

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Digitaria insularis* (L.) Fedde

EVALUATION OF THE BIOLOGICAL EFFECTS OF THE AQUEOUS EXTRACT FROM THE LEAVES OF *Digitaria insularis* (L.) Fedde

Cinthy Lopes da Silva^{1*}, Bianka Raiany da Silva¹; Claudia Perboni Lucas¹; Rafaela da Silva Oliveira¹; Waldiene Melo Silva¹; Francisco Carlos da Silva²; Natália Faria Romão³.

1. Discentes do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná, CEULJI/ULBRA.
2. Biólogo, Doutor em Biologia Celular e Molecular Aplicada a Saúde e docente dos cursos de Ciências Biológicas e Farmácia do CEULJI/ULBRA.
3. Bióloga, Mestre em Genética e Toxicologia e docente adjunta dos cursos de Ciências Biológicas e Farmácia do CEULJI/ULBRA.

* Autor correspondente: E-mail: biocinthy@gmail.com

Recebido em: 25/07/2018; Aceito em: 07/08/2018

RESUMO

Digitaria insularis, vulgarmente conhecida como capim-amargoso, é uma espécie utilizada na medicina popular como antibiótico e terapêutico para cicatrização de feridas, reumatismo, cefaleia e dores estomacais. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana, citotóxica e mutagênica do extrato aquoso das folhas de *D. insularis*. Para análise da atividade antibacteriana foi realizado o teste de disco-difusão no qual foram empregadas as concentrações 100, 50, 25 e 12,5% do infuso com folhas secas (ES), e das concentrações 100 e 50% do infuso com folhas *in natura* (EIN) frente *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. As mesmas concentrações do ES juntamente com as 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 e 0,39 % foram submetidas ao teste *in vitro* com *A. salina* para análise da atividade citotóxica e determinação da DL₅₀. O teste *in vivo* de *Allium cepa* foi empregado para determinar a citotoxicidade e a mutagenicidade das concentrações. O antibiograma demonstrou a presença de halos de inibição no ES e EIN à 100% para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, porém o tamanho do halo (< 6 mm) não indica efeito antimicrobiano. O teste de citotoxicidade resultou na DL₅₀ de 1891 µg/mL, sendo o ES considerado atóxico. O teste de *A. cepa* demonstrou redução no crescimento radicular indicando citotoxicidade pelos extratos. O índice mitótico indicou que as concentrações 100% e as demais concentrações induziram e inibiram a proliferação celular, respectivamente. Todos os tratamentos resultaram na presença de micronúcleos indicando efeito mutagênico. Concluiu-se que os extratos não revelaram efeito antibacteriano, mas foram citotóxicos e mutagênicos.

Palavras- chave: Citotoxicidade. Mutagenicidade. Antibacteriano. Poaceae. *Digitaria*.

ABSTRACT

Digitaria insularis, commonly known as bitter, grass is a species used in folk medicine as antibiotic therapy for wound healing, rheumatism, headache and stomach pains. Thus, the objective of this study was to evaluate the antibacterial activity, cytotoxic and mutagenic of aqueous extract of the leaves of *D. insularis*. For analysis of the antibacterial activity was performed the disk-diffusion test in which they were employed the concentrations 100, 50, 25 and 12,5% of the infused with dried leaves (ES), and the concentrations of 100 and 50% of the infused with leaves in natura (EIN) against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The same concentrations of ES along with the 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 and 0,39 % were submitted to *in vitro* test with *A. salina* for analysis of cytotoxic activity and determination of the LD₅₀. The *in vivo* test of *Allium cepa* was employed to determine the cytotoxicity and mutagenicity of concentrations. The antibiogram demonstrated the presence of inhibition halos in the ES and EIN to 100% for *E. coli* and *S. aureus*, respectively, but the size of the halo (< 6 mm) indicates no antimicrobial effect. The cytotoxicity test resulted in the LD₅₀ of 1891mg/mL, being the ES considered nontoxic. The test of *A. cepa* demonstrated a reduction in root growth indicating cytotoxicity by extracts. The mitotic index indicated that the concentrations 100% and the remaining concentrations induced and inhibited cell proliferation, respectively. All treatments resulted in the presence of micronuclei indicating mutagenic effect. It was concluded that the extracts revealed no antibacterial effect, but were cytotoxic and mutagenic.

Key words: Cytotoxicity. Mutagenicity. Antibacterial. Poaceae. *Digitaria*.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para fins terapêuticos é um hábito compartilhado desde os primórdios [1-5], e que ainda permanece presente no âmbito cultural da sociedade contemporânea como uma medida terapêutica e profilática alternativa [6] considerada de baixo custo e eficaz [7], pela qual se é recorrida quando há um impeditivo que limita o acesso a assistência médica ou a medicamentos sintéticos [6].

Entre a população mundial estima-se que 80% adotam a medicina tradicional, deste percentual 85% utilizam espécies de origem vegetal [8,9]. Essas plantas quando em interação com outros fatores, como predadores e agentes patogênicos, produzem metabólicos secundários que exercem a função de proteção do próprio vegetal, mas que podem no organismo humano serem ativos exercendo o papel preventivo contra diferentes enfermidades [10,11].

Algumas substâncias secundárias exercem atividade antibacteriana [12,13], fato que impulsiona a realização de pesquisas como estratégia para a descoberta de substâncias terapêuticas, uma vez que, a resistência adquirida pelas bactérias aos antibióticos tem induzido a críticos casos clínicos [14], como, a efeitos tóxicos ou deletérios aos organismos [15].

Embora tais substâncias sejam de origem natural é necessário através de pesquisas garantir a segurança, a qualidade e a eficácia do tratamento [9]. Sendo possível comprovar a ação terapêutica

[16] e identificar substâncias contidas que possam ser tóxicas [10], para que haja o reconhecimento da matéria-prima capaz de ser utilizada na fabricação de medicamentos [9] e que prejuízos a saúde possam ser evitados [17]. No grupo das Angiospermas várias famílias são utilizadas com fins medicinais [18], e neste grupo encontra-se a família Poaceae [17].

A Poaceae é a quarta maior família das Angiosperma, com um valor aproximado de 898 gêneros e 10.300 espécies identificadas [19]. No Brasil, há 225 gêneros e 1482 espécies, das quais 521 estão presentes na flora da região Norte e 121 espécies foram registradas no Estado de Rondônia [20].

As espécies dessa família são reconhecidas pela importância comercial e ambiental que as levaram a ser objetos de estudo de diversas pesquisas [17], dentre as quais ressaltam-se os estudos fitoquímicos pelos quais foram identificados a presença de substâncias das classes de metabólicos secundários como terpenos; flavonoides [21-24], como as fitoalexinas [23,25-28], com ação antimicrobiana contra fungos e bactérias [29-31]; alcaloides; taninos [24] e antocianinas [32].

Segundo Moreira e Bragança [33] é classificada nessa família a espécie *Digitaria insularis*, a qual recebe o nome popular de capim-amargoso, capim-açu, capim-flecha, vassourinha, capim-pororó e milhete gigante. No idioma inglês recebe a nomeação *sourgrass* referindo-se ao sabor ácido característico [34].

O capim-amargoso é uma espécie nativa distribuída ao longo das regiões tropicais e subtropicais do continente americano [35]. Em território brasileiro, a gramínea perene encontra-se localizada em áreas de lavoura, pastagem, horticulturas, terrenos abandonados, e nas margens de rodovias [33]. Esta adaptação a diversos ambientes é devido à resistência a diversas condições climáticas que influencia na capacidade de emergir e desenvolver em qualquer região do país [34].

O uso terapêutico na medicina popular já foi citado como recurso [36] para o tratamento de dores de cabeça e de estômago [37], cicatrizantes [37-39], fraturas ósseas, reumatismo [38] e como antiparasitário gastrointestinal [40]. Geralmente, são usadas as folhas *in natura*, decoctos para banho, infusão e compressas [37,39]. Apesar da relativa importância para a saúde como recurso terapêutico, nota-se a escassez de informações científicas sobre os efeitos biológicos de *Digitaria insularis*. Portanto, tornou-se importante avaliar a ação antibacteriana para verificar se há a existência deste potencial, embora, a população não a utilize para este fim, e a ação citotóxica e mutagênica para justificar e auxiliar no tratamento com essa espécie.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas e exemplares íntegros foram coletadas no perímetro urbano da Estância Turística de Ouro Preto do Oeste (10°42'25.85"S e 62°16'10.26"O), estado de Rondônia, Brasil, e a planta foi identificada como *Digitaria insularis*. A identificação botânica desta espécie foi realizada no Herbário Antônio Dalla Martha situado no Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná e as exsiccatas foram depositadas no acervo sob o número de registro 273/2017.

2.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

As folhas previamente secas em estufa a 40°C por 24 horas e trituradas em moinho de facas, conforme a metodologia de Broglio-Micheletti et al [41], foram submetidas a infusão, que é a forma de uso popular, em água destilada sob 85°C na concentração de 100 mg/mL (ES). Essa proporção foi determinada já que não há relatos literários que citem a proporção utilizada na medicina popular tradicional. Também, foi preparado o infuso das folhas *in natura* (EIN), no qual as mesmas foram colocadas sob infusão em água destilada sob 85°C na concentração 100 mg/mL, sem prévia secagem e trituração.

2.3 EFEITO ANTIMICROBIANO

A técnica de disco-difusão foi aplicada para verificação de efeitos antibacterianos, conforme a técnica do *Clinical and Laboratory Standards Intitute-CLSI* (2003) [42]. Para o teste foram usados discos de papéis estéreis embebidos nas concentrações do ES (100; 50; 25 e 12,5%) e do EIN (100 e 50%), e secos no dissecador por 48 horas. Em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Mueller Hinton foi realizado o estriamento da suspensão bacteriana na escala de MacFarland a 0,5.

Posteriormente, foram colocados 5 discos correspondentes a uma concentração em cada placa, totalizando 12 placas, sendo que seis correspondiam a seis tratamentos frente a bactéria *Staphylococcus aureus*, ou a seis tratamentos, sob as mesmas diluições, frente à *Escherichia coli*. Como controle positivo foi usado um disco do antibiótico Clindamicina (2 µg) para cada placa com *Staphylococcus aureus* e um disco de Ampicilina (10µg) para placas com *Escherichia coli*.

As placas foram encaminhadas para a estufa a 37°C por 24 horas, transcorrido o período foi realizada a leitura para observação da formação de halos de inibição e medição dos halos formados. A atividade antibacteriana foi considerada positiva quando os halos de inibição apresentaram-se superior a 6 mm [43].

2.4 EFEITO CITOTÓXICO

A partir do extrato inicial preparado com folhas secas (100 %) realizou-se diluições em solução do sal marinho 35% (35g/L) obtendo as concentrações 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78 e 0,39%. Para o controle negativo foi usado solução do sal marinho (pH 8,5) .

Cada tratamento foi realizado em triplicata com 5 mL de cada concentração e 10 náuplios dos microcrustáceos de *Artemia salina* para o seu respectivo tubo de ensaio. Decorridas 24 horas houve a contagem de indivíduos vivos e mortos por tratamentos, e a partir dos resultados houve o cálculo da Dosagem Letal Mediana (DL₅₀).

O experimento baseou-se na metodologia proposta por Meyer et al. (1982) [44], seguindo adaptações. Os resultados obtidos foram interpretados de acordo com os critérios adotados pelos autores que classificam as substâncias amostrais como tóxicas ou ativas quando possuem DL₅₀ inferior a 1000 µg/mL, e atóxica ou inativa quando a DL₅₀ é superior a 1000 µg/mL.

2.5 EFEITOS CITOTÓXICO E MUTAGÊNICO

Foram preparados seis tratamentos, sendo que quatro consistiram em infusos preparados com amostras vegetais secas nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5%; e dois tratamentos com amostras *in natura* nas concentrações de 100 e 50%. Como controle negativo foi usado água destilada e como controle positivo foi usado Sulfato de Cobre a 0,012% (0,012 g/L).

Para cada tratamento foram utilizados 10 potes de plástico estéreis contendo 50 mL das suas respectivas concentrações, e em cada um foram inseridos para germinar 1 bulbo com o anel germinativo imerso. Transcorridas 48 horas de imersão, os meristemas com tamanho intermediário foram retirados e imersos por 12 horas em uma solução de Metanol/Ácido acético (3:1). Os meristemas foram lavados com água destilada e hidrolisados com Ácido Clorídrico (HCL) em banho-maria à 60°C por 6 minutos, sendo novamente lavados com água destilada [45].

Houve a preparação de lâminas em duplicata, as quais foram coradas com o Kit Panótico Rápido LB [46]. Estas foram visualizadas no microscópio óptico na objetiva de 1000X, com o intuito de verificar a formação de micronúcleos e determinar o índice de interfases, prófases,

metáfases, anáfases e telófases em 1000 células por lâminas com o objetivo de verificar o índice mitótico para cada tratamento, que corresponde ao número total de células em mitose dividido pelo total de células, sendo o resultado multiplicado por 100 [46,47].

Após cinco dias de experimento foi realizada a leitura do crescimento radicular, com auxílio de um paquímetro daquela que possuía o maior tamanho em cada bulbo [48].

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estatísticos deste estudo foram apresentados em valores médio (\pm DP) e avaliados por análise de variância unidirecional (ANOVA) através do programa programa Graphpad 6.0, cujos os resultados alcançados foram comparados as médias obtidas nos testes de Dunnet e Tukey ao nível de significância 1 e 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Apenas as concentrações de 100% dos infusos com folhas secas (ES100) e com folhas *in natura* (EIN100) demonstraram a formação de halos de inibição frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Contudo, de acordo com o perímetro médio do halo foi possível verificar que as cepas foram resistentes a ambas concentrações, assim como, aos demais tratamentos que não formaram halos de inibição, conforme verificado na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição do tamanho médio em milímetros (mm) dos halos de inibição formados através da sensibilidade da *E. coli* e *S. aureus* aos extratos de *D. insularis* submetidos a análise da atividade antibacteriana pelo método de difusão em disco.

Tratamento	ES 100	ES 50	ES 25	ES 12,5	EIN 100	EIN 50	CP
<i>E. coli</i>	2,6 \pm 2,5	-	-	-	-	-	8,8 \pm 0,83
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	4,2 \pm 0,44	-	15,6 \pm 2,1

Legenda: CP=Controle Positivo; ES= Infuso das folhas secas (100%, 50%, 25% e 12,5%); EIN= Infuso das folhas *in natura* (100% e 50%).

Segundo Haida et al. [49] dados similares foram obtidos ao submeter as espécies *S. aureus* e *E. coli* ao teste de difusão em discos utilizando extratos aquosos (infusão), etanólicos, cetônicos, cloromórficos e hexânicos da espécie *Cymbopogon citratus*, também pertencente à família Poaceae, nas concentrações 50% (500 mg/mL). Todas obtiveram halos de inibição inferior a 7 mm indicando que a espécie não apresenta potencial antibacteriano.

Resultados distintos foram obtidos para esta mesma espécie ao avaliar a atividade antibacteriana do seu óleo essencial através da técnica de microdiluição em caldo, que resultou em concentrações inibitórias mínimas (CIM) de $7,81 \mu\text{g/mL}^{-1}$ para *S. aureus* e $62,50 \mu\text{g/mL}^{-1}$ para *E. coli*. Concluiu-se no estudo, que o óleo essencial da espécie apresenta potencial antibacteriano [50].

Embora tenha sido verificado a formação de halos de inibição nos tratamentos 100% com *D. insularis* não é possível determinar que houve atividade antibacteriana devido ao tamanho médio dos halos tendo sido inferiores a 6 mm, conforme o critério de classificação adotado por De-Bona et al. [43]. Contudo, não se pode descartar a possibilidade deste potencial farmacológico para a espécie estudada visto que existem outras técnicas para avaliar a atividade antimicrobiana, solventes e outros métodos para extração de metabólitos e microorganismos a serem testados que podem influenciar em outros resultados [51]. Além disso, já há identificado em espécies da família a presença de metabólitos com potencial antibacteriano como os taninos [24,52] e com ação antifúngica como os flavonoides [24,53].

O teste de citotoxicidade com *Artemia salina* demonstrou que as concentrações 100, 50, 25 e 12,5% do ES resultaram no percentual de mortalidade de 100% dos indivíduos. A medida que as concentrações diminuíram foram obtidos resultados diretamente proporcionais nos tratamentos 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; e 0,39%, através da construção da regressão linear obteve-se uma DL_{50} de $1891 \mu\text{g/mL}$ (Figura 1).

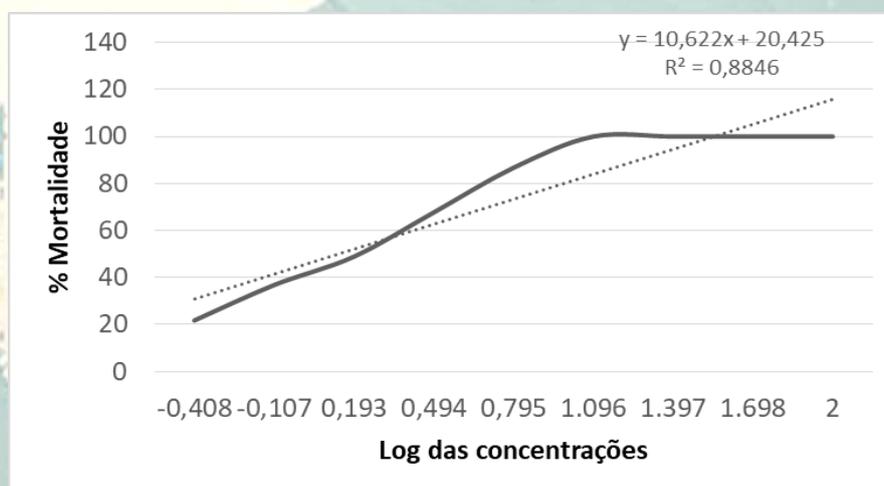


Figura 1. Distribuição do percentual de óbitos (% Mortalidade) em função do logaritmo das concentrações (Log das concentrações).

De acordo com Meyer et al. [44] a Dosagem Letal Mediana de uma substância é considerada atóxica ou inativa quando o seu valor é superior a 1000 µg/mL e tóxica ou ativa quando inferior à 1000 µg/mL. Portanto, neste estudo de acordo com a DL₅₀ foi possível classificar o infuso com folhas secas como atóxico ou inativo para este teste.

Teste de citotoxicidade com *Artemia salina* frente ao extrato da espécie *Vetiveria zizanioides*, da família Poaceae, resultou na concentração letal 690 µg/mL [54] considerada tóxica ou ativa, segundo Meyer et al. [44]. Não houve diferença significativa entre as concentrações testadas para uma mesma espécie [54]. Os resultados diferem-se ao da *D. insularis* demonstrando que, embora, as espécies pertençam a uma mesma família podem apresentar distintos potenciais tóxicos.

Na pesquisa de Quignard et al. [55] foi utilizado testes com *Artemia franciscana* para avaliar a citotoxicidade do extrato aquoso e metanólico da espécie *Cymbopogon citratus*, Poaceae, os quais apresentaram o percentual de taxa de mortalidade de 0 e 50%, respectivamente. Assim, segundo os autores o extrato aquoso foi considerado inativo e o extrato metanólico foi classificado como detentor de atividade citotóxica.

Através do teste do *A. cepa*, verificou-se que as concentrações ES100, ES50 e ES25 possuem efeito citotóxico em relação ao controle negativo ao reduzir o crescimento radicular de *A. cepa*. O mesmo resultado se obteve para os extratos EIN100 e EIN50 (Figura 2). Esses resultados indicam uma provável atividade alelopática dos extratos frente as raízes de *A. cepa*, assim como sugere sua citotoxicidade, que comparado aos resultados do teste de letalidade frente a *A. salina* reforça esta hipótese.

Estudo realizado por Cândido et al. [56] avaliou o crescimento das partes meristemáticas da alfaca, submetida ao método sanduíche, utilizando tratamentos com folhas secas de *D. insularis*. Identificou-se que os tratamentos 10, 25 e 50% não influenciaram significativamente na germinação das sementes as quais atingiram um percentual de 80%, contudo, inibiram o crescimento das raízes, não havendo diferença significativa entre os tratamentos. O pesquisador atribuiu estes resultados a possível presença de ácidos fenólicos e flavonoides que geralmente são distribuídos ao longo dos tecidos vegetais.

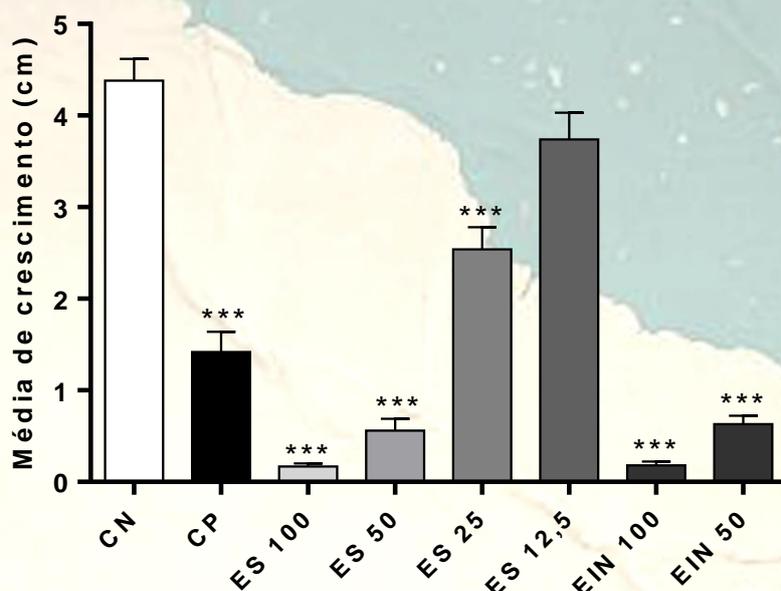


Figura 2. Média do crescimento radicular de *Allium cepa* sob distintas concentrações do extrato aquoso das folhas de *Digitaria insularis*. **Legenda:** CP=Controle Positivo; CN=Controle Negativo; ES=Infuso das folhas secas (100%, 50%, 25% e 12,5%); EIN=Infuso das folhas *in natura* (100% e 50%). *** Dados significantes. Análise de variância ANOVA pelo teste Tukey a 5% de significância ($P < 0.05$).

Os compostos fenólicos, assim como os taninos e terpenos, atuam individualmente ou simultaneamente com outras moléculas interferindo nos processos fisiológicos durante a germinação e desenvolvimento das espécies-alvo [57]. Por sua vez, soluções com a presença de flavonoides alteraram o potencial osmótico, inibindo a absorção e provocando baixo crescimento radicular [58]. Em pesquisa realizada por Paszkowski e kremer [59] foi comprovado a ação inibitória de flavonoides presentes em extratos aquosos de plantas sob o crescimento radicular. Conforme Castro et al. [21] e Lorenzetti et al. [22] os terpenos já foram identificados em espécies pertencentes a família Poaceae, assim como os flavonoides e taninos [23,24].

Os resultados do teste de *A. cepa* apontam que os tratamentos ES50, ES25, ES12,5 e EIN50 reduziram o índice mitótico em relação ao CN. Por sua vez, os tratamentos ES100, EIN 100 e o grupo CP induziram a um aumento do índice mitótico. Em todos os tratamentos, com exceção dos ES100, EIN100 e CP, foram observados redução das fases de Metáfase e Anáfase (Tabela 2).

Para Artico et al. [60] a análise da citotoxicidade e genotoxicidade do extrato aquoso das partes áreas do capim-annonia (*Eragrostis plana Nees*), espécie da mesma família Poaceae, através do teste do micronúcleo utilizando *Allium cepa*, demonstrou redução do índice mitótico nos tratamentos CP, 100, 50 e 25%, bem como os resultados dos tratamentos 100 e 50% não diferiram estatisticamente.

Tabela 2. Média de células analisadas em Mitose e índice mitótico obtidos através do teste *Allium cepa* por tratamento em diferentes concentrações do extrato de *Digitaria insularis*.

Tratamento	Fases Mitótica					IM
	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	
CN	16129	3089	254	198	326	19.34
CP	11056	8637	25	34	116	44.35****
ES 100	10524	9157	64	75	84	47.13****
ES 50	16410	3317	7	7	171	17.59
ES 25	16516	3183	7	23	193	17.1
ES 12.5	17419	2412	8	5	86	12.6
EIN 100	8429	7236	98	77	55	46.97***
EIN 50	16544	3120	3	11	218	16.85

Legenda: CN= Controle negativo; CP= Controle Positivo; ES= Infuso das folhas secas (100%, 50%, 25% e 12,5%); EIN= Infuso das folhas *in natura* (100% e 50%); IM= índice mitótico. **** Altamente significativos, *** Alta significância. Análise de variância ANOVA pelo teste Tukey a 5% de significância ($P < 0.05$).

Dados similares aos da presente pesquisa, em relação ao aumento do índice mitótico dos tratamentos CP, ES100 e EIN100, foram relatados no estudo de Dias et al. [61] com extratos aquosos de *Mikania cordifolia*, espécie da família Asteraceae, em testes com *Allium cepa*, no qual foi verificado um aumento significativo do índice mitótico nas maiores diluições e uma redução significativa na menor proporção, sendo que todas as concentrações foram acompanhadas da presença de micronúcleos. Estes resultados foram atribuídos a presença de uma maior atividade antiproliferativa de acordo com o decréscimo das concentrações, a qual foi atribuída a presença dos triterpenóides.

O metabólico secundário sugerido acima para esta atividade pertence à classe dos terpenos, já identificada em espécies da família Poaceae [24] e a ela é atribuída as atividades antioxidante, anticancerígena [62] e anti-inflamatória [63]. Segundo Galvão et al. [64] atividade antiproliferativa pode ser verificada quando há presença de um maior número de interfases nas células meristemáticas.

Conceição [65] explica que nas células meristemáticas dos bulbos de *Allium cepa* sob influência de uma solução pode ocorrer um maior estímulo a divisão celular, fato que explica o maior índice mitótico nas primeiras horas, contudo, após este período pode ocorrer uma citotoxicidade ao tempo de exposição que provoca o declínio da proliferação celular desencadeando

o menor crescimento radicular. A afirmação da autora, também, corrobora com os demais resultados apresentados por esta pesquisa, na qual o teste *in vitro* (teste com *Artemia salina*) não demonstrou citotoxicidade aguda do infuso das folhas secas através da DL₅₀, contudo, demonstrou citotoxicidade pelo teste *in vivo* (teste de micronúcleos) ao resultar na redução do crescimento radicular pelas raízes de *Allium cepa* submetidas a um maior período de exposição ao infuso de folhas secas.

Quanto a redução das fases de Anáfase e Metáfase resultados similares foram encontrados por Artico et al. [60] em tratamentos que demonstraram menor índice mitótico. O mesmo foi verificado por Turkoglu [66] no qual os tratamentos com menor índice mitótico apresentaram valores reduzidos da fase de anáfase e valores crescentes na frequência de prófases, por sua vez, os tratamentos com maior índice mitótico apresentou valores crescentes na frequência de anáfases e decrescente na de prófases. Segundo Araujo et al. [67], os flavonoides podem agir na progressão das fases G1 e G2 regulando a proliferação celular e, portanto, determinando o índice mitótico.

Os resultados do teste de micronúcleo demonstraram que todos os tratamentos obtiveram uma frequência de micronúcleos estatisticamente significativa em relação ao grupo CN (Figura 3), apontando para um efeito mutagênico causado pelos extratos aquosos de *D. insularis*.

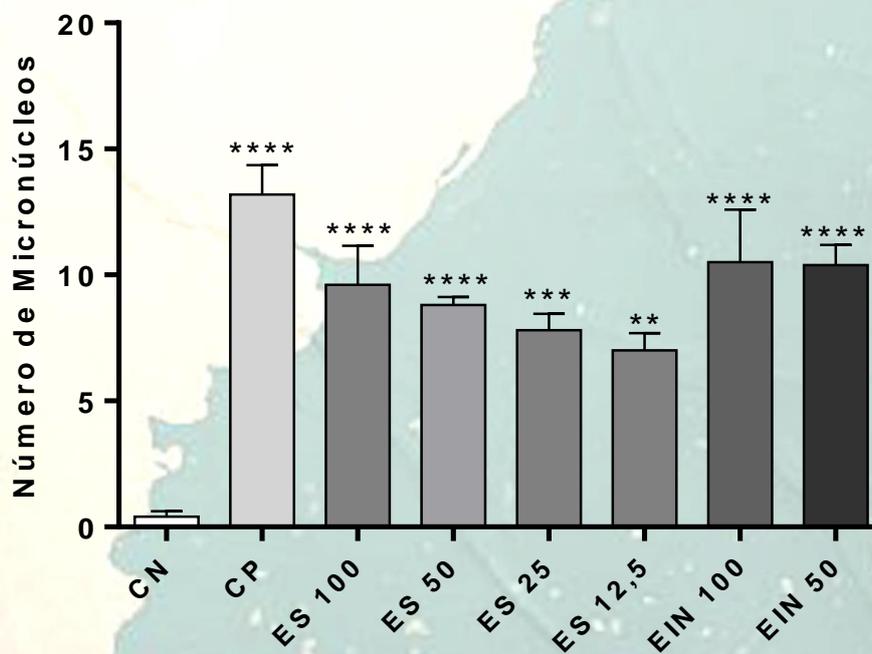


Figura 3. Média de micronúcleos por concentração do extrato aquoso das folhas de *Digitaria insularis*. **Legenda:** CP=Controle Positivo; CN=Controle Negativo; ES=Infuso das folhas secas (100%, 50%, 25% e 12,5%); EIN=Infuso das folhas *in natura* (100% e 50%). **** Significantes em relação ao controle negativo; *** Significantes em relação ao controle negativo mas, com significância intermediária entre todos os dados significantes; ** Significantes em relação ao controle negativo mas, com significância inferior em relação aos demais dados significantes. Análise de variância ANOVA pelo teste Tukey a 5% de significância ($P < 0.05$).

De acordo com Artico et al. [60] também foi verificado com *Eragrostis plana* (capim-annonia), espécie da família Poaceae, a presença de micronúcleos, porém, estes eram acompanhados de pontes cromossômicas nas células dos meristemas submetidos aos tratamentos 100, 50 e 25%, sendo que entre estes não houve diferença estatística. No entanto, nesta pesquisa com *D. Insularis* o teste não demonstrou a presença de pontes cromossômicas.

Segundo Fenech et al. [68], a presença de micronúcleos acompanhados da baixa ou ausente frequência de pontes e fragmentos cromossômicos indica que o aparecimento de micronúcleos é resultado de uma mutação no qual esse pequeno núcleo provém da perda de um ou mais cromossomos íntegros que durante o ciclo celular não se incorporaram ao núcleo. O mesmo autor atribui esta atividade aneugênica a ação de terpenos, bem como de flavonoides sob a ausência de saponinas.

Conforme Gniazdowska e Bogatek [69], a toxicidade desempenhada por soluções amostrais de plantas medicinais também pode ser atribuída a presença de fenóis que ao produzirem espécies reativas de oxigênio, ou seja radicais livres, podem agir sobre a membrana celular induzindo a um aumento da permeabilidade, bem como danos ao DNA e por consequência a proteínas, resultando em genotoxicidade e citotoxicidade as células.

Quanto as concentrações do extrato *in natura* ressalta-se que durante a pesquisa a partir da concentração inicial (100 mg/mL) foi obtida por diluição apenas a concentração 50 mg/mL, uma vez que, o objetivo principal da pesquisa foi avaliar os efeitos biológicos do ES. Portanto, o registro dos resultados dos efeitos biológicos e toxicológicos de ambas as concentrações do EIN foi realizado com o intuito de fornecer dados científicos preliminares que possam sugerir a realização de uma posterior pesquisa que venha a ter como objeto de estudo o infuso de folhas *in natura*.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que o infuso das folhas secas e o infuso das folhas *in natura* de *D. insularis* nas concentrações analisadas não manifestaram atividade antibacteriana frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*; apresentaram, de acordo com a DL₅₀, efeito atóxico ou não citotóxico no teste com *Artemia salina* e efeito citotóxico e mutagênico no teste de micronúcleos.

Sugere-se a realização de estudos fitoquímicos para a identificação dos metabólicos secundários presentes nesta espécie com intuito de viabilizar um melhor esclarecimento dos dados desta pesquisa, bem como os resultados de estudos posteriores. Além disso há necessidade de se

averiguar a atividade antibacteriana da espécie através de outras metodologias, técnicas e solventes para extração de metabólitos, e pelo uso de outros microrganismos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANHESI, N; DA ROSA, L.G; PEREIRA, A.C; DE MELO, A. Uso de plantas medicinais na gestação. **RETEC**, v. 9(2), p. 101-9, 2016.
- [2] BRANCO NETO, M.L.C.B. et al. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21(2), p.1-6, 2006.
- [3] PETROVSKA, B.B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6(11), p. 1-5, 2012.
- [4] SILVA, C.L.F. Uso terapêutico e religioso das ervas. **Caminhos**, v. 12(1), p. 79-92, 2014.
- [5] VAZ, S. M. **Análise de extratos de plantas medicinais pelo método de ativação com nêutrons**. (Dissertação) Mestrado em Ciências e Tecnologia Nuclear- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.
- [6] LUCAS, F.C.A. et al. Uso e benefício das plantas em comunidades rurais de Capanema, Pará, Brasil. **Caderno de Agroecologia**, v. 10(3), p.1-5, 2015.
- [7] ALVES, J.J.P. et al. Conhecimento popular sobre plantas medicinais e o cuidado da saúde primária: um estudo de caso da comunidade rural de mendes, São José de Mipibu/RN. **Carpe Diem: Revista Cultural e Científica do UNIFACEX**, v.13(1), p. 136-156, 2015.
- [8] FENALTI, J.M; BACCEGA, B. Diversidade das plantas brasileiras com potencial anti-helmíntico. **Vittale- Rev de Ciências da Saúde**, v. 28(1), p.39-48, 2016.
- [9] BRASIL. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília, 2006.
- [10] FONSECA, C.A; PEREIRA, D.G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v. 16(7-8), p. 51- 54, 2004.
- [11] PLETSCI, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 1(4), p. 12-5, 1998.
- [12] MACHADO, F.L.S. et al. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20(3), p. 441- 52, 2010

[13] GARCIA, C.S; UEDA, S.M.Y; MIMICA, L.M.J. Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos hidroetanólicos de plantas sobre *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 70(4), p. 589-98, 2011.

[14] SÁ JUNIOR, P.F. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos aquosos, hidroalcoólicos e alcoólicos de espécies da família Anacardiaceae. **Rev De Ciênc Méd Biol**, v. 15 (1), p. 56-61, 2016.

[15] BARROS, S.B.M; DAVINO, S.C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S; CAMARGO, M.M.A; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo, p. 59-70, 2008.

[16] KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 30(3), p. 241- 8, 2009.

[17] NAKAMURA, A.T; LONCHI- WAGNER, H.M; SCATENA, V.L. Desenvolvimento de óvulo, fruto e semente de espécies de Poaceae (Poales). **Revista Brasil Bot**, v. 32 (1), p. 165- 176, 2009.

[18] ALVES, G.S.P; POVH, J.A. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade de Santa Rita, Ituiutaba- MG. **Biotemas**, v. 26(3), p. 231-242, 2013.

[19] TZVELEV, N.N. The System of Grasses (Poaceae) and Their Evolution. **The Botanical Review**, v. 55(3), p.141- 204, 1989.

[20] COPPETEC-UFRJ. **Poaceae in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/flora_dobrasil/FB193>, [Acesso em: 10 Abr. 2017].

[21] CASTRO, H.F; OLIVEIRA, P.C; SOARES, C.M.F. Síntese de esteres terpenóides por via enzimática: influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno. **Ciênc Tecnol Aliment**, v. 17(3), p.224- 228, 1997.

[22] LORENZETTI, E.R. et al. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Rev Bras Pl Med**, v. 13(especial), p. 619-27, 2011.

[23] PAEKE, H.L. et al. Transcriptomic analysis of UV-treated rice leaves reveals UV-induced phytoalexin biosynthetic pathways and their regulatory networks in rice. **Phytochemistry**, v. 96, p. 57- 71, 2013.

[24] HEGDE, M.M. et al. Assessment of antidiarrhoeal activity of *Desmostachya bipinnata* L. (Poaceae) root extracts. **BLACPMA**, v. 9(4), p.312- 8, 2010.

[25] ARRUDA, R.L. et al. An approach on phytoalexins: function, characterization and biosynthesis in plants of the family Poaceae. **Ciência Rural**, v. 46(7), p. 1206-16, 2016.

[26] POWELL, R.G. et al. Isolation of resveratrol from *Festuca versuta* and evidence for the widespread occurrence of this stilbene in the Poaceae. **Phytochemistry**, v. 35(2), p. 335-8, 1994.

- [27] LO, C.S.C; VERDIER, K; NICHOLSON, R.L. Accumulation of 3- deoxyanthocyanidin phytoalexins and resistance to *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55 (5), p. 263 – 73,1999.
- [28] SCHMELZ, E.A. et al. Biosynthesis, elicitation and roles of monocot terpenoid phytoalexins. **The Plant Journal**, v. 79, p. 659–678, 2014.
- [29] TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- [30] JEANDET, P. et al. Deciphering the Role of Phytoalexins in Plant-Microorganism Interactions and Human Health. **Molecules**, v. 19(11), p. 18033-56, 2014.
- [31] SADAVA, D. et al. **Vida a Ciência da biologia**. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- [32] CLIFFORD, F.L.S.H.T.; HARBONE, J.B. Anthocyanin composition of and distribution in the Poaceae (Gramineae). **Proc. Linn. Soc. Lond**, v. 178(2), p. 125-7, 1967.
- [33] MOREIRA, H.J.C; BRAGANÇA, H.B.N. **Manual de identificação de plantas infestantes: hortifrúti**. São Paulo: FMC Agricultural Products, 2011.
- [34] GEMELLI, A. et al. Aspectos da biologia de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate e implicações para o seu controle. **Revista Brasileira de Herbicidas**. v. 11(2), p.231-40, 2012.
- [35] PEREIRA, M.C. et al. Manejo químico de *Digitaria insularis* em área de plantio direto. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5(1), p. 13-7, 2010.
- [36] GOMEZ, M; ROCHA, E.A; GOMBERG, E. Análise das publicações etnobotânicas sobre plantas medicinais da Mata Atlântica na Região Sul do Estado da Bahia, Brasil. **Revista Fitos**, v. 10(2), p. 1-26, 2016.
- [37] SILVA, N.C.B. et al. Uso de plantas medicinais na comunidade quilombola da Barra II- Bahia, Brasil. **BLACPMA**, v. 11(5), p. 435- 53, 2012.
- [38] BIESKI IGC. **Conhecimento etnofarmacobotânico de plantas medicinais utilizadas por comunidades tradicionais do Distrito Nossa Senhora Aparecida do Chumbo, Poconé, Mato Grosso, Brasil**. (Dissertação) Mestrado em Ciências da Saúde- Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2010
- [39] DAMASCENO A.A; BARBOSA A.A.A. Levantamento etnobotânico de plantas do bioma Cerrado na Comunidade de Martinésia, Uberlândia, MG. **Revista Horizonte Científico**, v. 2(1), p. 1-30, 2008.
- [40] ALMEIDA, M.A.O. et al. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Capim-santo) e de *Digitaria insularis* (L.) Fedde (Capim-açu) sobre cultivos de larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 12(3), p. 125-9, 2003.
- [41] BROGLIO-MICHELETTI, S.M.F. et al. Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 18(4), p. 44-8, 2009.

[42] CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. NCCLS document M2-A8.** Clinical and Laboratory Standards Institute, Organização Pan- Americana da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Estados Unidos das Américas, 2003.

[43] DE-BONA, E.A.M et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arq do Inst Biol**, v.81(3), p. 218-25, 2014.

[44] MEYER, B.M. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **J. Med. Plant Res**, v. 45(1), p. 31-4, 1982.

[45] MENEGUETTI, D.U.O. Adaptação da técnica de micronúcleo em *Allium Cepa*, para futuras análises de mutagenicidade dos Rios da Região do Vale do Jamari, Rondônia, Amazônia Ocidental. **Revista Pesquisa & Criação**, v. 10 (2), p. 181-7, 2011.

[46] OLIVEIRA, V. et al. Efeito do herbicida trifluralin sobre a germinação de sementes e índice mitótico em raízes de milho (*Zeamays*). **Revista Unimar**, v.18(1), p. 537-44, 1996.

[47] PIRES, N.M. et al. Efeito do extrato aquoso de leucina sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13(1), p. 55-65, 2001.

[48] GUERRA, M; SOUZA, M. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana.** Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, 2002.

[49] HAIDA, K.S et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq Ciênc Saúde Unipar**, v.11(3), p.185-92, 2007.

[50] SILVA, F.L et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. **Arq Ciênc Vet Zool Unipar**, v. 17(3), p. 179-82, 2014.

[51] RIOS, J.L; RECIO, M.C; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **J Ethnopharmacol**, v.23(2-3), p. 127-49, 1988.

[52] PEREIRA, A.V. et al. Taninos da casca do Cajueiro: atividade antimicrobiana. **AGROTEC**, v.36(1), p. 121-27, 2015.

[53] PEIXOTO NETO, P.A.S; CAETANO, L.C. **Plantas medicinais do popular ao científico.** Maceió: Edufal, 2005.

[54] KRISHNARAJU, A.V. et al. Biological Screening of Medicinal Plants Collected from Eastern Ghats of India Using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Int J Appl Sci Eng**, v.4(2), p. 115-25, 2006.

[55] QUIGNARD, E.T.J. et al. Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp. **Acta Amazonica**, v.33(1), p.93-104, 2003.

[56] CÂNDIDO, A.C.S. et al. Potencial alelopático de lixiviados das folhas de plantas invasoras pelo método sanduiche. **Rev Bras Bioci**, v. 8(3), p. 268-72,2010.

[57] EINHELLIG, F. A. The physiology of allelochemical action: Clues and views. In: REIGOSA, M.; PEDROL, N. **Allelopathy from Molecules to Ecosystems**. Vigo, p. 1-23, 2002.

[58] FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.12, p.175-204, 2000.

[59] PASZKOWSKI, W.L; KREMER, R.J. Biological activity and tentative identification of flavonoid components in velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medik.) seed coats. **Journal of Chemical Ecology**, v.14(7), p. 1.573-82, 1988.

[60] ARTICO, L.L. et al. Análise de alterações cromossômicas no Sistema *Allium cepa* causadas pela exposição de sementes a extratos brutos de *Eragrostis plana*: a principal invasora do Bioma Pampa. In: **XXVI Congresso Brasileiro de Zootecnia**, Santa Maria, 2016.

[61] DIAS, M.G. et al. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L. F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. **Rev Bras PI Med**, v.16(2), p.202-8, 2014.

[62] ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J Vac Br**, v. 3(2), p. 145- 54, 2004.

[63] CALOU, IBF. Efeito dos terpenos ácidos centipédico e lactona do ácido hawtriwaico em modelos de dermatite de contato induzida por TPA e oxazolona em camundongos. (Dissertação) Mestrado em Farmácia.Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

[64] GALVÃO, M. et al. Potencial mutagênico em águas coletadas em diferentes pontos no perímetro urbano do município de Alta Floresta- MT através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Enciclopédia Biosfera**, v. 11(21), p. 2373- 83, 2015.

[65] CONCEIÇÃO, T.S. **Efeito antiproliferativo, mutagênico e antineoplásico de produtos comerciais da erva mate (*Ilex paraguariensis*)**. (Dissertação) Mestrado em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste – Universidade Federal de Mato Grosso, 2010.

[66] TURKOGLU, S. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate,calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p. 2035-41, 2008.

[67] ARAÚJO, J.R; GONÇALVES, P; MARTEL, F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. **Nutrition Research**, v.31(2), p.77- 87, 2011.

[68] FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v.26, p. 125-32,2011.

[69] GNIAZDOWSKA, A; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. **Acta Physiology Planta**, v. 27, p. 395-407, 2005.