

**EFEITO ANTIMUTAGÊNICO DA *Bidens pilosa* FRENTE À EXPOSIÇÃO AO
TETRACLORETO DE CARBONO**

FERNANDA DE MARIA SERRA

**EFEITO ANTIMUTAGÊNICO DA *Bidens pilosa* FRENTE À EXPOSIÇÃO AO
TETRACLORETO DE CARBONO**

FERNANDA DE MARIA SERRA

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador: Prof. Dra. Gisele Alborghetti Nai

636.082 1 Serra, Fernanda de Maria.
S487a Efeito antimutagênico da Bidens pilosa frente à
exposição ao tetracloreto de carbono / Fernanda de
Maria Serra. – Presidente Prudente, 2016.
29 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2016.

Bibliografia.

Orientador: Gisele Alborghetti Nai.

1. Bidens pilosa. 2. teste para micronúcleos. 3.
tetracloreto de carbono. 4. Genotoxicidade. 5.
Mutagenicidade. I. Título.

FERNANDA DE MARIA SERRA

EFEITO ANTIMUTAGÊNICO DA *Bidens pilosa* FRENTE À EXPOSIÇÃO AO TETRACLORETO DE CARBONO

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 24 de outubro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Gisele Alborghetti Nai
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dra. Giovana Rampazzo Teixeira
Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho” - UNESP
Presidente Prudente-SP

Prof. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Odacir e Rosângela, que sempre me ensinaram a ter muita humildade e educação, me ofereceram os alicerces necessários para chegar até aqui e nunca mediram esforços para a realização dos meus sonhos. Sem eles nada seria possível, nada teria sentido.

Aos meus irmãos, Bruno e Roberta, que sempre foram meus companheiros e ofereceram sempre muito apoio em todos os momentos.

À minha Mãezinha e ao Senhor Jesus Cristo, que sempre olharam por mim e prepararam um caminho maravilhoso pelo qual eu tenho caminhado.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Gisele Alborghetti Nai, pelo convite em ser sua orientada, sua orientação, por toda a paciência e incentivo e por todos os ensinamentos que agregaram em minha formação.

Aos professores: Dr. Marcus Vinicius Pimenta Rodrigues, Dra. Angélica Augusta Grigoli, Dra Margarida Maria Silveira e Ms. Leonilda Chiari Galle, por todo o incentivo que me deram no início dessa nova etapa.

Aos pesquisadores: Dr. Décio Gomes de Oliveira, Ms. Cristiane Martinez Ruiz Pegoraro, Ms. Gabrielle Gomes dos Santos Ribeiro, Leonardo Alves Garcia, Juliana Apolônio Alves, Pedro Chagas, por todo o companheirismo e todo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Iracimara de Anchieta Messias e Dra. Giovana Rampazzo Teixeira, por permitir meu acesso aos seus departamentos e compartilhar seus conhecimentos comigo.

“Tenho consciência de ser autêntica e procuro superar todos os dias minha própria personalidade, despedaçando dentro de mim tudo que é velho e morto, pois lutar é a palavra vibrante que levanta os fracos e determina os fortes”.

Cora Coralina

RESUMO

Efeito Antimutagênico da *Bidens Pilosa* Frente à Exposição ao Tetracloreto de Carbono

A *Bidens pilosa* é uma planta medicinal composta em abundância por flavonoides e poliacetileno, que atuam no organismo com efeitos antitumorais, antioxidante e antimicrobiano. É uma erva muito utilizada na forma de chá para combater icterícia e hepatite. A hipótese deste estudo é que se a *Bidens pilosa* podendo ser usada como hepatoprotetora em casos de exposição ao tetracloreto de carbono, também, possa conferir proteção contra mutagenicidade deste agente químico. **Objetivo:** Avaliar se o tratamento tópico e por via oral com *Bidens pilosa* pode ter efeito anti-mutagênico sobre as células da medula óssea em animais expostos ao tetracloreto de carbono (CCl₄). **Material e Métodos:** Foram utilizados 64 ratos Wistar albinos, adultos, machos, divididos em sete grupos, tratados por 10 semanas (exceto o grupo controle positivo). A dose administrada da solução de CCl₄ foi de 1 ml/100g de peso, via intraperitoneal, duas vezes por semana; o extrato aquoso de *Bidens pilosa* oral foi administrado por gavagem diariamente, (0,5ml/100g de peso); a *Bidens pilosa* tópica foi mediante banho diário durante 1 minuto; o grupo do controle negativo recebeu 1ml de óleo de oliva por cada quilo de peso via intraperitoneal, duas vezes por semana e o controle positivo recebeu ciclofosfamida em dose única subcutânea (50 mg/kg) no primeiro dia do experimento. Grupos: A – Grupo CCl₄, (n=10); B – Grupo CCl₄ + *Bidens pilosa* oral, (n=10); C – Grupo CCl₄ + *Bidens pilosa* tópica, (n=10); D – Grupo CCl₄ + *Bidens pilosa* oral e tópica, (n=10); E – *Bidens pilosa* oral, (n=8); F – Grupo controle negativo, (n=8); G – Grupo controle positivo (n=8). Os animais dos grupos A, B, C, D, E e F foram eutanasiados 10 semanas após o início do experimento e os do grupo G, 24 horas após o início. Retirou-se o fêmur para coleta das células da medula óssea e realização do teste do micronúcleo. **Resultados:** A mediana de micronúcleos no grupo exposto somente ao CCl₄ foi de 4,00. Nos grupos expostos ao CCl₄ e *Bidens pilosa* (oral e/ou tópica) e exposto apenas a *Bidens pilosa* e no grupo não exposto ao CCl₄ foi de 0,00. No grupo exposto a ciclofosfamida foi de 9,00. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos A e G (p>0,05), porém estes diferiram estatisticamente dos demais grupos (p<0,05). **Conclusão:** A *Bidens pilosa* em uso oral e tópico conferiu efeito anti-mutagênico a exposição ao tetracloreto de carbono.

Palavras-chave: *Bidens pilosa*, teste para micronúcleos, tetracloreto de carbono, genotoxicidade, mutagenicidade.

ABSTRACT

Antimutagenic effect of *Bidens pilosa* face the exposure to carbon tetrachloride

Bidens pilosa is a medicinal plant made in abundance by flavonoids and polyacetylene, which act in the body with anti-tumor, antioxidant and antimicrobial effects. It is an herb widely used as tea to combat jaundice and hepatitis. The hypothesis is that the *Bidens pilosa* can be used as a hepatoprotective in cases of exposure to carbon tetrachloride and also may confer protection against mutagenicity caused by this chemical agent. **Objective:** To evaluate whether the topical treatment and oral with *Bidens pilosa* may have anti-mutagenic effect on bone marrow cells in animals exposed to carbon tetrachloride (CCl₄). **Material and methods:** 64 Wistar rats, adults, males, were divided into seven groups, treated for 10 weeks (except the positive control group). The dose of CCl₄ solution was 1 ml / 100g, intraperitoneally, twice a week; the aqueous extract of *Bidens pilosa* was administered by oral gavage daily (0.5 ml / 100g); topical *Bidens pilosa* was by daily bath for 1 minute; the negative control group received 1ml olive oil / kg of body weight intraperitoneally twice a week and the positive control received subcutaneous single dose of cyclophosphamide (50 mg / kg) on the first day of the experiment. Groups: A - CCl₄ group (n = 10); B - CCl₄ Group + *Bidens* oral hairy, (n = 10); C - + CCl₄ Group *Bidens pilosa* topical (n = 10); D - + CCl₄ Group *Bidens pilosa* oral and topical (n = 10); E - *Bidens pilosa* orally (n = 8); F - negative control group (n = 8); G - Group positive control (n = 8). The animals of groups A, B, C, D, E and F were euthanized 10 weeks after the start of the experiment and the G group 24 hours after the start. He retired the femur to collect the bone marrow cells and realization of the micronucleus test. **Results:** The mean of micronuclei in the group exposed only to CCl₄ was 4.00. In groups exposed to CCl₄ and *Bidens pilosa* (oral and / or topical) and exposed only to *Bidens pilosa* and not exposed to CCl₄ group was 0.00. In the group exposed to cyclophosphamide was 9.00. There was no statistically significant difference between groups A and C (p > 0.05), but they differed significantly from the other groups (p < 0.05). **Conclusion:** The *Bidens pilosa* in oral and topical given anti-mutagenic effect of exposure to carbon tetrachloride.

Keywords: *Bidens pilosa*, micronucleus test, carbon tetrachloride, genotoxicity, mutagenicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - <i>Bidens pilosa</i>	13
FIGURA 2 - Peso corporal dos animais no início e final do experimento.	16
FIGURA 3 - Contagem de micronúcleos por grupo estudado (mediana e interquartis)	17
FIGURA 4 - Eritrócito policromático com um micronúcleo (seta) – animal exposto somente ao CCL ₄ (Coloração de Giemsa, aumento de 1000x).....	17
FIGURA 5 – Tratamento tópico.	21
FIGURA 6 – Delineamento experimental do estudo.....	22

SUMÁRIO

1 ARTIGO.....	10
ANEXOS	27

1 ARTIGO

Efeito antimutagênico da *Bidens pilosa* frente à exposição ao tetracloreto de carbono

Antimutagenic effect of *Bidens pilosa* face the exposure to carbon tetrachloride

Título resumido: Efeito antimutagênico da *Bidens pilosa*

Fernanda de Maria Serra¹, Gisele Alborghetti Nai², Cristiane Martinez Ruiz Pegoraro³, Leonardo Alves Garcia⁴, Juliana Apolônio Alves⁴, Pedro Henrique Nahas Chagas⁴, Gabrielle Gomes dos Santos Ribeiro⁵, Décio Gomes de Oliveira⁶.

¹*Biomédica, discente de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.*

²*Doutora, médica, professora do Departamento de Patologia e do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.*

³*Mestre, Bióloga, discente de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, professora do Departamento de Farmacologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.*

⁴*Discente de graduação em Medicina, Faculdade de Medicina de Presidente Prudente (FAMEPP), Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.*

⁵*Mestre, Estatístico, docente da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.*

⁶*Doutor, farmacêutico, professor, Faculdade de Farmácia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.*

Correspondência: Gisele Alborghetti Nai, Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rua José Bongiovani, 700, 19050-680, Presidente Prudente, SP, Brasil. Phone: +55-18-3229-1059. Fax: +55-18-3229-1194. E-mail: patologia@unoeste.br.

Artigo formatado segundo as normas da revista *The Plant*.

RESUMO

A *Bidens pilosa* (BP) é uma planta medicinal composta em abundância por flavonoides e poliacetileno, que atuam no organismo com efeitos antitumorais e antioxidante. Avaliar se o tratamento com BP (tópico e oral) tem efeito antimutagênico sobre células da medula óssea mediante exposição ao tetracloreto de carbono (CCl_4). Utilizaram-se 64 ratos Wistar, machos, divididos em 7 grupos: A (n=10): CCl_4 apenas; B (n=10): CCl_4 + extrato aquoso oral de BP; C (n=10): CCl_4 e BP tópica (banho diário/ 1 minuto); D (n=10): CCl_4 e extrato aquoso oral e tópico (banho diário/ 1 minuto) de BP; E (n=8): extrato aquoso oral de BP; F (n=8): óleo de oliva; G (n=8): ciclofosfamida, dose única subcutânea (50mg/kg). A dose utilizada de CCl_4 e de óleo de oliva foi de 1ml de solução/Kg de peso intraperitoneal 2 vezes/semana e a de BP oral foi 0,5ml/100g de peso por gavagem diariamente por 10 semanas. Os animais do grupo G foram eutanasiados 24 horas após a aplicação. Retiraram-se as células da medula óssea do fêmur para o teste do micronúcleo. A mediana de micronúcleos do grupo A foi de 4,00. No grupo G foi de 9,00. Nos demais grupos, de 0,00. Não houve diferença estatística entre os grupos A e G ($p>0,05$), porém estes diferiram dos demais grupos ($p<0,05$). A *Bidens pilosa* (oral e tópica) conferiu efeito antimutagênico a exposição ao CCl_4 .

Palavras-chave: *Bidens pilosa*, teste para micronúcleos, tetracloreto de carbono, genotoxicidade, mutagenicidade.

SUMMARY

Bidens pilosa (BP) is a medicinal plant with an abundance of flavonoids and polyacetylene, which has in the body with anti-tumor and antioxidant effects. To evaluate whether treatment with BP (topical and oral) has antimutagenic effect on bone marrow cells exposed to carbon tetrachloride (CCl₄). We used 64 male Wistar rats divided into 7 groups: A (n = 10): CCl₄ only; B (n = 10): CCl₄ + oral aqueous extract of BP; C (n = 10): CCl₄ and topical BP (daily shower / 1 minute); D (n = 10): CCl₄ and oral and topical aqueous extract (daily bath / 1 minute) BP; E (n = 8): oral aqueous extract of BP; F (n = 8): olive oil; G (n = 8): cyclophosphamide, subcutaneous single dose (50mg / kg). The dose of CCl₄ and olive oil was 1 ml solution / kg intraperitoneally 2 weight times / week and oral BP dose was 0.5ml / 100g by gavage daily for 10 weeks. The animals in group G were euthanized 24 hours after application. Cells were removed from the femoral bone marrow to perform micronucleus test. The median of micronucleus in group A was 4.00. In the group G was 9.00. In the other groups was 0.00. There was no statistical difference between groups A and G (p > 0.05), but these differed from the other groups (p < 0.05). *Bidens pilosa* (oral and topical) gave antimutagenic effect to exposure to CCl₄.

Keywords: *Bidens pilosa*, micronucleus test, carbon tetrachloride, genotoxicity, mutagenicity.

INTRODUÇÃO

A população tem recorrido cada vez mais ao uso de plantas medicinais como método alternativo a tratamento devido ao aumento do número de doenças e ao alto custo dos medicamentos. Isso gera muitas dúvidas em relação à ação farmacológica das plantas medicinais e também aos efeitos tóxicos que a medicina alternativa pode trazer consigo. As plantas medicinais, também, tem atraído a atenção de pesquisadores como uma alternativa à terapia do câncer, devido a sua baixa toxicidade e baixo custo (Nakama *et al.*, 2011).

Considerada uma planta invasora, a *Bidens pilosa* (Asteraceae) é um fitoterápico reconhecido pelo Ministério da Saúde e popularmente denominado *Picão* (GISD, 2010) (Figura 1). É originária da América do Sul e encontrada em diversos países tropicais e subtropicais. Tem sido utilizada no tratamento de diversas patologias, como distúrbios imunológicos, doenças infecciosas, síndromes metabólicas, cânceres, entre outras (Bartolome, Villaseñor and Yang, 2013; Mahmoud, Gairola and El-Keblawy, 2015), por apresentar efeito analgésico e antiinflamatório (Fotso *et al.*, 2014).



Figura 1. *Bidens pilosa*. Fonte: Próprio autor

Vários estudos têm sido realizados com a finalidade de investigar as utilidades da *Bidens pilosa* e sua atividade farmacológica, e estes apontam os flavonoides e poliacetilenos como compostos abundantes desta planta, que atuam

no organismo com efeitos antitumorais, antioxidante e antimicrobianos (Pio *et al.*, 2015).

A *Bidens pilosa* é uma erva muito utilizada na forma de chá para combater icterícia e hepatite. Na icterícia a terapia pode ser de duas maneiras: uso interno, em que o chá é ingerido, ou uso externo, em que o chá é utilizado para banho ou tópico. Até o momento, não foi encontrada ação tóxica pelo uso da planta, porém, assim como qualquer planta ou medicamento, deve ser consumida sem excesso (Luchesi, Beretta and Dupas, 2010).

O tetracloreto de carbono (CCl_4), um produto químico que não ocorre naturalmente, é límpido, com cheiro doce e frequentemente encontra-se no ar como gás incolor; não é inflamável e possui difícil dissolução em água. Foi utilizado como composto de fluido de refrigeração, propulsores para aerossóis, pesticidas, extintores de incêndios, removedores de manchas e outros produtos de limpeza. O uso nesses produtos foi suspenso e proibido devido aos efeitos nocivos e atualmente possui apenas algumas aplicações industriais (ATSDR, 2005).

Estudos realizados em seres humanos não foram capazes de determinar a carcinogenicidade do tetracloreto de carbono, pois houve exposição conjunta a outros produtos químicos; no entanto, animais expostos ao tetracloreto de carbono desenvolveram tumores na glândula suprarrenal (ATSDR, 2005). O tetracloreto de carbono (CCl_4) encontra-se na lista de agentes cancerígenos da Agência Internacional de Investigação do Câncer (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), compondo o Grupo 2B de “possivelmente carcinogênico para humanos” (IARC, 1987).

Os genes contidos na molécula de DNA são responsáveis pela transmissão de informações genéticas que podem ser danificados quando expostos a agentes com propriedades genotóxicas ou mutagênicas, devido à instabilidade da molécula de DNA. Esses agentes causam danos ao DNA e/ou comprometem genes responsáveis pelo mecanismo de reparação do mesmo, o que resulta em uma célula alterada (Scherer *et al.*, 2013). A mutação é uma consequência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial no processo pela qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (Fenech *et al.*, 1999).

O teste do micronúcleo é um ensaio utilizado para a avaliação de danos mutagênicos permanentes no DNA. A técnica é realizada através da coleta e posterior coloração do material, observando em microscópio óptico a formação de

micronúcleos em eritrócitos policromáticos. O micronúcleo é a quebra da cromatina separada do núcleo principal, delimitada por uma membrana nuclear (Krishna and Hayashi, 2000).

Segundo Gonçalves (2012), “Pesquisas por agentes que possam reduzir a frequência de alterações no DNA têm se mostrado promissoras e com importantes implicações nas práticas terapêuticas devido à possibilidade da redução da taxa de mutações e conseqüente diminuição na incidência de câncer. Dentre estes agentes, estão as plantas com potencialidade medicinal. Sua utilização remonta séculos e a popularidade das mesmas está conectada ao fácil acesso, eficácia terapêutica, baixo custo relativo e impressão de total ausência de efeitos tóxicos. Entretanto, recentemente a segurança de alguns destes compostos fitoterápicos têm sido questionada, devido a relatos de toxicidade e fatalidades.”

A hipótese deste estudo é que se a *Bidens pilosa* podendo ser usada como hepatoprotetora em casos de exposição ao tetracloreto de carbono, também, possa conferir proteção contra mutagenicidade deste agente químico.

O objetivo deste estudo foi avaliar se o tratamento tópico e por via oral com *Bidens pilosa* pode ter efeito anti-mutagênico sobre as células da medula óssea em animais expostos ao tetracloreto de carbono, além de avaliar se a *Bidens pilosa* pode ou não ter efeito mutagênico quando ingerida.

RESULTADOS

Mortalidade

Nove animais morreram durante o experimento, dois do grupo A, 1 do grupo B, 4 do grupo C, 1 do grupo D e 1 do grupo F. As causas de óbito dos animais dos grupos A, B, C e D foram relacionadas a exposição ao CCl₄ (edema pulmonar e necrose hepática maciça) (Akbaratabar Toori *et al.*, 2015) e do animal do grupo F foi devida a broncopneumonia.

Peso corporal

A média do peso corporal e inicial dos animais em cada grupo de estudo está representado na Figura 2. Não houve diferença estatística entre os grupos estudados em relação ao peso final nem ao inicial ($p>0,05$).

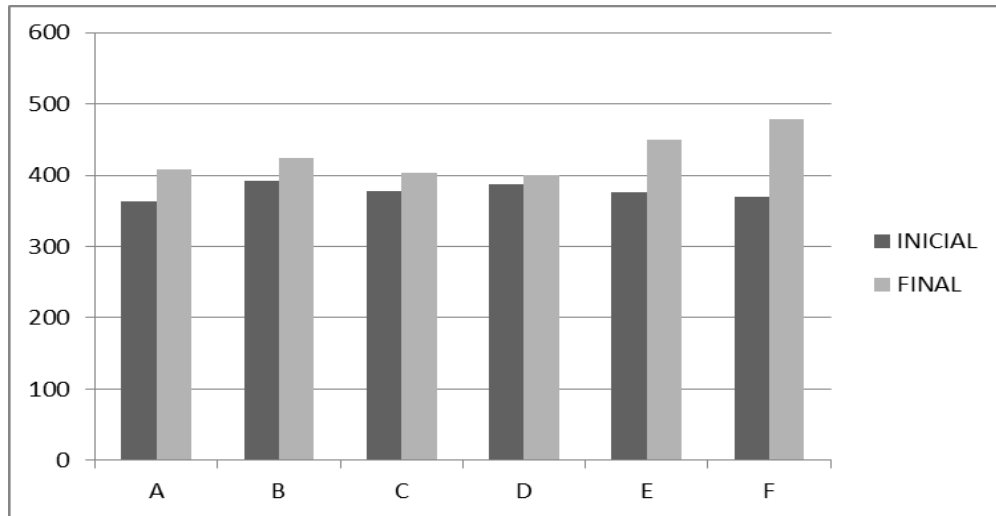


Figura 2. Média do peso corporal inicial e final dos animais em cada grupo de estudo.

Teste do micronúcleo

A mediana de micronúcleos no grupo exposto somente ao CCl_4 foi de 4,00. Nos grupos expostos ao CCl_4 e *Bidens pilosa* (oral e/ou tópica) foi de 0,00, assim como no grupo exposto apenas a *Bidens pilosa* e no grupo não exposto ao CCl_4 e a *Bidens pilosa* (grupo controle negativo). No grupo exposto a ciclofosfamida (controle positivo), foi de 9,00 (Figuras 2 e 3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos A e G ($p > 0,05$), porém estes diferiram estatisticamente dos demais grupos ($p < 0,05$).

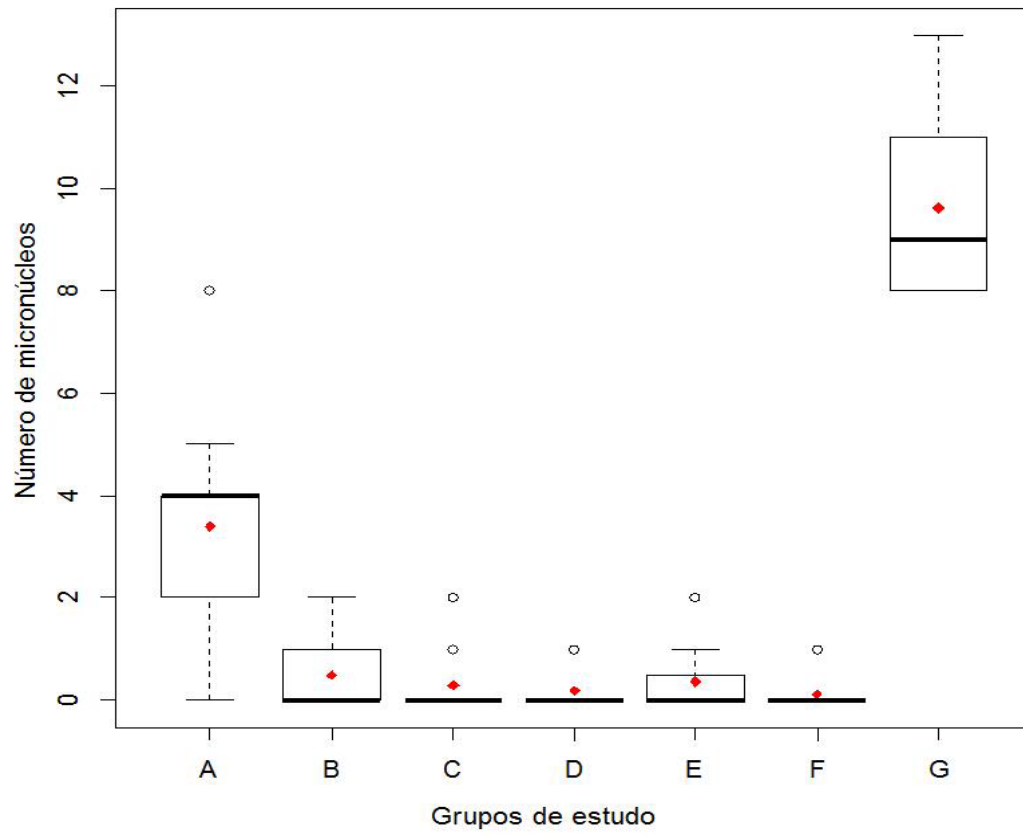


Figura 3. Contagem de micronúcleos por grupo estudado (mediana e interquartil).^o: *outlier*, [■]: média de micronúcleos por grupo estudado. Grupos – A: CCL₄; B: CCL₄ + BP oral; C: CCL₄ +BP tópica; D: CCL₄ + Bp oral + BP tópica; E: BP oral; F: controle negativo; G: controle positivo.

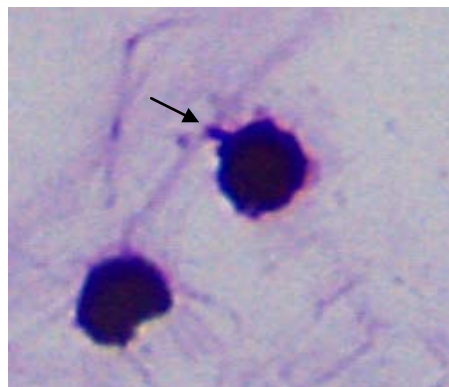


Figura 4. Eritrócito policromático com um micronúcleo (seta) – animal exposto somente ao CCL₄ (Coloração de Giemsa, aumento de 1000x).

DISCUSSÃO

Não é apenas a presença de componente químico que determina uma planta como medicinal. A espécie deve possuir propriedades farmacológicas, preparo adequado e dosagem ideal para aliviar sintomas ou prevenir alguma doença ou patologia (Coam and Matias, 2014). A *Bidens pilosa* é uma planta com enorme diversidade fitoquímica, que tem sido utilizada ao longo dos anos como tratamento de mais de 40 patologias, tais como inflamação, distúrbios imunológicos, doenças digestivas, doenças infecciosas, tumores, síndrome metabólica, feridas, doenças hepáticas, entre outras. Devido a grande diversidade de uso, o interesse por essa planta cresceu mundialmente e vários estudos já foram realizados nos mais diversos locais para identificar e comprovar suas utilidades, tais como África, Ásia, Oceania e Estados Unidos (Bartolome, Villasenõr and Yang, 2013; Pio, 2015).

A Genética Toxicologia é uma área que visa o estudo de processos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênico através de ensaios que avaliam o dano de agentes mutagênicos tanto em moléculas de DNA, como alterações a níveis celulares e orgânicos (Sampaio *et al.*, 2012). Várias técnicas podem ser utilizadas para testes de genotoxicidade e mutagenicidade, tais como: coeficiente DNA/proteína, atividade de enzimas mitocondriais, proliferação celular, quebras e reparo de DNA, índices mitóticos, identificação de danos, aberrações cromossômicas, não disjunções, detecção de apoptose e necrose (Evans, 1997). Dentre os principais testes estão: Teste de Ames, Eletroforese para célula única em gel (SCGE) ou “Teste do Cometa” e o Teste do micronúcleo. O “teste do micronúcleo” foi sugerido pela primeira vez em 1970, por Boller e Schmid e posteriormente por Heddle em 1977 (Evans, 1997). O teste de micronúcleo possui como vantagens a análise mais simples quando comparadas a outros testes, serve para diagnóstico de doenças e monitoramento ambiental de exposição a agentes químicos e físicos, alta sensibilidade e precisão (Fenech *et al.*, 1999). Por isso, neste estudo a escolha deste como teste de mutagenicidade.

O potencial mutagênico da *Bidens pilosa* foi avaliado no estudo de Costa *et al.* (2008). Na avaliação pelo Teste do cometa, demonstrou-se que esta planta apresenta genotoxicidade sendo que o decocto apresentou genotoxicidade menor que o infuso, sugerindo que a forma de preparo do chá interfere em sua composição química. No entanto, quando as soluções foram testadas pelo Teste do micronúcleo,

não houve diferença dos resultados quando comparados ao controle negativo (Costa *et al.*, 2008). Isto pode ocorrer devido à alteração que é detectada no DNA por cada um dos testes. O Teste do cometa detecta lesões primárias e frequentemente reparáveis, enquanto o Teste do micronúcleo detecta lesões irreparáveis (Valentin-Severin *et al.*, 2003). No presente estudo, o chá de *Bidens pilosa* foi realizado na forma de infuso, que é a forma mais comum de preparo pela população em geral, e também não houve diferença estatística entre o grupo que ingeriu o chá e o grupo controle negativo, mostrando que a *Bidens pilosa* não acarreta lesões irreparáveis ao DNA.

O estudo de Kwiecinski *et al.* (2008), mostrou efeito antitumoral *in vivo* da *Bidens pilosa*, no tratamento do carcinoma ascítico de Ehrlich, inoculado intraperitonealmente em ratos, sendo observada redução significativa do volume tumoral e circunferência abdominal e aumento do tempo médio de sobrevivência dos ratos tratados com esta planta. O estudo de Nakama *et al.*, (2011), além de demonstrar efeito anti-tumoral da *Bidens pilosa* em células de leucemia de linfócitos T de adultos em estudo “*in vitro*”, mostrou que esta planta tem efeito citotóxico potente para estas células tumorais e mínimo para células normais, tornando esta um potencial agente quimioprotetor ou de tratamento para este tipo de leucemia. No presente estudo, avaliou-se a possibilidade de efeito antimutagênico da *Bidens pilosa*, o evento inicial da carcinogênese química, e esta demonstrou apresentar este efeito frente à exposição química ao tetracloreto de carbono. Assim, o presente trabalho reforça a possibilidade da *Bidens pilosa* ser usada como um agente quimioprotetor.

Os resultados do presente estudo mostram que o extrato aquoso da *Bidens pilosa* não apresentou efeito mutagênico ao ser ingerido, e tanto em uso tópico, quanto oral conferiu efeito antimutagênico a exposição ao tetracloreto de carbono na avaliação pelo teste do micronúcleo.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Aprovação ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Oeste Paulista (CEUA – UNOESTE) (Protocolo nº 2480) (Anexo 1).

Protocolo animal

Para este estudo, foram utilizados 64 ratos Wistar albinos (*Ratus Norvegicus albinus*), adultos, (90 dias), machos, com peso entre 200 a 250g. Os ratos foram mantidos em caixas individuais, em biotério climatizado em umidade ($50\pm 15\%$) e temperatura ($25\pm 2^\circ\text{C}$) e com fotoperíodo normal (12 horas de claro e escuro) controlados.

Protocolo de tratamento com *Bidens pilosa*

A *Bidens pilosa* foi coletada pelos autores na sua ocorrência natural e autenticada pelo Dr. Décio Gomes de Oliveira, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil, o qual depositou o espécime no Herbário do Departamento de Farmacobotânica e Farmacognosia do Curso de Farmácia da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) sob o número FBG 02.02.2016 (Anexo 2).

Extrato aquoso da *Bidens pilosa*:

O chá de *Bidens pilosa* foi preparado por infusão: em 1000mL de água ultrapurificada à temperatura de 96°C foram adicionadas 50g da planta previamente picada, com exceção das raízes, mantidas em repouso por 45 minutos, procedendo-se a uma filtração simples (Costa, 2008).

Tratamento tópico com *Bidens pilosa*:

Os animais foram imersos em uma caixa de vidro que continha o extrato aquoso de *Bidens pilosa*. A imersão do animal foi de 90% do seu corpo, de forma que apenas a cabeça e o rabo do animal ficassem para fora. O banho foi realizado durante as 10 semanas, diariamente, durante um minuto.



Figura 5. Tratamento tópico com *Bidens pilosa*.

Tratamento oral com *Bidens pilosa*:

Os animais submetidos a este tratamento receberam o extrato aquoso (0,5ml/100g de peso) por gavagem (Suzigan *et al.*, 2009), durante as 10 semanas de tratamento, diariamente.

Protocolo de tratamento com CCl₄

O Tetracloreto de carbono (CCl₄) (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, Brasil) foi dissolvido em óleo de oliva (solução de 1:1) e aplicado duas vezes por semana, durante 10 semanas. A aplicação foi feita em 1ml da solução de CCl₄ por cada quilo de peso. (adaptado de Akbartabar Toori *et al.*, 2015).

Os animais foram divididos em 7 grupos (Figura 4):

- A – Grupo CCl₄: Protocolo de tratamento com CCl₄.
- B – Grupo CCl₄ + *Bidens pilosa* oral: Protocolo de tratamento com CCl₄ e tratamento oral com *Bidens pilosa*.
- C – Grupo CCl₄ + *Bidens pilosa* tópica: Protocolo de tratamento com CCl₄ e tratamento tópico com *Bidens pilosa*.
- D – Grupo CCl₄ + *Bidens pilosa* oral e tópica: Protocolo de tratamento com CCl₄ e tratamento oral e tópico com *Bidens pilosa*.
- E – *Bidens pilosa* oral: Tratamento oral com *Bidens pilosa*.

- F – Grupo controle negativo: 8 ratos, os quais receberam 1ml de óleo de oliva por cada quilo de peso via intraperitoneal, duas vezes por semana, por 10 semanas (adaptado de Akbartabar Toori *et al.*, 2015).
- G – Grupo controle positivo: 8 ratos que receberam ciclofosfamida (Genuxal, Baxter Oncology GmbH, Halle/Westfalen, Alemanha) em dose única subcutânea (50mg/kg) no primeiro dia do experimento (Mac Gregor, 1987).

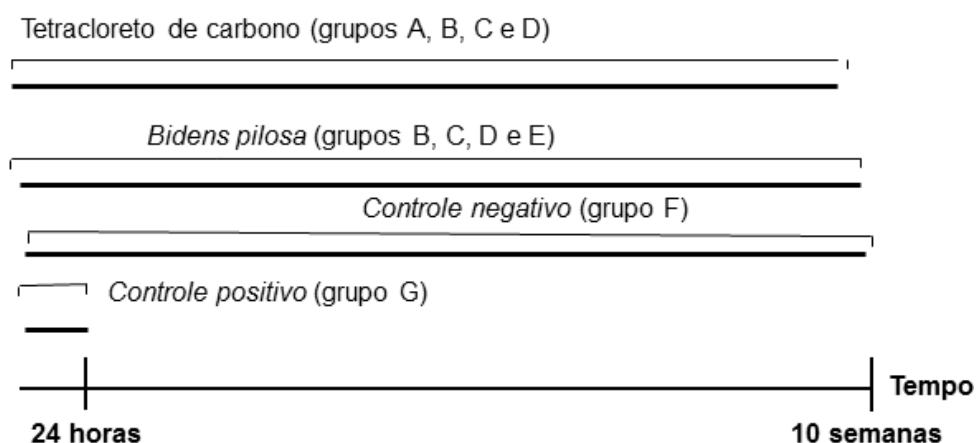


Figura 6. Delineamento experimental do estudo.

Os animais dos grupos C e D que receberam o chá de *Bidens pilosa* de uso tópico, mediante banho diário, tiveram o pelo tricotomizado em 80% da superfície corporal para melhor absorção do chá.

Animais de todos os grupos receberam água e ração *ad libitum* durante todo o experimento. Os ratos dos grupos A, B, C, D, E e F foram eutanasiados 10 semanas após o início do experimento (Akbartabar Toori *et al.*, 2015). Os ratos do grupo G foram eutanasiados com 24 horas após o início do experimento (Mac Gregor, 1987). A eutanásia foi realizada com Tiopental sódico (Syntec, EUA), na dose de 100 mg/Kg de peso, administrado via intraperitoneal. Os indicativos de morte foram: ausência de movimentos respiratórios, ausência de batimentos cardíacos e perda dos reflexos (Paiva *et al.*, 2005).

Teste do micronúcleo

Para o teste do micronúcleo foi coletado o fêmur de cada animal após a eutanásia, retirada a porção proximal e distal do osso para a lavagem do canal medular com solução fisiológica, de forma que o material da medula óssea ficasse no interior de um ependorf de 2 ml. Esse material foi centrifugado a 1500 rpm, durante cinco minutos para a lavagem. Foi desprezado o sobrenadante e adicionado mais 2ml de solução fisiológica no frasco; esse material foi homogeneizado e acrescentado uma gota da solução em cada lâmina para o preparo do esfregaço. Foram preparadas duas lâminas por animal (Mac Gregor, 1987). As lâminas foram coradas pelo corante de Giemsa (Dolles, São Paulo, Brasil). Para determinação do número de micronúcleos foram contados 2000 eritrócitos policromáticos por animal (1000 em cada lâmina) utilizando-se microscópio óptico, no aumento de 400x (Mac Gregor, 1987). Micronúcleos foram considerados como uma estrutura com a membrana circundante, menores de um terço do diâmetro do núcleo associado, semelhante na intensidade de coloração e microscopia no mesmo plano focal do núcleo associado (Tolbert *et al.*, 1992). A análise das lâminas foi cega e realizada por um avaliador (GAN).

Análise estatística

A variável frequência de micronúcleos não apresentou normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($p= 1,52e^{-17}$) e o teste de Levene apresentou não-homogeneidade das variâncias ($p=0,001$), portanto, optou-se pelo uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para comparação múltipla entre os grupos. Os testes estatísticos foram realizados ao nível de significância de 5%.

REFERÊNCIAS

- Akbaratabar Toori, M., Joodi, B., Sadeghi, H., Sadeghi, H., Jafari, M., Talebianpoor, M.S., Mehraban, F., Mostafazadeh, M., Ghavamizadeh, M.** (2015) Hepatoprotective activity of aerial parts of *Otostegia persica* against carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Avicenna J Phytomed.* 5 (3), 238-246.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry.** (2005) Toxicological Profile for Carbon Tetrachloride. Georgia, U.S.A. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp30-c3.pdf>> Acesso em 30 maio 2016.
- Bartolome, A.P., Villaseñor, I.M., Yang, W.C.** (2013) *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): Botanical Properties, Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013, ID 340215.
- Coam, M.C., Matias, T.** (2014) The use of medicinal plants by indigenous community Ventarra Alta- RS. *Revista de Saúde e Biologia.* 9 (1), 11-19.
- Costa, R.J., Diniz, A., Mantovani, M.S., Jordão, B.Q.** (2008) In vitro study of mutagenic potencial of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. *Journal of Ethnopharmacology.* 118 (1), 86-93.
- Evans, H.J.** (1997) Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutat Res.* 392, 5-10.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S.** (1999) The Human MicroNucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res.* 428, 271–83.
- Fotso, A.F., Longo, F., Djomeni, P.D.D., Kouam, S.F., Spiteller, M., Dongmo, A.B., Savineau, J.P.** (2014) Analgesic and antiinflammatory activities of the ethyl acetate fraction of *Bidens pilosa* (Asteraceae). *Inflammopharmacology.* 22(2), 105-114.
- GISD. Global Invasive Species Database.** (2010) Invasive Species Specialist Group (ISSG). *International Union for Conservation of Nature (IUCN) Species Survival Commission.* Disponível em: <<http://issg.org/database/welcome/>> Acesso em 30 maio 2016.
- Gonçalves, A.L.M.** (2012) Investigação do potencial genotóxico e antígenotóxico do extrato de *Brassica oleracea* in vivo. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biologia geral e aplicada – área de concentração: Biomoléculas). Instituto de Biociências, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Botucatu, 51
- IARC. International Agency For Research On Cancer.** (1987) Carbon Tetrachloride. IARC Monographs. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol71/mono71-17.pdf>> Acesso em 30 maio 2016.

Krishna, G. and Hayashi, M. (2000) In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*. 455, 155-166.

Kviecinski, M.R., Felipe, K.B., Schoenfelder, T., De Lemos Wiese, L.P., Rossi, M.H., Gonçalves, E., Felicio, J.D., Filho, D.W., Pedrosa, R.C. (2008) Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 117(1), 69-75.

Luchesi, B.M., Beretta, M.I.R., Dupas, G. (2010) Conhecimento e uso de tratamentos alternativos para icterícia neonatal. *Cogitare Enfermagem*. 15(3), 506-512.

Mac Gregor, J.T. (1987) Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*. 189(2), 103-12.

Mahmoud, T., Gairola, S., El-Keblawy, A. (2015) *Parthenium hysterophorus* and *Bidens pilosa*, two new records to the invasive weed flora of the United Arab Emirates. *Journal on New Biological Reports (JNBR)*. 4(1), 26 – 32.

Nakama, S., Ishikawa, C., Nakachi, S., Mori, N. (2011) Anti-adult T-cell leukemia effects of *Bidens pilosa*. *International Journal of Oncology*. 38, 1163-1173.

Paiva, F.P., Mafilli, V.V. and Santos, A.C.S. (2005). Curso de manipulação de animais de laboratório. Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz. Disponível em: <http://www.bioteriocentral.ufc.br/arquivos/apostilha_> Acesso em 05 Maio 2015.

Pio, I.D.S.L., Valeriano, A.C.F.R., Damasceno, C.M., Dantas, M.G.B., Almeida, J.R.G.S. (2015) Atividades farmacológicas de *Bidens pilosa*: uma revisão descritiva da literatura. *Revista Interdisciplinar de Pesquisa e Inovação*. 1(1), 1-11.

Sampaio, J., Treméa, R., Marco, M.G., Vieira, R.B., Tacca, J.A., Stroher, D.J., Pilar, B.C., Güllich, A.A.C., Schwanz, M., Mandredini, V. (2012) Estudo da genotoxicidade in vitro e in vivo após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.- Hil. obtidos por infusão. *Rev Bras Biocienc.* 10(4), 462-467.

Scherer, K., Guimarães, S.A.A.G. (2013) Padronização do teste cometa para análise de genotoxicidade como atividade de ensino para graduação na área da saúde. *Revista Destaques Acadêmicos*. 5 (3), 49-60.

Suzigan, M.I., Battochio, A.P., Coelho, K.L., Coelho, C.A. (2009) An aqueous extract of *Bidens pilosa* L. protects liver from cholestatic disease: experimental study in Young rats. *Acta Cir Bras*. 24(5), 347-52.

Tolbert, P.E., Shy, C.M., Allen, J.W. (1992) Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*. 271, 69-77.

Valentin-Severin, I., Le Hegarat, L., Lhuguenot, J.C., Le Bon, A.M., Chagnon, M.C. (2003) Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening:

comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutation Research*. 536, 79–90.

ANEXOS

Anexo 1 - Aprovação do Trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

07/05/2015

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITO DA BIDENS PILOSA SOBRE ICTERÍCIA, HEPATOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE", cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) sob o número nº 2480 e tendo como participante(s) GISELE ALBORGHETTI NAI (responsável), DÉCIO GOMES DE OLIVEIRA (docente), MARCOS ALBERTO ZOCOLER (docente), CRISTIANE MARTINEZ RUIZ PEGORARO (discente), FERNANDA DE MARIA SERRA (discente), JULIANA APOLONIO ALVES (discente), LEONARDO ALVES GARCIA (discente), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Presidente Prudente, 7 de Maio de 2015.

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPqProf. Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

Anexo 2 – Certificação da *Bidens pilosa* utilizada no estudo



UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

Portaria nº88/87 - D.O.U. 16/02/1987 - mantida pela
ASSOCIAÇÃO PRUDENTINA DE EDUCAÇÃO E CULTURA – APEC
Rua José Bongiovani nº 700 – Cidade Universitária
19050-680 – Presidente Prudente/SP - (018) 3229-1000

Herbário “Curso de Farmácia – Departamento de Farmacognosia e farmacobotânica” Presidente Prudente/SP – Brasil **Plantas Medicinais**

Amostra recebida em 02 de fevereiro de 2015, desidratada e organizada em exsicata e com fotos tiradas no ato da coleta para a identificação e depósito conforme solicitação feita previamente.

Laudo emitido com a identificação taxonômica no dia 10 de junho de 2016 sob o cadastro de número FBG 02.02.2016 e depósito da exsicata sob o mesmo número no Departamento de Farmacognosia e Farmacobotânica do Curso de Farmácia da UNOESTE.

Família: *Asteraceae*

Nome Científico: *Bidens pilosa* L.

Nome popular: Picão preto.

Município: Presidente Prudente/SP; Região: Região Sudeste
Latitude: 22° 07' 32" S; Longitude: 51° 23' 20" W; Altitude: 475m
Área: 563,6 Km².

Local da coleta e da produção da *Bidens pilosa* L. Campus II da Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE;

Planta anual medindo de 40 a 130 cm; ramos são eretos, nós levemente pilosos. Pecíolo 1-3(-4,5) cm, lâmina 7-12,5 × 4-10,5 cm, pinatissecta (recortado) com 3 segmentos lanceolados, margem serreada e pilosa em ambas as faces. A Inflorescência em tirso (cacho). Invólucro 4,8-6 mm; brácteas involucrais externas 8, linear-espatuladas, glabras, ápice agudo a curto-acuminado. Corola amarela ou branca.

Oliveira, DG, 10/06/2016