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS.....	24
4.3 TESTE DO MICRONÚCLEO E DAS ANOMALIAS NUCLEARES .....	26
4.3.1 TÉCNICA DE ESFREGAÇO DE SANGUE .....	27
4.3.2 COLORAÇÃO DO ESFREGAÇO DE SANGUE .....	28
4.3.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS .....	29
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>39</b>

# 1 INTRODUÇÃO

---

De acordo com (MORAIS; et al., 2017), as plantas com o uso medicinal têm sido utilizadas como uma alternativa fitoterápica há muitos séculos. Com o passar dos tempos a população foi pesquisando e descobrindo maneiras de combater algumas enfermidades que acometiam a sociedade através dessa prática. Com a troca de conhecimentos, descobertas, experiências e registros do que se encontrava ao passar dos séculos, foi possível construir um acervo no que se refere a plantas medicinais.

A realidade é que muitas doenças ocorrem devido a algumas condições como por exemplo: falta de recursos financeiros, falta de alternativas, a falta de segurança e eficácia dos tratamentos para enfermidades, e isso muitas vezes tem levado as pessoas a buscarem outras formas terapêuticas, visando os fitoterápicos como um desses métodos alternativos, devido a possibilidade da presença de substâncias com poder de cura, ou preventivas nos fitoconstituintes (SOUSA, 2017)

Em 2006, o governo brasileiro aprovou a “Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS)” através da Portaria nº 971 (03/05/2006) incluindo a fitoterapia, homeopatia, medicina tradicional chinesa e crenoterapia (termalismo) como práticas que devem ser oferecidas pelo sistema público de saúde no Brasil determinando, ainda, diretrizes para que estas práticas sejam estabelecidas (BRASIL, 2006; SÓLON; GARDINI BRANDÃO; MÁXIMO SIQUEIRA, 2009)

As frutas nativas também têm sido muito utilizadas para o consumo *in natura* ou para a produção culinária de variados pratos. Dentre eles podemos destacar doces, licores e sucos, aumentando o poder aquisitivo de famílias que geram suas rendas através do ecoturismo regional, prática que vem obtendo sucesso na região Centro-Oeste do Brasil. A região Centro Oeste ocupa o segundo lugar como a maior do Brasil em amplificação territorial, e é constituída

pelos Estados de Goiás (GO), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS) e o Distrito Federal (DF) (VIEIRA; et al., 2006)

De acordo com (AGOSTINI COSTA et al., 2016), *Brosimum gaudichaudii* é uma planta de uso medicinal amplamente encontrada no Centro-Oeste brasileiro. O *Brosimum gaudichaudii* é uma planta conhecida por variadas denominações diferentes, que podem variar de uma região para outra. Nas regiões Norte e Nordeste é conhecida por Inhame, na região Centro-Oeste por Mamacadela ou Mamica-de-cadela (SOUSA, 2017)

De acordo com (MARREIRO; AMORIN;; TEIXEIRA;, 2011), apresentando de uma forma mais popular, os chás são preparações caseiras, utilizando partes das plantas, como folhas, flores, caules, raízes, cascas e outros, juntamente com água em ebulição. É uma bebida muito consumida em várias regiões. Algumas preparações apresentam propriedades cientificamente comprovadas, sendo consumidos com esse propósito; enquanto outras preparações, por suas características *a priori* sensoriais, são apreciadas pelas sensações causadas aos consumidores e, dessa forma, têm sido incorporadas aos seus hábitos alimentares e sociais.

Contudo, o consumo de chás, infusões ou soluções aquosas deve ser monitorado, objetivando alertar a população consumidora sobre os possíveis efeitos adversos para saúde dos organismos, já que estas pessoas constantemente estão expostas às substâncias que podem apresentar um potencial mutagênico, citotóxico e/ou genotóxico, que podem causar graves danos ao usuário que conseqüentemente, em resposta ao seu uso descontrolado, pode ter a sua saúde afetada (SOUSA, 2017). Diante disso, a finalidade deste estudo foi de investigar, por meio do Teste do Micronúcleo, a frequência de alterações nucleares em eritrócitos de aves durante o desenvolvimento embrionário expostas às diferentes concentrações do extrato da raiz de *Brosimum gaudichaudii*.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

---

### 2.1 Região Centro Oeste Brasileiro

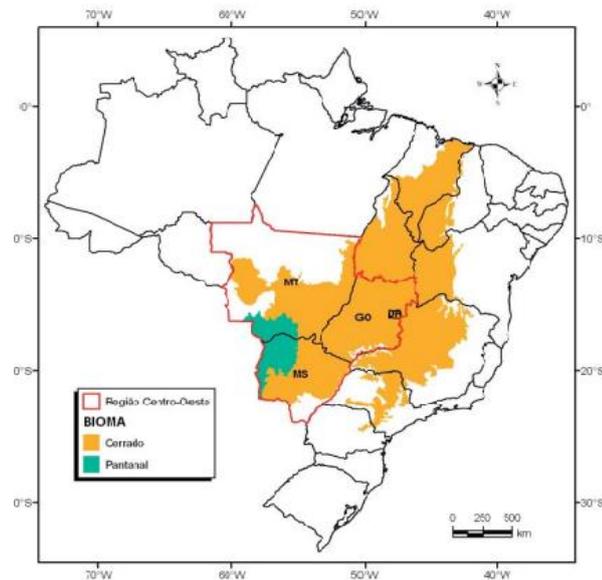
Na década de 1970, teve início o processo de ocupação da região Centro-oeste do Brasil que, originalmente, apresentava grande parte coberta pelo bioma cerrado. Com a expansão da atividade agrícola e pecuária, houve uma redução significativa da vegetação nativa, permanecendo apenas 38,4% até o ano de 2010. Em decorrência dessas condições favoráveis para a expansão da agricultura na região do cerrado, foram registrados crescentes níveis de redução da vegetação natural do bioma (TISOTT; SCHMIDT, 2021)

De acordo com o DAMIANI e colaboradores (2017), a Região Centro-oeste apresenta o maior fluxo migratório do Brasil. Cerca de 34,1% dos habitantes da região nasceram em outras áreas do país, com destaque para o estado de Mato Grosso e para o Distrito Federal. O aumento do volume de investimentos em infraestrutura e a expansão da fronteira agrícola nessa região possibilitou o fortalecimento e ampliou ainda mais o fluxo migratório. O avanço da economia e do agronegócio do Centro-oeste teve impacto positivo nos indicadores sociais do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH). Entre 1991 e 2010, os quatro Estados da região registraram crescimento médio de 49% no IDH e avançaram no ranking nacional.

O Centro-oeste brasileiro é hoje uma das maiores áreas de produção agrícola do país, com cultivos extensos de soja, algodão e cana-de-açúcar, além de ser um grande pólo de pecuária de corte, criações de aves e suínos, exploração de madeira para carvão e lenha, e grandes plantações de eucalipto (AGOSTINI COSTA et al., 2016).

A Região Centro-oeste faz fronteira a noroeste com os estados de Rondônia e Amazonas; ao norte com o estado do Pará; a nordeste com Tocantins e Bahia; a leste com Minas Gerais; a sudeste e sul com São Paulo e Paraná; e a sudoeste e oeste limita-se com o Paraguai e a Bolívia (AGOSTINI COSTA et al., 2016; VIEIRA; et al., 2006). A região abrange 3 biomas: o Cerrado, o Pantanal e parte da Floresta Amazônica (figura 1). Da área total dos biomas

cerrado e pantanal, predominantes na região Centro-oeste, apenas 16,8% foram consideradas áreas de cerrado não antropizado, através do uso de imagens de satélite.



**Figura 1.** Ocorrência dos biomas Cerrado e Pantanal nos estados do Brasil; destacando a região Centro-Oeste. Fonte: Sérgio Eustáquio de Noronha. Fonte: Mapa dos Biomas do Brasil - Primeira Aproximação – escala 1:5.000.000, IBGE, 2004.

Os biomas brasileiros constituem importantes centros de biodiversidade pela combinação de altos níveis de riqueza de espécies de animais e plantas, como os predominantemente florestais: Amazônia e Mata Atlântica; alagados, como o caso do Pantanal; e o cerrado, no qual possui cerca de 12.356 espécies de plantas (ASTUTI; ARSO; WIGATI, 2020).

O Bioma Cerrado ocorre predominantemente no Planalto Central do Brasil e ocupa cerca de 23% do território nacional (206 milhões de hectares), compondo o segundo maior bioma do País. Apresenta uma flora que é considerada a mais rica dentre as savanas do mundo, estimando-se um número entre 4 mil e 10 mil espécies de plantas vasculares. (AGOSTINI COSTA et al., 2016; VIEIRA; et al., 2006).

## 2.2 Características botânicas de *Brosimum gaudichaudii* (Mamacadela):

*Brosimum gaudichaudii* pertence à família Moraceae, espécie *Brosimum gaudichaudii* Trécul e sinonímia: *Brosimum glaucifolium* Ducke. Dentro de nossa cultura possui alguns nomes populares, como: algodãozinho, amoreira-do-mato, apê, apê-do-sertão, boilé, bureré, chiclete-do-cerrado, conduro, conduru, fruta-de-cera, inhará, inchar, mamacadela, mamica-de-cachorra, mamica-de-cadela. Mamacadela é o nome mais utilizado e está associado à disposição dos frutos nos ramos, que lembram a disposição dos mamilos de uma canídea, como podemos observar na figura 2 (E) (AGOSTINI COSTA et al., 2016)



**Figura 2.** Detalhes de planta de *B. gaudichaudii* A) formato da raiz observado em planta jovem; B) xilopódio em planta adulta; C) tronco; D) detalhe das folhas; E) inflorescências. Fotos: Dijalma Barbosa da Silva (A, C, D e E) e Dario Palhares (B).

A família Moraceae, conforme apresentado, compreende aproximadamente 50 gêneros e 1.500 espécies, com predominância nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, é representada por 27 gêneros e abrange cerca de 250 espécies, integrando árvores, lianas, arbustos e ervas (SOUSA, 2017).

A população tem o hábito de utilizar essa espécie medicinalmente em forma de chá, sendo suas raízes bastante comercializadas por raizeiros. O chá das raízes tem sido usado para dores de estômago, problemas intestinais e no tratamento de vitiligo. A planta também tem importância alimentícia, onde os frutos são consumidos *in natura* ou na forma de doces e sorvetes. Os indígenas

brasileiros utilizavam o fruto na forma de polpa macerada à farinha de mandioca, formando uma pasta densa.

A Tabela 1 representa de forma resumida as atividades biológicas de acordo com o tipo de extração dos fitoconstituíntes das raízes da Mamacadela (AGOSTINI COSTA et al., 2016).

**Tabela 1:** Tipos de extratos das raízes de *B. gaudichaudii* e suas respectivas atividades biológicas.

Parte	Tipos de Extratos	Atividades Biológicas	Referências
Raiz	Aquoso	Analgésica, anti-inflamatória	CARVALHO, 1996
	Etanólico	Analgésica, anti-inflamatória, hipoglicemiante, anticancerígena	UEDA <i>et al.</i> (2001); NAKAMURA <i>et al.</i> 2002
		Atividade inibitória tumoral em ensaio de ativação antigênica com vírus Epstein-Barr	NAKAMURA <i>et al.</i> 2002
	Metanólico	Leshmanicida	CORTEZ, 2004
		Antimicrobiana	SAMPAIO et al. 2009

Fonte: (SOUSA, 2017).

As raízes de *B. gaudichaudii* Trécul. é a parte da planta mais utilizada pois nela contém 12 compostos secundários muito extraídos, sendo os principais as furanocumarinas lineares: o *psoraleno* e o *bergapteno*. Essas furanocumarinas, principalmente, possuem capacidade fotossensibilizante, responsáveis pelo

efeito da repigmentação da pele, fato que explica o seu emprego na medicina popular no combate ao vitiligo (SILVA, 2020).

### **2.3 Uso de Biomarcadores de Citotoxicidade, Mutagenicidade e Genotoxicidade.**

Para estimar o grau de impacto que determinadas substâncias podem causar em um organismo, são realizados ensaios laboratoriais utilizando biomarcadores, cujo objetivo é a observação dos efeitos produzidos em um organismo após a sua exposição e, posteriormente, a observação dos efeitos causados pelo mesmo (FILHO, 2015).

Os biomarcadores podem ser definidos como qualquer mudança de resposta a uma substância ou elemento no ambiente que seja detectável em alterações moleculares, fisiológicas e comportamentais nos organismos (CASTRO, 2017).

São classificados em três tipos principais: biomarcadores de exposição, que correspondem à expressão de um agente ambiental ou de seus metabólitos no meio interno dos indivíduos; biomarcadores de suscetibilidade, que indicam indivíduos mais ou menos propensos a desenvolver câncer quando expostos a substâncias cancerígenas; e biomarcadores de efeito precoce ou de resposta, que indicam alterações presentes em tumores, são tardios e permitem avaliar o prognóstico da doença (MENDES, 2020).

A falta de informações e o uso de plantas medicinais pela população, principalmente na forma de infusões e chás podem provocar mais efeitos nocivos do que benéficos, pois as substâncias químicas presentes nas espécies vegetais podem ser tóxicas, mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas quando ingeridas sem restrições e indiscriminadamente. Portanto, são necessários estudos que avaliem o potencial mutagênico, citotóxico e genotóxico bem como os eventuais danos adversos causados ao organismo humano, principalmente os relacionados com o aumento da taxa de mutações do material genético em níveis basais (VERRI et al., 2017).

O termo genotoxicidade refere-se à capacidade de um agente químico, físico ou biológico em provocar danos ao DNA, passíveis de correção, induzindo alterações na estrutura do DNA, como quebra de fita simples e quebra de fita dupla, que pode levar a efeitos nocivos. Já o termo mutagenicidade é caracterizado pela indução de mutações no DNA, caracterizando uma alteração permanente no material genético dos organismos (MENDES, 2020). Pesquisas que se baseiam na avaliação de citotoxicidade estimam a frequência de divisão celular, identificando a presença de substâncias tóxicas no ambiente celular, interferindo em sua integridade, comprometendo o crescimento, desenvolvimento, reparação e cicatrização tecidual (GUEDES, 2019).

Diversos testes citogenéticos são utilizados para avaliar os efeitos mutagênicos, citotóxicos e/ou genotóxicos no organismo. Para tanto, têm feito o uso de biomarcadores de exposição, que podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de um grupo a um agente tóxico (PEDROSO, 2018).

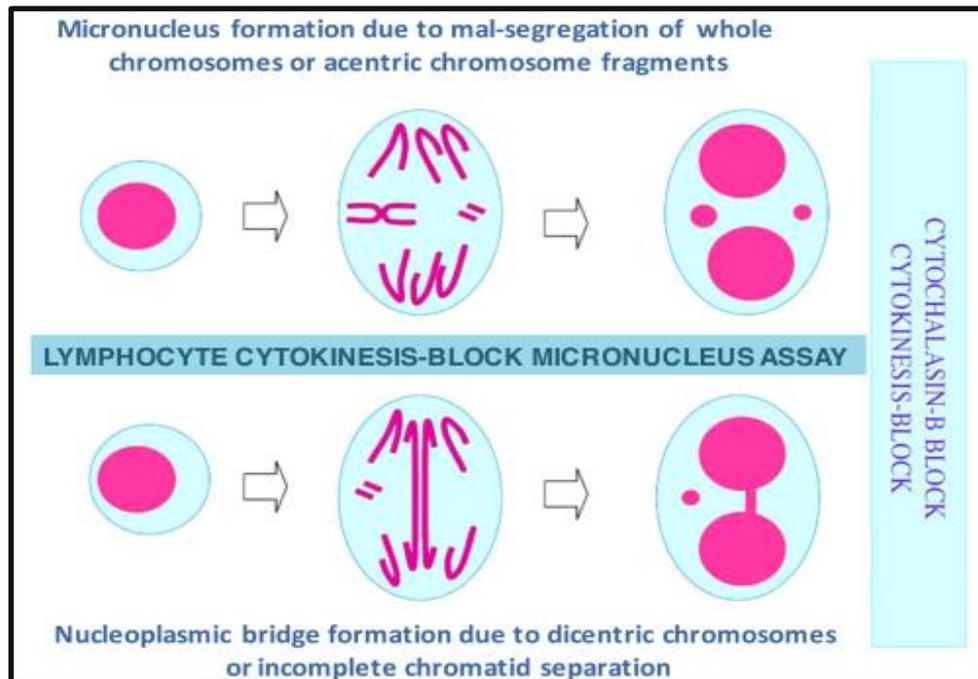
Com o aumento do interesse de diversas áreas, a ecologia e a genética se uniram e desenvolveram os primeiros testes hoje empregados em genotoxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade, tais como o Ensaio Cometa, o Teste do Micronúcleo, *Allium cepa* Test, Tradescantia Test (TradMN) (FILHO, 2015).

### **2.3.1 Teste do Micronúcleo (MN).**

O micronúcleo é uma estrutura separada do núcleo principal de uma célula, resultante da não inclusão do cromossomo ou parte dele no núcleo principal da célula durante a mitose. Essa estrutura é um subproduto de aberrações cromossômicas instáveis, ou caracterizadas pela perda de cromossomos inteiros no processo de divisão celular. Sua formação completa-se quando o envoltório nuclear é restituído ao redor dos cromossomos das células descendentes (MENDES; JÚNIOR, 2018).

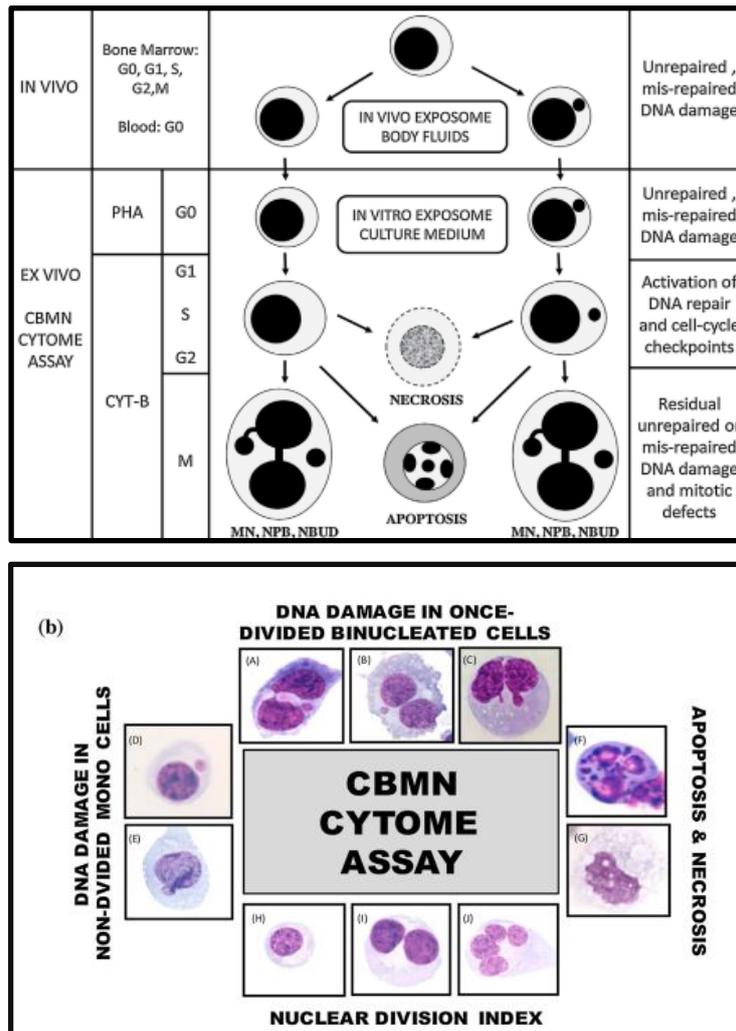
Para que uma estrutura cromatínica seja considerada como MN, deve apresentar diâmetro inferior a um terço do núcleo, estar separada deste e possuir coloração semelhante ao mesmo (COSTA et al., 2015).

Há, ainda, outros meios pelos quais os MNs são formados. Uma quebra na fita de DNA pode levar a formação de um fragmento de cromossomo acêntrico, ou danos às proteínas do cinetócoro ou do fuso podem levar a um atraso cromossômico durante a anáfase. A exclusão do fragmento acêntrico e / ou do cromossomo inteiro dos núcleos filhos durante a anáfase / telófase também resulta na formação do MN (figura 3) (FENECH et al., 2016).



**Figura 3.** Diagrama esquemático descrevendo a origem dos micronúcleos e pontes nucleoplásmicas e sua detecção utilizando o ensaio de micronúcleos. A figura foi adaptada de Fenech (2016).

O teste do micronúcleo é um dos métodos mais utilizados para medir danos no DNA. O ensaio avalia não apenas danos cromossômicos como micronúcleos, que simbolizam as quebras dos cromossomos; pontes nucleoplásmicas (NPB), que são rearranjos cromossômicos; e botões nucleares (NBUD), que retratam a amplificação do gene; mas também outros eventos celulares como: apoptose e necrose (figura 4) (PERUMALLA VENKATA et al., 2017).



**Figura 4.** (a) Diagrama esquemático mostrando a expressão de MNs, pontes nucleoplásmicas e brotos nucleares no teste do Micronúcleo em relação à exposição a fatores genotóxicos, danos e reparos do DNA nos vários estágios do ciclo celular. (b) Fotomicrografias dos vários tipos de células e biomarcadores de danos no DNA, citocinese e morte celular medidos no Teste do Micronúcleo. (A) célula binucleada com ponte nucleoplásmica e micronúcleo; (B) célula binucleada com MN; (C) célula binucleada com brotos nucleares; (D) célula mononucleada com MN, (E) célula mononucleada com um broto; (F) célula apoptótica; (G) célula necrótica; (H) célula mononucleada; (I) célula binucleada; (J) célula multinucleada. Esta figura foi adaptada de Fenech (2016).

A elevada frequência de micronúcleos tem relação com o dano cromossômico causado pela exposição aos agentes mutagênicos, defeito no processo mitótico ou falha no reparo do DNA (MENDES, SILVANA DE CASTRO; SOUZA; JÚNIOR, 2018).

O primeiro cientista a realizar o teste de micronúcleos foi *Schimdt* em 1975, utilizando células da medula óssea de camundongos. Posteriormente foi adaptado por *Hoofman e Raat*, em 1982. Desde então, o Teste do Micronúcleo passou a ser frequentemente utilizado nos estágios iniciais do desenvolvimento

de novos medicamentos e cosméticos como uma importante ferramenta na predição da mutagenicidade (ALMEIDA;, 2015).

Em comparação com outros ensaios citogenéticos, a quantificação de micronúcleos confere várias vantagens, incluindo velocidade e facilidade de análise, sem necessidade de células metafásicas e identificação confiável de células que completaram apenas uma divisão nuclear. Isso evita efeitos confusos causados por diferenças na cinética da divisão celular, porque a expressão dos micronúcleos é dependente da conclusão da divisão nuclear (PERUMALLA VENKATA et al., 2017).

Atualmente, considera-se que o Teste do Micronúcleo possa ser aplicado sozinho, sem estar associado com os outros ensaios tradicionais de genotoxicidade (LORGE et al., 2007). O teste de micronúcleo tem sido utilizado como uma ferramenta para detectar efeitos genotóxicos de contaminantes ambientais em diferentes animais, incluindo aves. Alguns estudos avaliando a mutagenicidade em aves já foram feitos, porém ainda são poucos (STOCKER, 2019).

### **2.3.2 O Uso de Ovos de Aves como Bioindicadores.**

As diretrizes internacionais recomendam uma bateria de testes para avaliar o potencial genotóxico de uma substância, cujo objetivo é detectar os principais danos ao DNA e a capacidade da substância em proporcionar alterações no material genético - efeito mutagênico (SOUSA et al., 2018).

A bioindicação permite a utilização das respostas de um sistema biológico qualquer a um agente estressor, como forma de se analisar sua ação e planejar formas de controle e monitoramento da recuperação dos parâmetros normais. Os Bioindicadores podem ser espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas (STOCKER, 2019).

As aves têm desempenhado um importante papel como bioindicadores ambientais, uma vez que diferentes espécies podem ser úteis devido à sua capacidade de bioacumulação (SOUTO, 2018). O acúmulo de contaminantes pode prejudicar o processo reprodutivo e a sobrevivência das espécies, além de causar efeitos metabólicos (STOCKER, 2019).

Dentre os diferentes biomarcadores utilizados para a avaliação da saúde das aves, o teste de micronúcleo (MN) é considerado um dos mais simples, rápido, menos invasivo e preciso para a detecção de genotoxicidade causada por contaminantes (OLIVEIRA, 2020).

Alguns trabalhos realizados na América do Norte apresentam valores da frequência de micronúcleo em sangue periférico em vários grupos de animais, incluindo aves, que podem ser utilizados em investigações futuras para detectar poluentes genotóxicos ambientais. No Brasil, Baesse investigou a mutagenicidade em espécies que utilizam ambientes florestais e seus arredores, e verificou se a frequência de micronúcleos variava entre as espécies. Esse autor salienta que esta técnica é sensível para avaliar o impacto da poluição em aves, além de ser um método não invasivo, que não implica na morte do animal (STOCKER, 2019).

A exposição de organismos não-alvos a compostos químicos é bastante comum e pode ser constatada por inúmeros casos de intoxicação em amostras significativas da população silvestre, incluindo aves. Uma maneira de se avaliar a exposição a diferentes contaminantes é pela avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade, que é capaz de auxiliar no entendimento dos efeitos de atividades antrópicas sobre a saúde das aves. As consequências das alterações eritrocitárias nas aves, podem incluir, por exemplo, o impacto direto na sobrevivência dos indivíduos. Assim, é possível considerar a presença de MN na célula como um biomarcador de danos ao DNA (OLIVEIRA, 2020).

### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar atividade mutagênica e citotóxica do extrato aquoso de *Brosimum gaudichaudii* em eritrócitos de *Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758) durante o desenvolvimento embrionário.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar e quantificar a atividade mutagênica e citotóxica em diferentes concentrações do extrato aquoso de *Brosimum gaudichaudii*;
- Analisar os efeitos mutagênicos de *Brosimum gaudichaudii* através do Teste do Micronúcleo em eritrócitos de ovos embrionados de aves e compará-los com eritrócitos de embriões não expostos;
- Analisar os efeitos citotóxicos de *Brosimum gaudichaudii* através da análise de anomalias nucleares em eritrócitos de ovos embrionados de aves e compará-los com eritrócitos de embriões não expostos;
- Contribuir para o conhecimento dos possíveis efeitos adversos à saúde causados pelo uso incorreto de chás e infusões obtidas a partir dos extratos de *Brosimum gaudichaudii*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1 Aspectos Éticos

O estudo faz parte do projeto de pesquisa "Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico dos extratos padronizados de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum gaudichaudii* (inharé)", que teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (CEUA/PUC GOIÁS), com o número de referência 6244160316.

### 4.2 Coleta do material botânico e preparação dos extratos vegetais

O material botânico usado no estudo foi adquirido no comércio local (Goiânia-GO). Após a aquisição, o material foi enviado ao Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás e, posteriormente, foi preparada uma solução mãe com 300g do pó da raiz de *Brosimum gaudichaudii* diluídos em 1 litro de água filtrada. Após o preparo, a solução foi identificada e acondicionada na geladeira, para que o produto fosse preservado.

Logo depois, a solução mãe foi fracionada em *tubos falcons* de 50mL para a obtenção das diferentes concentrações utilizadas neste estudo. A primeira concentração foi de 1g/L, a segunda concentração foi de 5g/L e a última concentração foi de 10g/L. Para a exposição foram coletados 12 ovos galados oriundos da chácara Quinta dos Ipês localizada na cidade de Piracanjuba, Goiás.

Os ovos foram adequadamente higienizados e após a ovoscopia inicial foram adicionados à incubadora a 37°C, umidade constante e com rotação a cada 2h de incubação (figura 5A).

No 4º dia os ovos foram retirados da incubadora e analisados no ovoscópio visando confirmar que os ovos estavam fertilizados (figura 5B). Após a confirmação de desenvolvimento embrionário, os ovos foram devolvidos à incubadora.

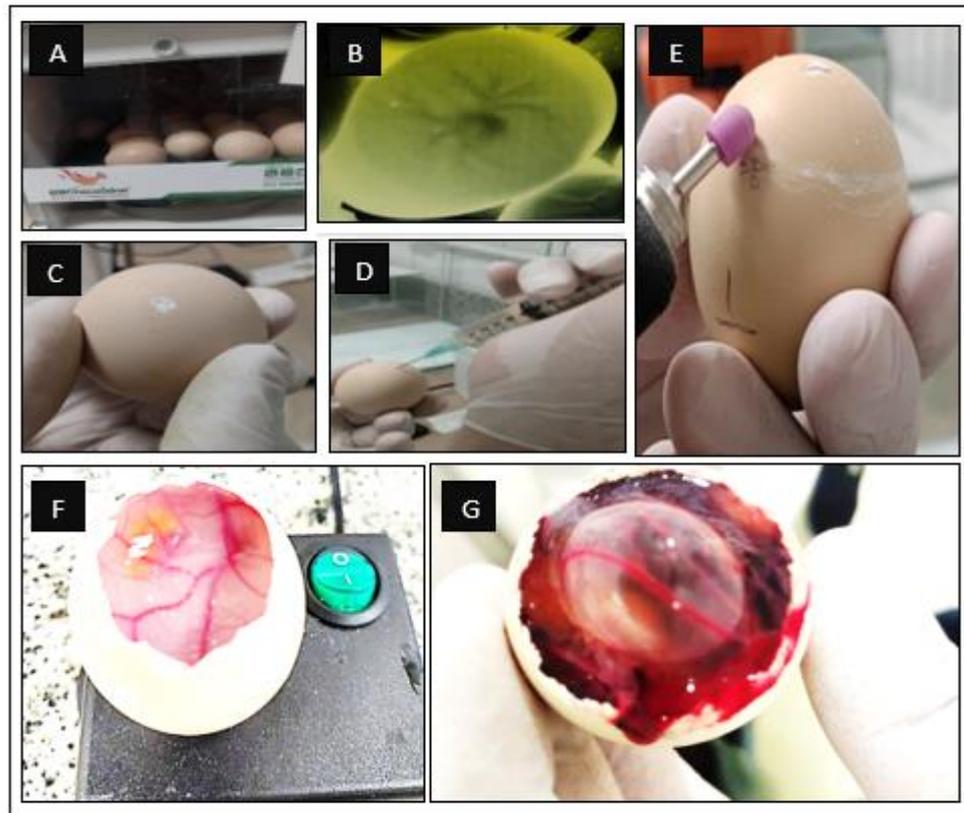
No 11º dia os ovos foram retirados da incubadora e foi realizada uma pequena escarificação na casca, na área superior da câmara de ar (figura 5C)

com uma mini cerra, e com o auxílio de seringas descartáveis, foram adicionadas as diferentes soluções dos extratos vegetais no interior dos ovos em desenvolvimento (figura 5D).

Para cada concentração do extrato (1g/L, 5g/L e 10g/L) foram utilizados ovos em triplicatas para testar a exposição dos embriões. Também foram selecionados ovos em triplicatas para o grupo controle, não expostos aos extratos. Foram adicionados 5 mL de cada concentração nos ovos e no controle negativo foi adicionado somente água filtrada.

Após a adição dos extratos, os ovos foram adequadamente lacrados com fita micropore, na parte da escarificação para que não houvesse contaminação dos embriões e, posteriormente os ovos foram devolvidos para a incubadora novamente por 48 horas.

Após as 48 horas e exposição, os ovos foram retirados da incubadora e escarificados ao redor da câmara de ar (figura 5E). Após a escarificação ao redor da câmara de ar, com o auxílio de 1 bisturi e uma pinça histológica, os ovos foram abertos (figura 5F). Com o mesmo bisturi, foi realizado um corte em uma veia da membrana corioalantóide para a retirada do sangue, com o auxílio de seringas heparinizadas (figura 5G). O sangue foi acondicionado em tubos tipo *Eppendorfs* de 1mL e posteriormente, foi utilizado para a produção das lâminas, através da técnica de esfregaço, coradas com o kit panóptico e disponibilizadas para a análise microscópica.



**Figura 5.** Passo a passo da metodologia. Em A) ovos na incubadora; em B) confirmação de desenvolvimento embrionário com o auxílio do ovoscópio; em C) pequena escarificação na parte superior da câmara de ar; em D) inserção dos extratos nos ovos a serem expostos; em E) escarificação realizada ao redor da câmara de ar do ovo; em F) abertura da câmara de ar para observação dos vasos sanguíneos formados durante o desenvolvimento embrionário; em G) representação do corte realizado no vaso sanguíneo da membrana corioalantóide.

Fonte: A autora, 2021.

### 4.3 Teste do Micronúcleo e das Anomalias Nucleares.

O Teste do Micronúcleo e das anomalias nucleares foram realizados em esfregaço de sangue obtido a partir dos vasos sanguíneos da membrana corioalantóide de ovos embrionados de *Gallus gallus domesticus*. O esfregaço de sangue também é conhecido como distensão sanguínea ou ainda extensão sanguínea, é um teste realizado em hematologia para a contagem e a identificação das células do sangue. O teste consiste na extensão de uma fina camada de sangue sobre uma lâmina de microscopia que, após corada, poderá ser analisada em microscópio.

O esfregaço sanguíneo geralmente tem como objetivo analisar a morfologia das células do sangue, sendo capaz de fornecer informações sobre

a estimativa do número e morfologia dos glóbulos vermelho, leucócitos e plaquetas, além de investigar alterações hematológicas, distúrbios encontrados no sangue e eventualmente parasitas.

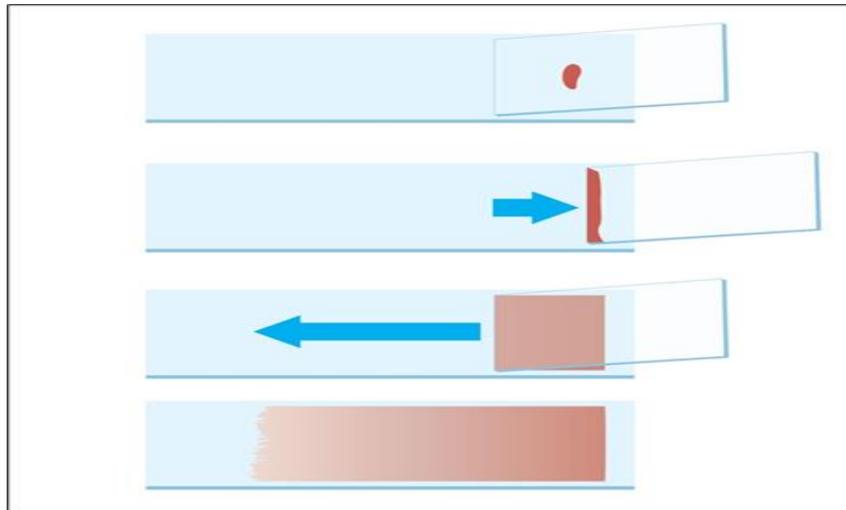
Apesar dos avanços em hematologia, na área de automação e uso de metodologias moleculares, o esfregaço sanguíneo aparentemente simples ainda é indispensável. O primeiro passo para se obter resultados confiáveis é a confecção de um bom esfregaço de sangue e, para tanto, é necessário empregar a técnica correta (ROSS, 2016)

#### **4.3.1 Técnica de esfregaço de sangue**

O método de preparação (Figura 6) para demonstrar melhor os tipos celulares do sangue periférico é o esfregaço sanguíneo. Uma gota de sangue é colocada diretamente sobre uma lâmina de vidro e espalhada em uma camada fina pela sua superfície. Isso é obtido espalhando-se a gota de sangue com a borda de uma lâmina histológica ao longo de outra lâmina, com o objetivo de produzir uma monocamada de células (PIRES et al., 2014), conforme os passos a seguir:

1. Apoiar a lâmina de microscopia, já com a identificação do caso, sobre uma superfície limpa. Certificar-se de que a lâmina tem boa qualidade e não está suja ou possui vestígios de gordura, o que pode prejudicar o teste.
2. Colocar uma pequena gota de sangue próxima a uma das extremidades da lâmina.
3. Com o auxílio de outra lâmina, colocar a gota de sangue em contato com sua borda. Para isso a lâmina extensora deve fazer um movimento para trás tocando a gota com o dorso em um ângulo 45°.
4. O sangue da gota irá se espalhar pela borda da lâmina extensora por capilaridade.
5. A lâmina deve então deslizar suave e uniformemente sobre a outra, em direção oposta à extremidade em que está a gota de sangue, permitindo a extensão sanguínea.

6. Depois de completamente estendido, o sangue, após secagem, forma uma película sobre a lâmina de vidro.



**Figura 6.** Passo a passo da técnica de esfregaço do sangue segundo PIRES e colaboradores (2014).

Observações Importantes:

[1] É necessário esfregar uma lâmina sobre a outra rapidamente, antes que o sangue seque ou coagule. Uma pressão excessiva ou qualquer movimento de parada durante esse processo pode comprometer o esfregaço.

[2] É importante lembrar também que a espessura da película é determinada, em grande parte, pelo ângulo formado entre as lâminas no momento da extensão da gota de sangue. Ângulos maiores que  $45^\circ$ , por exemplo, produzem extensões espessas e curtas, dificultando posteriormente a visualização das células.

#### **4.3.2 Coloração do Esfregaço de Sangue**

Para a técnica de esfregaço sanguíneo pode ser utilizada diversos tipos de corantes para corar as células sanguíneas. Existem muitas variações como a coloração de Leishman, Giemsa, Wright ou May-Grünwald. Todas são modificações da coloração a base de corantes Romanowsky. Esta denominação confere ao médico russo Dmitri Leonidovich Romanowsky os

créditos pelo desenvolvimento do método, em 1891. A mistura de corantes inclui um corante básico e um corante ácido, consistindo basicamente em azul de metileno e eosina (ROSS, 2016).

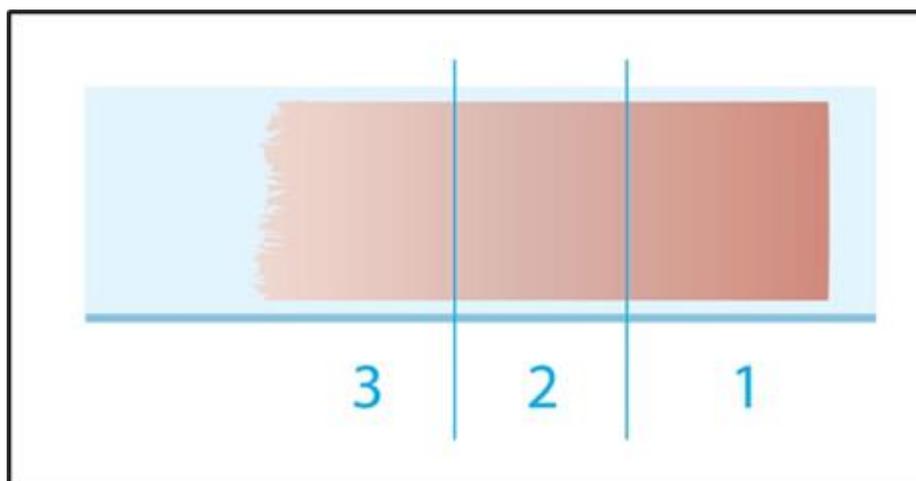
A afinidade das estruturas celulares por corantes específicos ou por combinações de corantes dessa mistura proporciona uma visualização diferenciada das células sanguíneas.

Após a fixação das lâminas em álcool etílico a 70% por 10 minutos, as lâminas contendo os esfregaços sanguíneos foram coradas pelo método Panótico Rápido que se caracteriza por extensões de sangue periférico submetidas a ação de um fixador (Solução 1) e duas soluções corantes (Soluções 2 e 3), que são imersas por até 10 segundos em cada. Ao fim da última imersão, após o enxágue em água e secas à temperatura ambiente, as lâminas encontram-se prontas para análise microscópica.

#### **4.3.3 Análise Microscópica dos Esfregaços Sanguíneos:**

A análise microscópica ocorreu em um equipamento de luz branca Primo Star HAL/LED (Carl Zeiss® Alemanha), sob objetivas de 40X e 100X. Para a análise foram consideradas as seguintes áreas das lâminas (Figura 7):

1. Cabeça da lâmina: região imediatamente após o local em que estava a gota sanguínea. Nessa região, com frequência, há aumento do número de leucócitos (principalmente de linfócitos) e muita densidade celular.
2. Corpo da lâmina: região intermediária entre cabeça e cauda. É nessa região que os leucócitos, hemácias e plaquetas estão distribuídas de forma mais homogênea. É a área de escolha para a análise qualitativa e quantitativa da distensão sanguínea.
3. Cauda da lâmina: região final da distensão sanguínea. Nessa região, há o encontro de alguns esferócitos e elevação de monócitos e granulócitos, que podem apresentar alguma distorção morfológica.



**Figura 7.** Áreas dos esfregaços sanguíneos a serem considerados durante a análise microscópica segundo PIRES e colaboradores (2014).

Durante a análise foram consideradas 1000 eritrócitos de aves (*Gallus gallus domesticus*) para cada grupo (Controle Negativo, solução de 1g/L, solução de 5g/L e solução de 10g/L) totalizando 4000 células analisadas. Os eritrócitos em aves são células ovaladas, nucleadas e que contém em seu interior um citoplasma rico em hemoglobina. Foram observadas a presença de células micronucleadas (MN) e células com anomalias nucleares tais como, segmentadas, reniformes e lobuladas.

#### **4.4 Análise Estatística**

Para a avaliação dos efeitos citotóxicos e mutagênicos das diferentes concentrações do extrato de Mamacadela, os dados obtidos foram tabulados no pacote *Excel® Microsoft 2010* (EUA) e expressos como média e desvio padrão em porcentagem (frequência). Adicionalmente foi utilizado o teste não paramétrico de análise de variância (ANOVA) de *Kruskall-Wallis* para comparar a frequência entre os tratamentos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da exposição dos ovos galados às diferentes concentrações do extrato aquoso da *B. gaudichaudii* estão apresentados na tabela 2.

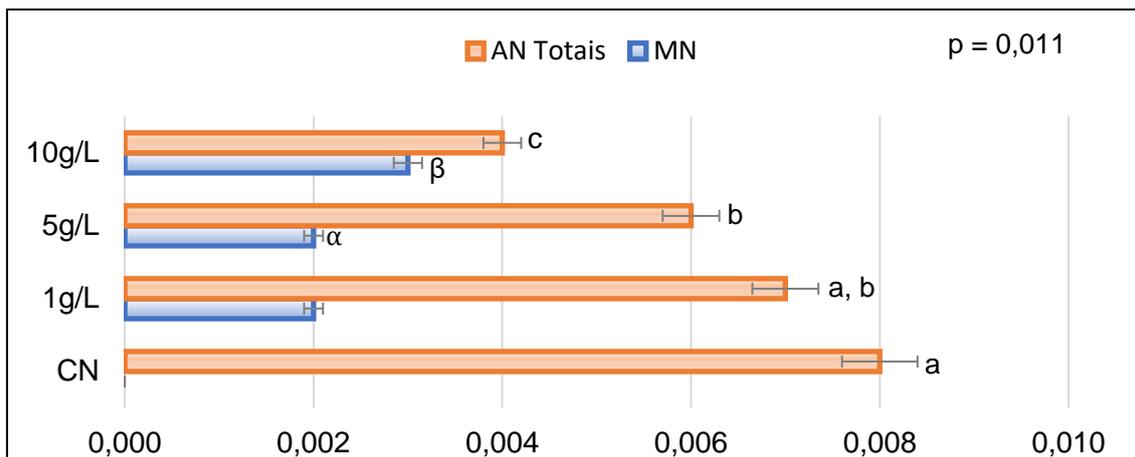
**Tabela 2.** Alterações observadas nos eritrócitos da membrana corioalantóide (MCA) de aves após 48h de exposição às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Brosimum gaudichaudii*.

Grupos	Nº. de células Normais	<i>f</i> MN	<i>f</i> BN	Anomalias Nucleares		
				<i>f</i> S	<i>f</i> L	<i>f</i> K
Controle Negativo	992	0	0	0,001	0,0003	0,004
1g/L	991	0,002	0	0,003	0,002	0,002
5g/L	992	0,002	0	0,001	0,003	0,002
10g/L	992	0,003	0,001	0	0,004	0

**Legenda:** *f*MN: frequência de células com micronúcleos; *f*BN: frequência de células binucleadas; *f*S: frequência de células com Núcleo Segmentado; *f*L: frequência de células com Núcleo Lobular; *f*K: frequência de células com Núcleo Reniforme. Fonte: A autora, 2021.

Foram analisadas, em microscopia óptica de luz branca, 1000 eritrócitos por cada tratamento (controle negativo, 1g/L, 5g/L e 10g/L) totalizando um total de 4000 células, dentre as quais foram destacadas as alterações observadas (micronúcleos, binucleações e anomalias nucleares – células com núcleo segmentado, lobular e com núcleo reniforme).

A figura 8 destaca as frequências das alterações totais observadas em ambos os grupos (controle e exposto). Observa-se um aumento significativo na frequência de micronúcleos no grupo exposto a concentração de 10g/L ( $p=0,011$ ) quando comparada com a frequência de micronúcleos observada no grupo controle negativo.



**Figura 8.** Alterações mutagênicas e citotóxicas encontradas nos Grupos Expostos e no Grupo Controle Negativo após a exposição às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Brosimum gaudichaudii*. Fonte: A autora, 2021.

Adicionalmente, verifica-se uma redução na citotoxicidade ao longo da exposição às diferentes concentrações do extrato de Mamacadela. No entanto, na menor concentração (1g/L) a frequência das anomalias nucleares não foi diferente da frequência observada no grupo controle. Porém, as frequências das anomalias nucleares foram significativamente menores nos grupos expostos às maiores concentrações (5g/L e 10g/L) quando comparadas com a frequência no grupo controle.

A figura 9 apresenta algumas das alterações observadas em eritrócitos de ovos embrionados de *Gallus gallus domesticus* expostos às diferentes concentrações do extrato de *B. gaudichaudii*.



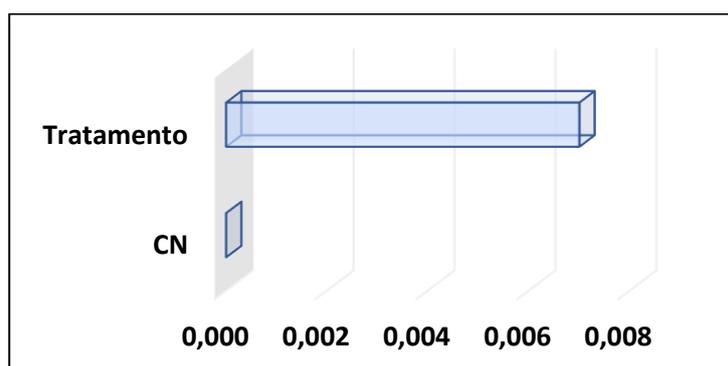
**Figura 9.** Eritrócitos de *Gallus gallus domesticus* expostos às diferentes concentrações do extrato aquoso de *B. gaudichaudii*. Em [A] eritrócitos normais. Em [B] eritrócito com micronúcleo (seta escura) e em [C] eritrócito com núcleo lobular (seta escura). Ampliação: 1000X. Fonte: A autora, 2021

O estudo realizado por (SILVA, 2020) mostra o perfil de toxicidade do extrato de *Brosimum gaudichaudii*. Nesse estudo os extratos tiveram efeitos subletais em embriões na fase larval de *zebrafish* (Paulistinha) a partir da

concentração 0,005 µg/mL. Por outro lado, o estudo de (SOUSA, 2017) diz que não há potencial mutagênico no extrato de *Brosimum gaudichaudii* em parâmetros de índices mitóticos em células meristemáticas da raiz de *Allium cepa*.

Estes dados da literatura mostram que ainda não há um consenso sobre os efeitos biológicos do extrato de *Brosimum gaudichaudii*, sendo importante a continuação de estudos nessa área, visando elucidar os impactos causados pelo uso, principalmente abusivo, dos produtos fitoterápicos.

Considerando os diferentes grupos analisados pode-se observar que o somatório das frequências de células com micronúcleos (ação mutagênica) encontradas no grupo exposto (tratamento) aos extratos vegetais foi significativamente superior ( $p=0,005$ ) quando comparado com o somatório das frequências de micronúcleos no grupo controle negativo (Figura 10).

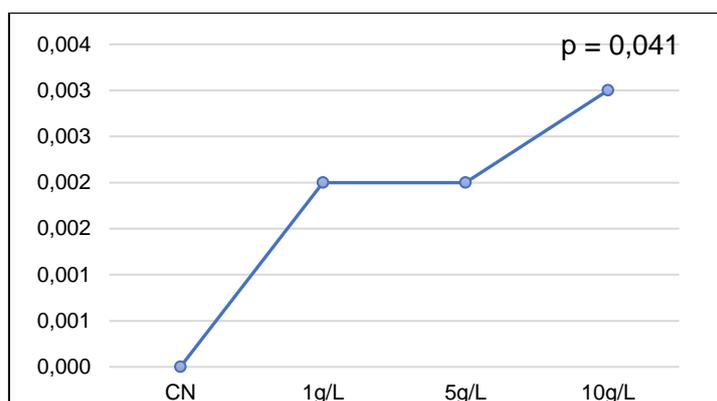


**Figura 10.** Alterações mutagênicas encontradas nos grupos caso e controle após exposição aos extratos de *Brosimum gaudichaudii*. **Legenda:** CN: Controle negativo. Fonte: A autora, 2021.

Conforme a literatura, os vegetais produzem substâncias que podem apresentar potencial tóxico, decorrente do seu mecanismo de defesa contra organismos parasitas e/ou predadores. Há relatos sobre indícios de efeitos deletérios (adversos) resultante da ação de extratos de plantas no sistema biológico. Esta observação exemplifica o poder tóxico das plantas medicinais, contrariando a crença popular que extratos naturais só possuem propriedades benéficas para seus usuários (LAPA *et al.*, 2004) (FIGUEIREDO, 2012).

Adicionalmente, na avaliação do potencial mutagênico utilizando o Teste do Micronúcleo no esfregaço de sangue da membrana corioalantóide (CAM) dos ovos de *Gallus gallus domesticus* (figura 11) verifica-se que um crescente

aumento na concentração dos extratos de *Brosimum gaudichaudii* (1g/L, 5g/L e 10g/L) promove aumento significativo ( $p=0,041$ ) na frequência de células micronucleadas quando comparada ao grupo controle negativo. Assim, reflete uma resposta celular (dose-resposta) diretamente proporcional frente a um aumento da concentração do agente mutagênico.

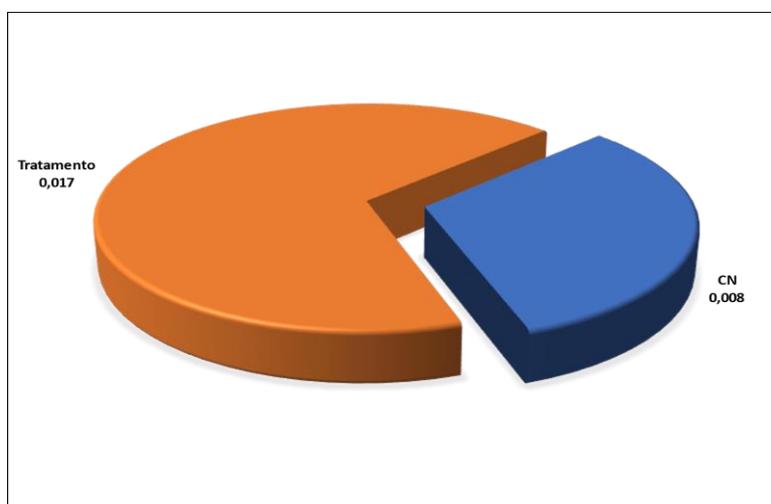


**Figura 11.** Efeito dose-resposta observado durante a avaliação mutagênica – Teste do Micronúcleo das diferentes concentrações do extrato de *Brosimum gaudichaudii* em esfregaço de sangue da membrana corioalantóide (CAM) dos ovos de *Gallus gallus domesticus*. Fonte: A autora, 2021.

Segundo (ARCAIN, 2020), as aves são organismos considerados sensíveis à exposição de químicos, por apresentarem baixos níveis de enzimas detoxificantes e hábitos alimentares específicos. A contaminação dos embriões de aves pode vir tanto diretamente, quando em contato com o ovo, como indiretamente, através de contaminação materna ou paterna. Os embriões de aves têm sido, há muito tempo, utilizados como modelos na embriologia por apresentarem semelhanças com embriões de mamíferos, pois também são animais amniotas.

As análises para os danos citotóxicos foram realizadas também por meio do Teste de Micronúcleo em esfregaços sanguíneos. Nesse caso, foi observado as anomalias nucleares, tais como: células binucleadas, células com núcleos segmentados, células com núcleos lobulares e células com núcleos reniformes. O somatório das anomalias nucleares nos grupos expostos (tratamento) foi de 0,017 enquanto no grupo controle negativo foi de 0,008. Assim pode concluir que houve um aumento significativo ( $p=0,015$ ) de 2 vezes na frequência de

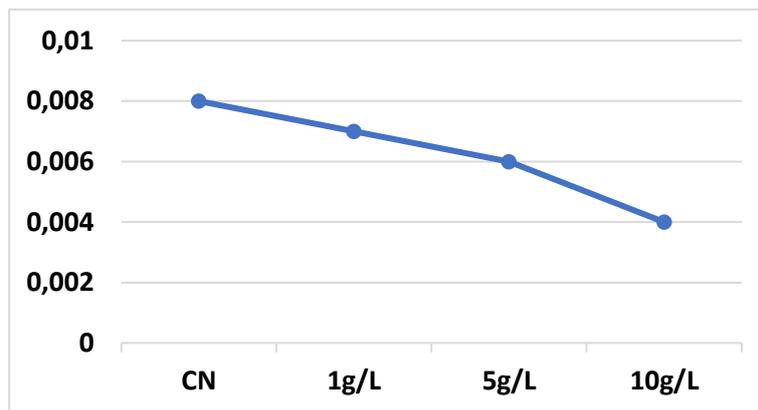
anomalias nucleares em eritrócitos dos vasos sanguíneos da CAM de ovos galados expostos às diferentes concentrações do extrato de *Brosimum gaudichaudii* (figura 13).



**Figura 13.** Representação gráfica das anomalias nucleares encontradas nos grupos expostos e controle negativo após exposição aos extratos de *Brosimum gaudichaudii* em eritrócitos do sangue dos vasos sanguíneos da CAM de ovos galados. **Legenda:** CN: Controle negativo. Fonte: A autora, 2021.

Segundo (SOUSA, 2017) a análise separadamente do índice mitótico de *Allium cepa* em células expostas ao extrato de *Brosimum gaudichaudii* permitiu diferenciar melhor os efeitos dos extratos no seu modelo. Assim verificou-se, ausência de efeito citotóxico significativo ( $p > 0,05$ ), porém, foi observado, que conforme o aumento da concentração de *Brosimum gaudichaudii*, maior é a inibição da divisão das células meristemáticas radiculares, sobretudo para uma determinada concentração (5g/L) foi estatisticamente significativo ( $p = 0,018$ ), quando comparado com o índice mitótico do grupo de raízes não expostas aos extratos vegetais. Porém para as demais concentrações não houve efeitos importantes.

Em nosso estudo, a avaliação do potencial citotóxico está apresentada na figura 14, também não evidencia significado estatístico ( $p = 0,065$ ) nas frequências das anomalias nucleares entre os grupos expostos. Estes dados estão de acordo com os dados também observados por (SOUSA, 2017).



**Figura 14.** Avaliação do potencial citotóxico em eritrócitos do sangue de vasos sanguíneos da CAM de ovos galados expostos às diferentes concentrações do extrato de *Brosimum gaudichaudii*. **Legenda:** CN: Controle negativo. AN: Anomalias Nucleares. Fonte: A autora, 2021.

Adicionalmente, no mesmo estudo realizado por SOUSA e colaboradores (2017) analisaram o potencial mutagênico, genotóxico e citotóxico dos extratos de *Brosimum gaudichaudii* utilizando o Teste do Micronúcleo em *Astyanax sp* e verificaram que não houve atividade genotóxica e citotóxica para as concentrações testadas, exceto a concentração de 5g/L que apresentou citotoxicidade ( $p=0,038$ ).

Existem poucas informações disponíveis na literatura sobre o teste do micronúcleo aplicado em ovos de aves durante o desenvolvimento embrionário para avaliar atividade mutagênica e citotóxica de extratos de plantas medicinais.

Segundo (ARCAIN, 2020), o embrião de galinha é considerado um ótimo modelo de estudo em toxicologia, especialmente no estágio filotípico - fase intermediária do desenvolvimento embrionário morfologicamente conservado.

Os estádios iniciais de desenvolvimento dos embriões de ave são muito similares aos dos mamíferos, tornando-os, assim, um modelo promissor para o estudo da toxicologia e permitindo explorar, com algumas ressalvas, os efeitos de exposição aos humanos. Com as dificuldades impostas ao trabalho com embriões de mamíferos, incluindo humanos, o uso do embrião de galinha (*Gallus gallus domesticus*) surge como uma opção na avaliação do efeito da exposição a poluentes e outros agentes que promovam alterações no material genético (BORGES, 2017).

Neste contexto, o sangue da membrana corioalantóide de ovos de *Gallus gallus domesticus*, torna-se um modelo bastante interessante para os estudos de embriotoxicologia nos primeiros estágios do desenvolvimento, pois dentre outras vantagens, permite um controle dos estágios de desenvolvimento e da dose ou concentração avaliada (BORGES, 2017).

## 6. CONCLUSÕES

---

- A comparação das frequências de eritrócitos com micronúcleos entre os grupos estudados permite concluir que os danos mutagênicos foram significativamente superiores nos grupos expostos em relação ao grupo controle negativo, refletindo uma resposta diretamente proporcional ao aumento da concentração do agente mutagênico.
- A comparação das frequências de eritrócitos com anomalias nucleares entre os grupos estudados permite concluir que a ação citotóxica foi 2 vezes maior no grupo exposto em relação ao grupo controle negativo. No entanto, observando entre os grupos expostos não há uma evidente dose-resposta diretamente proporcional ao aumento da concentração.
- Estes resultados contribuem para uma melhor elucidação dos efeitos adversos à saúde humana devido ao uso indiscriminado dos fitoconstituíntes. No entanto, faz-se necessário a realização de novos testes visando avaliar os efeitos clínicos na prevenção e no tratamento das enfermidades humanas.
- Adicionalmente, este estudo contribui para a inserção do teste de micronúcleos em sangue da membrana corioalantóide de ovos de *Gallus gallus domesticus* nos protocolos de avaliação mutagênica, visto que o teste se mostrou sensível, baixo custo e de fácil execução.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AGOSTINI COSTA, T. DA S. FARIA, J P; NAVES, R V; VIEIRA, R F. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial Plantas para o Futuro - Região Centro-Oeste**. Ministério do Meio Ambiente Brasília/DF 2016

ALMEIDA, GABRIELA MATTEVI. **DIFICULDADES NA PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS IN VITRO (ENSAIO COMETA E TESTE DO MICRONÚCLEO) NO ESTUDO DA CARCINOGENESE DE LEUCEMIAS E LINFOMAS**. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina 2015.

ARCAIN, BEATRIZ MITIDIERO STACCHISSINI. **EFEITOS EMBRIOTÓXICOS DO ROVRAL® DURANTE A ORGANOGÊNESE DE EMBRIÕES DE GALINHA (*Gallus gallus*)**. Dissertação. Universidade Federal da Integração Latino-Americana. 2020.

ASTUTI, S. I.; ARSO, S. P.; WIGATI, P. A. CARACTERIZAÇÃO CLIMÁTICA E SUA INFLUÊNCIA NA BIODIVERSIDADE DA REGIÃO CENTRO-OESTE DO BRASIL. **Analisis Standar Pelayanan Minimal Pada Instalasi Rawat Jalan di RSUD Kota Semarang**, v. 21, p. 1–21, 2020.

BORGES, MARISA ESSENFELDER. **USO DO EMBRIÃO DE AVE ( *Gallus gallus* ) COMO ORGANISMO MODELO PARA EMBRIOTOXICIDADE DO CHUMBO E ARSÊNIO**. Dissertação. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2017

CASTRO, MURYLLO SANTOS. **GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO BIOCIDA ANTI-INCRUSTANTE CLOROTALONIL NA ESPÉCIE *Micropogonias furnieri* , Desmarest , 1823 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO BIO**. Dissertação. Universidade Federal do Maranhão. 2017.

COSTA, G. M. DA; CASSANEGO, M. B; PETRY, C. T; SASAMORI, M. H; JÚNIOR, D. E; DROSTE, A. **Avaliação da influência do tempo de exposição de *Tradescantia pallida* var . *purpurea* para biomonitoramento da**

**genotoxicidade do ar atmosférico.** Brazilian Journal of Biosciences, v. 13, n. 4, p. 224–230, 2015.

DAMIANI, T. F.; PEREIRA, L. P.; FERREIRA, M. G. **Consumo de frutas, legumes e verduras na Região Centro-Oeste do Brasil: Prevalência e fatores associados.** Ciencia e Saude Coletiva, v. 22, n. 2, p. 369–382, 2017.

FENECH, M. et al. **Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans.** Mutation Research - Reviews in Mutation Research, v. 770, p. 1–53, 2016.

FIGUEIREDO, FLÁVIA RODRIGUES GOMES. **Ensaio mutagênicos em decocto de Cochlospermum regium (Mart. et. Schr.) Pilger (Bixaceae) em Poecilia reticulata e linfócitos humanos.** Dissertação. Universidade Católica de Goiás. 2012.

FILHO, ELIEZER FERNANDES DA SILVA. **AVALIAÇÃO TÓXICA , CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE Ipomoea asarifolia AVALIAÇÃO TÓXICA , CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE Ipomoea asarifolia ( CONVULVULACEAE ).** Dissertação. Universidade Federal Rural do Semiárido. 2015.

GUEDES, THAYS DE ANDRADE. **INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS, CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS DO INSETICIDA CURBIX® 200SC (ETHIPROLE) EM ORGANISMOS NÃO ALVOS.** Dissertação. Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. 2015.

LAPA, A. J; SOUCCAR, C; LIMA-LANDMAN, M. T. R; GODINHO, R. O; NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e toxicologia de Produtos Naturais. In Simões CMO, Schenkel Ep, 80 Gosmann G, Mello JPC, Mentz LA and Petrovik PR (org). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. Ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/ UFRGS, 2004.

LORGE, E. G. V; BECOURT-LHOTE, N; MAISONNEUVE, C; DELONGEAS, J. L; CLAUDE, N. **Genetic toxicity assessment: Employing the best science for human safety evaluation part IV: A strategy in genotoxicity testing in drug development: Some examples.** Toxicological Sciences, v. 98, n. 1, p. 39–42,

2007.

MARREIRO;, A. S. DO N.; AMORIN;, M. M.; TEIXEIRA;, P. R. S. **ELABORAÇÃO DO CHÁ DA CASCA DO ABACAXI (Ananas comosus-Bromeliaceae) E CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAIS.** Acta Tecnológica, v. 5, n. 1, p. 82, 2011.

MENDES, SILVANA DE CASTRO; SOUZA, I. K. M. DE;; JÚNIOR, C. E. DE O. C. **TESTE DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS EXFOLIATIVAS DA MUCOSA BUCAL COMO FERRAMENTA DA BIOMONITARAÇÃO EM FUMANTES: UMA REVISÃO DE LITERATURA.** Cadernos de Graduação Ciências Biológicas e da saúduencias Biológicas e da saúde, v. 4, p. 53–64, 2018.

MENDES, RAFAELA. SOUSA. **Aplicação de biomarcadores de genotoxicidade e mutagenicidade para identificação de danos no DNA de trabalhadores agrícolas do Estado de Goiás.** Dissertação. Pontifícia Unoveridade Católica de Goiás. 2020.

MORAIS;, M. C. A. DE M. CARVALHO, L. C. S. R. De; TAVARES;, M. D. Jales, A. M. **A UTILIZAÇÃO DE CHÁS COM PLANTAS MEDICINAIS COMO PRÁTICAS INTEGRATIVAS: RELATO DE EXPERIÊNCIA.** Práticas Integrativas e Complementares em Saúde. 2017.

OLIVEIRA, ELAINE DIVINA RODRIGUES SILVEIRA. **AVALIAÇÃO GENOTÓXICA EM AVES SILVESTRES DO CERRADO.** Discussão. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde -2020.

PEDROSO;, THAYS MILLENA ALVES. **ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE E DA FREQUÊNCIA DE TOXOPLASMOSE EM INDIVÍDUOS DIAGNOSTICADOS COM ESQUIZOFRENIA THAYS.** Dissertação. Universidade Federal de Goiás. 2018.

PERUMALLA VENKATA, R; RAHMAN, M. F; MAHBOOB, M; INDU KUMARI, S; CHINDE, S; BHANURAMYA, M; DUMALA, N; GROVER, P. **Assessment of genotoxicity in female agricultural workers exposed to pesticides.** Biomarkers, v. 22, n. 5, p. 446–454, 2017.

PIRES, C. E. DE M.; ALMEIDA, L. DE; COELHO, A. B. Microscopia: **Contexto Histórico, Tecnicas e Procedimentos para Obeservação de Amostras**

**Biológicas.** Érica, 2014.

ROSS, M. H. **HISTOLOGIA TEXTO E ATLAS.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SILVA, HUGO SANTIAGO FRANCISCO DA. **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO PADRONIZADO EM PSORALENO E BERGAPTENO A PARTIR DE BROSIMUM GAUDICHAUDII TRÉCUL. USANDO OS ESTÁGIOS EMBRIO-LARVAIS DE ZEBRAFISH (Danio rerio).** Dissertação. Universidade Federal de Goiás. 2020.

SÓLON, S.; GARDINI BRANDÃO, L. F.; MÁXIMO SIQUEIRA, J. **O GÊNERO Cochlospermum KUNTH COM ÊNFASE NOS ASPECTOS ETNOBOTÂNICOS, FARMACOLÓGICOS, TOXICOLÓGICOS E QUÍMICOS DE Cochlospermum regium (MART. ET. SCHR.) PILGER.** Revista Eletrônica de Farmácia, v. 6, n. 3, p. 1–22, 2009.

SOUSA, MARIA JOSÉ BATISTA DE. **Avaliação do Potencial Genotóxico e Mutagênico de Extratos Padronizados de Caesalpinia ferrea (jucá) e Brosimum gaudichaudii (inharé).** Dissertação. Pontifícia Universidade Católica de Goiás. 2017.

SOUSA, M. J. B. e CAMPOS, C. B.M; DUARTE, S. S.M; SOUSA, D. F; MANSO, J. A.X; da CRUZ, A. D; MINASI, L. B; da SILVA, C. C.. **Genotoxicity of brosimum gaudichaudii (Moraceae) and caesalpinia ferrea (fabaceae) in astyanax sp. (characidae) based on a comet assay.** Genetics and Molecular Research, v. 17, n. 4, p. 1–8, 2018.

SOUTO, HENRIQUE NAZARETH. **ABORDAGENS IN SITU E IN SILICO NO USO DAS AVES PARA O BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL DE GENOTOXICIDADE EM ÁREAS AGRÍCOLAS NO CERRADO.** Dissertação. Universidade Federal de Uberlândia. 2019.

STOCKER, JULIAN. **O impacto da contaminação aeroportuária em aves de rapina.** Dissertação. Universidade LaSalle, Canoas. 2019.

TISOTT, S. T.; SCHMIDT, V. **Expansão e intensificação das culturas agrícolas no Bioma Cerrado na Região Centro-Oeste do Brasil / Expansion and intensification of agricultural crops in the Cerrado Biome in the Center-**

**West Region of Brazil.** Brazilian Journal of Business, v. 3, p. 2280–2294, 2021.

VERRI, A. M; De ALMEIDA MOURA, A; MARQUES, V; Moura, D. E. **TESTES CITOGENÉTICOS NA AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE PRODUTOS NATURAIS PROVINDOS DE PLANTAS MEDICINAIS CYTOGENETIC TESTS IN EVALUATION OF NATURAL PRODUCTS GENOTOXICITY STEMMED OF MEDICAL PLANTS.** Revista.Uninga.Br, v. 30, n. 1, p. 55–61, 2017.

VIEIRA;, R. F. COSTA, T. DA S. A; SILVA, D. B. DA FERREIRA; F. R; SANO, S. M. **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil.** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Brasília, DF 2006.