

# Efeito do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* na mutagênese “*in vivo*”, e avaliação antimicrobiana, e interferência no crescimento e diferenciação celular “*in vitro*”

## *Effect of the hydroalcoholic extract of Pyrostegia venusta on in vitro mutagenesis, antimicrobial assessment, in vitro growth and cell differentiation*

Adriana Ponciano Fernandes<sup>1</sup>, Grazielle Esteves Ribeiro<sup>2</sup>, Luciana Rosa Alves Rufino<sup>1</sup>, Lucimara Maria da Silva<sup>3</sup>, Marcelo Fabiano Gomes Boriollo<sup>3</sup>, Nelma de Mello Silva Oliveira<sup>1</sup>, João Evangelista Fiorini<sup>1</sup>

### RESUMO

Analisa-se a atividade antibacteriana e antifúngica, o crescimento, a diferenciação celular e a ação mutagênica do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* (cipó-de-são-joão) em *Herpetomonas samuelpessoai*. As atividades antimicrobianas foram analisadas por intermédio de métodos de difusão em ágar e macrodiluição. O crescimento e a diferenciação celular de *H. samuelpessoai* foram realizados em meio quimicamente definido a 28°C/48 h e analisados quantitativa (câmara de Neubauer) e qualitativamente (formas pró/para/opistomastigota) após coração panótica. A avaliação mutagênica foi realizada pelo teste do micronúcleo em eritroblastos de camundongos *Swiss albinus* após tratamentos via gavagem (1.000-2.000mg/kg) e decorridos os tempos de 24-48 h. Os resultados mostraram: a) ausência de atividade antimicrobiana para todas as cepas testadas, isto é, *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *E. aerogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *M. luteus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *C. albicans*, *C. neoformans* e *S. cerevisiae*, independentemente das concentrações (72,6-145,2 mg/mL); b) ausência de efeitos sobre o crescimento e a diferenciação celular de *H. samuelpessoai*; c) ausência de efeitos potencialmente clastogênico e/ou aneugênico, independentemente de sexo, tempo e dosagem. Esses dados sugerem que o extrato de *Pyrostegia venusta* é seguro, podendo ser administrado por via tópica e oral, uma vez que não apresenta potencial carcinogênico/mutagênico. Pelas condições propostas o mesmo não deve ser usado como antimicrobiano.

**Palavras-chave:** Produtos com Ação Antimicrobiana; Mutagênese; Diferenciação Celular; *Pyrostegia venusta*.

### ABSTRACT

*This study analyzes antibacterial and antifungal activities, growth, cell differentiation and mutagenic effect of the hydroalcoholic extract of Pyrostegia venusta on Herpetomonas samuelpessoai. The antimicrobial activities were analyzed using agar diffusion and macrodilution methods. H. samuelpessoai growth and cell differentiation were performed in a chemically defined environment at 28°C/48h and analyzed both quantitatively (Neubauer chamber) and qualitatively (pro/para/opisthomastigote forms) after panoptical coloration. The mutagenic assessment consisted of micronucleus test of Swiss albinus mice's eritroblastes 24-48 hours after gavage treatment (1,000-2,000 mg/kg). The results pointed to: a) No antimicrobial activity for all the tested strains, namely: B. cereus, B. stearothermophilus, B. subtilis, E. aerogenes, E. coli, K. pneumoniae, M. luteus, P. mirabilis, P. aeruginosa, S. typhimurium, S. aureus, S. epidermidis, S. pyogenes, S. salivarius, C. albicans, C. neoformans, and S. cerevisiae, irrespective of concentration (72.6-145.2 mg/*

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS. Alfenas, MG – Brasil.

<sup>2</sup>Acadêmico do Curso de Biomedicina da Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS. Alfenas, MG – Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Genética da Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS. Alfenas, MG – Brasil.

Recebido em: 15/09/2010  
Aprovado em: 25/05/2011

Instituição  
Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS  
Alfenas, MG – Brasil.

Endereço para correspondência:  
Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos – Unifenas  
Rodovia MG – 179, KM 0  
Cep: 37130-000  
Alfenas, MG – Brasil.  
E-mail: microrganismo@unifenas.br

mL); b) no effects on *H. samuelpessoai* cell growth and differentiation; c) no potentially clastogenic and/or aneugenic effects, irrespective of sex, duration, and dosage. These results suggest that the *Pyrostegia venusta* extract is safe and can be administered both topically and orally, as it has no carcinogenic/mutagenic potential. Given the proposals conditions, the extract should not be used as a antimicrobial product.

**Key words:** Antimicrobial Products; Mutagenesis; Cell Differentiation; *Pyrostegia venusta*.

## INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico representa instituição generalizada na Medicina popular brasileira. Os conhecimentos acumulados ao longo do tempo, entretanto, evidenciam que seu efeito nem sempre é benéfico, podendo promover efeitos nocivos. A fitoterapia é muito usada na automedicação e, devido à facilidade do acesso, pode agravar seus riscos potenciais.<sup>1,2</sup>

Os tripanosomatídeos do gênero *Herpetomonas* têm sido amplamente empregados como modelos experimentais em estudos da Biologia e Fisiologia dos protozoários. As vantagens de se trabalhar com tais organismos incluem a facilidade de manuseio, ausência de riscos de contaminação e a relativa simplicidade com que eles se desenvolvem em meios artificiais.<sup>3-5</sup>

Apesar de a utilização de tripanosomatídeos como modelos para o estudo de ação de drogas sintéticas ser bastante investigada no meio científico, ainda é pouco explorado seu uso em testes com extratos vegetais e, conseqüentemente, quais efeitos exercem em nível celular *in vitro*.<sup>6</sup>

O método do micronúcleo baseia-se na análise da frequência de danos ocorridos ao DNA, os quais são resultantes de mitoses ou meioses celulares que, em contato com agentes clastogênicos e aneugênicos, podem gerar a perda de fragmentos ou de cromossomos inteiros, formando, assim, os micronúcleos.<sup>7,8</sup>

A *Pyrostegia venusta* é uma planta da família *Bignoniaceae* popularmente conhecida como cipó-de-são-joão, encontrada, frequentemente, dispersa em campos, margens de estradas e cercas de pastagens.<sup>9</sup> Suas flores são usadas na Medicina popular para tratamento de manchas brancas no corpo (leucoderma, vitiligo) e como tônico antidiarreico.<sup>10, 11</sup>

Não existem relatos na literatura relacionados a pesquisas sobre a atividade antimicrobiana e mutagênica dessa planta, assim como efeitos em sistemas eucarióticos unicelulares *in vitro*. Desta forma, o pre-

sente artigo mostra os resultados sobre a ação antimicrobiana do extrato de folhas de *Pyrostegia venusta*, seu efeito no crescimento e na diferenciação celular de *H. samuelpessoai* e sua ação mutagênica *in vivo*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Coleta das espécimes** – as folhas de *Pyrostegia venusta* foram coletadas em Alfenas – MG, à beira da Rodovia MG-179, km zero, no mês de junho de 2008 e identificadas pela equipe do Laboratório de Botânica da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), sendo a exsiccata armazenada no Herbário da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas-MG, sob o n° 270.

**Obtenção do extrato** – o extrato das folhas frescas de *Pyrostegia venusta* foi obtido utilizando-se álcool etílico a 70%, conforme técnica descrita por Caceres *et al.*<sup>12</sup>. Foram pesados 600 g das folhas da planta e colocados em 3.000 mL de álcool. Essa mistura foi macerada em balão volumétrico (5.000 mL) e armazenada à temperatura ambiente por 15 dias, ao abrigo da luz. Após 15 dias o mesmo foi filtrado e mantido sob refrigeração. Posteriormente, foi concentrado e passado em filtro Millipore® (0,22 µm). O extrato assim obtido foi colocado em frasco âmbar estéril e mantido sob refrigeração a 4°C.

**Ação antimicrobiana** – para os experimentos de ação antimicrobiana, foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas e leveduras: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 7953), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Streptococcus salivarius* (IAL 1863), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 20509) e *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601).

Os testes de atividade antimicrobiana do extrato vegetal de *Pyrostegia venusta* foram realizados por dois métodos, de acordo com padrões do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS)<sup>13</sup>: teste de difusão em ágar e teste de diluição em tubo. Foram utilizadas as concentrações de 72,6 mg/mL e 145,2 mg/mL de extrato.

**Crescimento e diferenciação celular** – o crescimento de *Herpetomonas samuelpessoai* (ATCC 30252), incubada juntamente com concentrações crescentes do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*, foi estimado pela contagem em câmara de Neubauer. A diferenciação foi realizada em meio de cultivo quimicamente definido.<sup>14</sup> Cerca de  $10^6$  de células foram incubadas juntamente com doses crescentes do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* a 28°C por 48 horas. Os percentuais de formas para, pró e opistomastigota foram determinados a partir de microscopia óptica, após coloração pelo método panótico rápido. Pelo menos 200 células foram examinadas em cada preparação.

**Determinação da DL50** – a determinação da DL 50 foi realizada conforme as normas preconizadas pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD). Foram usados camundongos *Swiss* albinos, fêmeas, com peso corporal entre 30 e 40 gramas, mantidos em caixas de polietileno em ambiente climatizado a 22°C ± 3°C, umidade relativa do ar igual a 50% ± 20% e em ciclos de luminosidade de 12 horas, tratados com ração comercial Labina Purina® (*Nestlé Purina Petcare Company*) e água *ad libitum*. Os animais foram selecionados aleatoriamente e agrupados em caixas, marcados de modo a permitir-se sua identificação individual e mantidos por cinco dias a fim de se aclimatarem às condições do Laboratório. Os animais jejuaram por quatro horas (o alimento foi negado, mas não a água) antes do início do tratamento. Em seguida ao período de jejum, os animais foram pesados e o extrato administrado em dose única por gavagem, usando-se um tubo gástrico. Após, o alimento ainda foi negado por mais uma a duas horas. Três animais foram usados em cada passo. A dose inicial testada foi de 300 mg/kg de peso corporal e, posteriormente, de 2.000 mg/kg. Estes foram observados individualmente após a administração da dose pelo menos uma vez durante os primeiros 30 minutos, periodicamente durante as primeiras 24 horas, com especial atenção durante as primeiras quatro horas e, após, diariamente, num total de 14 dias. No término do teste, os animais sobreviventes foram pesados e sacrificados humanitariamente (câmara de CO<sub>2</sub>).

**Teste de mutagenicidade** – para o teste do micronúcleo (MN), a técnica utilizada para a obtenção das células de medula óssea para o estudo da frequência de micronúcleos foi a descrita por Schimid<sup>15</sup> e modificada por Zambrano *et al.*<sup>16</sup>. O tratamento foi admi-

nistrado por gavagem uma única vez, empregando-se cinco grupos de animais (três machos e três fêmeas por grupo) em duplicata, para posteriores análises nos tempos de 24 e 48 h (tratamentos de 1.000, 1.500 e 2.000 mg/kg). Controles negativo (NaCl 0,9%) e positivo (50 mg/kg de N-Nitroso-N-etilurea) foram incluídos. Após os tempos de tratamento, os animais foram sacrificados por inalação de CO<sub>2</sub> em câmaras de acrílico adaptadas. Os fêmures foram retirados e, rapidamente, células da medula óssea foram coletadas (1 mL de NaCl 0,9%), homogeneizadas e centrifugadas (1.000 rpm/5 min). Os sedimentos celulares foram ressuspensos (500 µL de formol 4% em NaCl 0,9%). As lâminas foram preparadas por esfregaço, mantidas à temperatura ambiente e submetidas à coloração (Leishman eosina-azul). Eritrócitos policromáticos (PCEs) foram analisados quanto a micronúcleos (aumento de 1.000×).

**Estatística** – para os ensaios de ação antimicrobiana e diferenciação celular foi adotada estatística descritiva. Os dados obtidos no teste do micronúcleo foram submetidos à análise estatística de variância, em delineamento inteiramente casualizado e esquema fatorial 5×2×2 (tratamento×sexo×tempo), e ao teste Tukey (5% de significância), empregando-se o *software* SAS® (versão 8.01).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No que diz respeito ao peso seco do extrato, este apresentou a concentração de 726 mg/mL de extrato hidroalcoólico das folhas de *Pyrostegia venusta*.

Com referência à atividade antimicrobiana do extrato, pela técnica de difusão em ágar, não foi constatada ação deste para as 19 cepas testadas de bactérias e fungos. Desta maneira, não houve formação de halos de inibição nas concentrações testadas (72,6 mg/mL e 145,2 mg/mL).

Nas concentrações testadas, não foram constatadas, pelo método de diluição em caldo, nem a capacidade em inibir o crescimento microbiano (CIM) nem mesmo a propriedade microbicida mínima (CMM), quando repicados para meios sólidos.

A atividade antimicrobiana de extratos e óleos vegetais deve-se, em sua maioria, a produtos do metabolismo secundário, como terpenoides e compostos fenólicos, como flavonoides e saponinas, que também, na forma pura, exibem atividade. A diferença entre achados de atividade antimicrobiana descritos em

plantas pode estar relacionada com a quantidade de princípios ativos presentes nos extratos, visto que essa quantidade está relacionada à ação dos mesmos.<sup>17</sup>

Apesar de constatados por Ferreira *et al.*<sup>18</sup> em estudos fitoquímicos da planta *Pyrostegia venusta* compostos associados à atividade antimicrobiana, como os flavonoides, o extrato deste vegetal, no presente estudo, não apresentou resultados que afirmassem a ação contra agentes microbianos. Esse fato também pode estar relacionado a diferenças entre os locais de coleta da planta, sazonalidade, concentrações ensaiadas e metodologia de extração dos princípios ativos, entre outras.

Os resultados obtidos na determinação da CIM e CMM corroboraram os resultados encontrados na técnica de difusão em ágar, demonstrando que o extrato aqui usado não possui atividade antimicrobiana para as 19 cepas testadas, nas condições propostas neste estudo.

O estudo realizado por Gonçalves *et al.*<sup>19</sup> avaliou a atividade antimicrobiana de extrato hidroalcoólicos obtidos de 17 espécies de árvores nativas do Brasil. Para os ensaios de antibiose, foi utilizado o método da difusão em ágar com 10 diferentes microrganismos, isolados de inóculos obtidos de focos de infecções clínicas. Dos 170 testes realizados, 25% mostraram alta atividade antimicrobiana, destacando-se extratos de *Bixa orellana*, *Psidium guajava* e *Anacardium occidentale*. Excepcional atividade antimicrobiana foi observada em *Mimosa tenuiflora* contra *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. *coagulase-negativa*; e os extratos de *Stryphnodendron adstringens* e *Eugenia uniflora* contra *Escherichia coli*, *Providencia* spp., *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. *coagulase-negativa*. Entre estas, os extratos das plantas *A. colubrina* (*Mimosoideae*), *G. americana* (*Rubiaceae*), *C. sylvestris* (*Flacourtiaceae*) e *T. avellanadae* (*Bignoniaceae*) não apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas testadas.

Cunico *et al.*<sup>20</sup> também avaliaram o efeito antimicrobiano do extrato bruto etanólico dos órgãos totais de *O. martiana* realizando ensaios com *Enterococcus faecium*, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*, usando os métodos de difusão em ágar e bioautografia. Os resultados obtidos por difusão em ágar mostraram que o extrato de *O. martiana* apresenta potencial antibacteriano contra *E. faecium* e não comprovaram ação antimicrobiana contra as outras cepas testadas.

Zauli *et al.*<sup>21</sup> avaliaram o potencial antimicrobiano do extrato etanólico de *Dillenia indica* L, popularmente conhecida como flor-de-abril, nas cepas de

*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus salivarius*, utilizando a técnica de difusão em ágar e microdiluição seriada em tubo. Constataram atividade antimicrobiana para *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. mutans* e *S. salivarius*, não apresentando halos de inibição, nas quantidades testadas, para as cepas de *E. coli* e *S. typhimurim*, concluindo, portanto, que o extrato de *Dillenia indica* L. apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* bastante significativa apenas para alguns microrganismos.

Lopes *et al.*<sup>22</sup> avaliaram, como nesta pesquisa, a atividade antimicrobiana do extrato seco de insulina (*Cissus sicyoides*) e do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em diversas cepas microbianas – *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* –, verificando que o óleo de copaíba inibiu o crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* e *E. faecalis*, sendo os demais microrganismos resistentes. A CIM para as bactérias sensíveis variou de 6,05 a 30,25 mg/mL, com CMM de 18,15 mg/mL para *E. faecalis*. O extrato de insulina não foi efetivo na avaliação antimicrobiana.

Também, Pereira *et al.*<sup>23</sup> investigaram a atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em ágar dos extratos hidroalcoólicos de *Sambucus nigra* L. e *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth, conhecidos popularmente como congonha e sabugueiro, respectivamente, a partir de 14 microrganismos padronizados pela ATCC. Constataram que o extrato de congonha foi efetivo, nas concentrações de 10 e 12 mg/mL, para 92,86% dos microrganismos testados, não inibindo apenas o crescimento de *E. coli*. O extrato de sabugueiro, nas concentrações de 10 e 15 mg/mL, inibiu 64,29% das cepas ensaiadas.

Na tentativa de aumentar o conhecimento sobre plantas medicinais, Pinto *et al.*<sup>24</sup> realizaram estudo sobre atividade antimicrobiana do extrato da planta *Cassia angustifolia* vahl. Estes foram avaliados em quatro bactérias Gram-positivas e quatro Gram-negativas e dois fungos. Os resultados foram satisfatórios apenas para as bactérias Gram-positivas.

Em estudos de atividade antimicrobiana de extratos brutos de espécies vegetais, o potencial antimicrobiano muitas vezes não se deve a uma única substância, mas sim a um conjunto dessas substâncias. Um extrato bruto de uma espécie vegetal que possui efeito

bactericida satisfatório poderia não necessitar, portanto, de processos de isolamento de substâncias ativas, reduzindo etapas químicas e, conseqüentemente, custos financeiros. Isto viabilizaria a possível utilização como fitoterápico. Por outro lado, geralmente os compostos presentes em reduzida proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos.<sup>25</sup> Por este motivo, existe a necessidade de trabalhos com análise mais ampla de extratos, em que se obtêm extratos purificados, frações e, finalmente, os compostos puros. Neste sentido, torna-se indispensável a análise da potência das frações e das substâncias puras em relação à sua concentração<sup>26</sup>, bem como às suas atividades bactericida e bacteriostática.

O crescimento de *Herpetomonas samuelpessoai* em meio definido de Roitman, testado com diferentes doses do extrato hidroalcoólico da folha de *Pyrostegia venusta*, por 48 horas, está expresso pela média de números de células/mL e a diferenciação celular foi expressa em percentual de formas promastigota, paramastigota e opistomastigota (Tabela 1).

Conforme demonstrado na Tabela 1, o experimento de crescimento celular de *Herpetomonas samuelpessoai*, em presença do extrato, demonstrou que o número de tripanosomatídeos alterou de forma não estatisticamente significativa as diferentes concentrações utilizadas do extrato, o que demonstra que este não inibe, de fato, o crescimento de *Herpetomonas samuelpessoai* nessas concentrações. Também em relação à diferenciação celular, não foram observadas formas diferenciadas (paraopistomastigota) estatisticamente significantes nas concentrações que variaram de 36,3 a 726 mg/mL, quando comparados ao sistema controle.

Alguns estudos semelhantes foram realizados com outras plantas e substâncias de uso medicinal, objetivando verificar a ação sobre *Herpetomonas samuelpessoai*, o que possibilitaria sua aplicação mais segura em seres humanos, uma vez que extratos de plantas indutoras de diferenciação celular em protozoários podem apresentar potencial mutagênico para células eucarióticas. Em relação à inibição ou estímulo do crescimento, reflexos semelhantes poderão ocorrer nessas células.

Em outro estudo realizado por Holetz<sup>27</sup> foram avaliados os efeitos dos extratos brutos de plantas no crescimento e diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpessoai*. Efeito antiprotozoário positivo foi encontrado nos extratos de *L. alba*, *T. vulgare* e *P. regnellii*, na concentração de 1.000 µg/mL, com 90,7, 97,4 e 99,5% de inibição de crescimento, respectivamente. Os extratos de *A. millefolium*, *E. uniflora*, *M. glomerata*, *P. major*, *P. guajava* e *P. granatum* mostraram fraca atividade inibitória. Por outro lado, *A. lappa*, *E. speciosa*, *S. canadensis* e *S. acmella* demonstraram estímulo no crescimento de *H. samuelpessoai*.

Outro estudo realizado por Holetz *et al.*<sup>28</sup>, utilizando o extrato de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), revelou que este apresenta atividade inibitória sobre o crescimento de *Herpetomonas samuelpessoai*.

Chaves<sup>29</sup> ressaltou que a bupivacaína, um anestésico local quatro vezes mais potente e tóxico que a lidocaína, inibiu o crescimento celular de *H. samuelpessoai*, em doses superiores a 0,05%, tendo sua ação potencializada quando associada à epinefrina, sendo também registrado aumento de células diferenciadas paramastigotas induzidas pelo anestésico.

**Tabela 1** - Crescimento e diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpessoai* em meio quimicamente definido, <sup>14</sup> a 28° C, por 48h, na presença e ausência do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*

Volume do extrato (µl)	Concentração do extrato (mg/mL)	Número de células/mL	Forma promastigota%	Forma paramastigota%	Forma opistomastigota%
Sem adição	0,0	9,54x10 <sup>8</sup>	100	0	0
50	36,3	3,34x10 <sup>8</sup>	97	3	0
100	72,6	3,36x10 <sup>8</sup>	97	3	0
200	145,2	6,22x10 <sup>8</sup>	95	5	0
500	363,0	6,41x10 <sup>8</sup>	95	5	0
750	544,5	9,34x10 <sup>8</sup>	89	11	0
1000	726,0	7,82x10 <sup>8</sup>	90	9	1

Em pesquisa realizada por Lopes *et al.*<sup>22</sup> avaliando a ação do extrato seco de insulina (*Cissus sicyoides*) e do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii*) na diferenciação, no crescimento e na morfologia do tripanosomatídeo *Herpetomonas samuelpessoai*, foi constatada a inibição do crescimento pela copaíba na concentração de 0,2178 mg/mL. Quanto ao extrato de *Cissus sicyoides* não foi verificada inibição do crescimento nem diferença significativa nas contagens de pro, para e opistomastigota em relação à diferenciação celular.

Aguiar Neto *et al.*<sup>30</sup> avaliaram a ação do extrato hidroalcoólico de *Dillenia indica* L. (flor de abril) no tripanosomatídeo *H. samuelpessoai*. De acordo com os resultados obtidos sobre o crescimento, pode-se notar que, à medida que aumentou o tempo de cultivo (24, 48, 72, 96 e 120 h), verificou-se queda acentuada do número de células. E no que se refere à diferenciação, apurou-se que curta exposição a diferentes concentrações do extrato aumentou a forma paramastigota comparativamente ao controle. Entretanto, esse mesmo extrato causou efeito inverso em ensaios com *Herpetomonas roitmani*, tripanosomatídeo que produz elevado número da forma opistomastigota espontaneamente.<sup>31</sup>

Analisando o efeito do extrato de *Cassia angustifolia vahl.* na diferenciação e crescimento celular em *Herpetomonas*, Pinto *et al.*<sup>24</sup> constataram que nas concentrações de 5,9 a 59 mg/mL o extrato não provocou significativo aumento no número de células, mas também não foi observada inibição total do crescimento e este se mostrou capaz de induzir o processo de diferenciação nas concentrações de 24, 30, 35, 41 e 53 mg/mL, porém em menor proporção.

No tocante à determinação da DL50, após tratamento dos camundongos *Swiss* albinos, com concentrações de 300 mg/kg e 2.000 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*, e observação detalhada pelo período de 14 dias, não foi referido óbito, indicando que esse extrato não apresenta toxicidade relativa para esses animais.

O método do micronúcleo baseia-se na análise da frequência de danos ocorridos ao DNA, os quais são resultantes de mitoses ou meioses celulares que, em contato com agentes clastogênicos e aneugênicos, podem gerar a perda de fragmentos ou de cromossomos inteiros, formando, assim, os micronúcleos.<sup>32</sup> (Tabela 2).

Os dados da Tabela 2 mostram os resultados do teste do micronúcleo obtidos em camundongos *Swiss* fêmeas e machos, tratados com as três doses do extrato

de *Pyrostegia venusta* (1.000, 1.500 e 2.000 mg/kg) e os controles positivo e negativo, nos tempos de 24 e 48 horas, respectivamente. São apresentados os números de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) para cada animal e a média de cada grupo. A Tabela 2 também mostra a média da razão entre o número de eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE) em 2.000 células analisadas/ animal.

No teste do micronúcleo, a análise da relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos fornece uma ideia se o extrato está diminuindo a produção de novos eritrócitos (policromáticos). Se isto ocorrer, a droga poderá ser considerada citotóxica.<sup>7</sup>

Os resultados revelaram diferenças estatísticas significativas do número/índice percentual de PCEs micronucleados entre o grupo de animais do controle positivo (ENU 50 mg/kg) e controle negativo (NaCl 0,9%), bem como controle positivo e tratamentos (1.000 – 2.000 mg/kg). Entretanto, essas diferenças não foram observadas entre o grupo de animais do controle negativo e o grupo de animais tratados com o extrato e, ainda, entre os sexos e os tempos de tratamento (24 – 48 h), sugerindo que o extrato hidroalcoólico de folhas de *P. venusta* não apresenta potencial clastogênico e/ou aneugênico.

Corroborando os resultados obtidos, Ribeiro *et al.*<sup>33</sup> não encontraram atividade mutagênica na fração clorofórmica do extrato do caule de *Austroplenckia populnea* (mangabarana).

Entretanto, Fagundes *et al.*<sup>34</sup>, investigando a toxicidade genética de *Annona Corioteuca* (araticum-do-cerrado), demonstraram que o extrato das sementes possui potencial significativo para induzir danos ao DNA.

Outros estudos destacaram que diversos extratos vegetais podem ou não apresentar potencial genotóxico, utilizando-se o teste do micronúcleo.<sup>7,35-37</sup>

Nesta pesquisa, os resultados obtidos nos ensaios de diferenciação e crescimento de *H. samuelpessoai* e DL 50 corroboraram o teste do micronúcleo, pois nestes o extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*, nas concentrações testadas, não demonstrou citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*.

*Pyrostegia venusta* é uma planta pouco estudada, conforme constatado neste estudo, o que pode ser verificado pela carência de artigos encontrados na vasta literatura consultada que possam ser comparados com esta pesquisa.

**Tabela 2** - Número de eritrócitos policromáticos (PCE) analisados, índice percentual de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) e razão de PCE/NCE observados em células provenientes da medula óssea de camundongos *Swiss* fêmeas e machos, após tratamentos (24 e 48 horas) com o extrato de *Pyrostegia venusta*

Ensaio Experimental	PCEs analisados		PCEMNs				PCE/NCE	
	24h	48h	24h		48h		24h	48h
	N <sup>o</sup> *	N <sup>o</sup>	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	%	N <sup>o</sup>	N <sup>o</sup>
NaCl 0.9%	12549	12056	42	0.33 <sup>b</sup>	55	0.46 <sup>b</sup>	22.77	8.97
Etil-nitroso-ureia (50mg/kg)	12091	12039	279	2.31 <sup>a</sup>	210	1.74 <sup>a</sup>	1.10	1.51
Tratamento 1 (1000mg/kg – <i>Pyrostegia venusta</i> )	13126	12330	38	0.29 <sup>b</sup>	65	0.53 <sup>b</sup>	19.47	14.17
Tratamento 1 (1500mg/kg – <i>Pyrostegia venusta</i> )	12171	12197	49	0.40 <sup>b</sup>	63	0.52 <sup>b</sup>	15.13	20.23
Tratamento 1 (2000mg/kg – <i>Pyrostegia venusta</i> )	12430	12418	64	0.51 <sup>b</sup>	67	0.54 <sup>b</sup>	73.12	68.23

<sup>a</sup> e <sup>b</sup> correspondem ao agrupamento de Tukey (P < 0,05).

\* Eritrócitos normocromáticos.

## CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico da planta *Pyrostegia venusta*, nas concentrações testadas, não possui atividade antimicrobiana sobre as 16 cepas bacterianas e três fúngicas usadas.

Não houve alteração do crescimento celular de *Herpetomonas samuelpeessoai* em presença de extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*. E quanto à diferenciação celular, não foram observadas formas diferenciadas, estatisticamente significantes, quando comparados ao sistema controle.

O extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* não apresentou DL50 nas concentrações testadas (300 a 2.000 mg/kg), o que sugere a ausência de toxicidade dessa planta.

A partir do teste do micronúcleo, o extrato não apresentou toxicidade para a medula óssea de camundongos *Swiss* albinos, nas doses testadas, não sendo considerado aneugênico e/ou clastogênico, quando administrado oralmente aos animais.

## REFERÊNCIAS

- Akinpelu DA, Oborunmola FO. Fitoterapia. Rio Janeiro: Elsevier; 2000. p. 75-6.
- Simões CMO, Schenke LEF, Gosmann GM, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFSC; 2003. v. 1, p.1097.
- Henrique Filho C, Bromberg SH, Barreto E, Godoy AC, Mattosinho-França LC. Valor prognóstico do grau de diferenciação celular, da presença de muco e do padrão de crescimento da margem invasiva em adenocarcinomas colorretais Dukes B. Arq Gastroenterol. 2004; 41(3):185-9.
- Saraiva EM, Pinto-da-Silva LH, Wanderley JL, Bonomo AC, Barcinski MA, Moreira ME. Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: Validation by morphological features and specific markers. Exp Parasitol. 2005; 110 (1):39-47.
- Pichara NL, Chagas CR, Fiorini JE, Brandão BL, Ferreira LR. Avaliação do efeito do MNNG na proliferação do *Herpetomonas samuelpeessoai*. In: SEMIC - Seminário de Iniciação Científica da UNIFENAS, 2002. Alfenas: Unifenas; 2002. p. 81.
- Fiorini JE, Angluster J, Alviano CS. Cell surface aniongenic groups of the protozoan *Herpetomonas megaseliae*: effect of lipopolysaccharide. Parasitol Res. 1991; 77(1): 102-8.
- Bernardes BM, Lima EB, Maistro EL. Estudo do potencial mutagênico do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) em células da medula óssea de camundongos *Swiss* albinos: teste do micronúcleo. In: Seminário de Iniciação Científica. Alfenas: Unifenas; 2007.
- Ribeiro LR, Salvadori DM, Marques EK. Mutagênese ambiental. Canoas: ULBRA; 2003.
- Takaeda JIM, Farago PV. Vegetação do Parque Estadual de Vila Velha: guia de campo. Curitiba: Serzgraf; 2001.
- Lorenzi H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. Nova Odessa: Plantarum; 1991.
- Santos MD, Blatt CTT. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers, de mata e de cerrado. Rev Bras Botânica. 1998; 21 (2):135-40.
- Cárceles A, Menéndez H, Méndez E. *et al*. Antigonorrhoal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. J Ethnopharmacol. 1995; 48(2):85-8.

13. Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínicos (CCLS). Padrões de desempenho para teste de susceptibilidade antimicrobiana: padrão M2-A6 aprovado. 6ª ed. Wayne, PA: NCCLAS; 2002.
14. Roitman C, Roitman I, Azevedo HP. Growth of an insect trypanosomatid at 37°C in defined medium. *J Protozool.* 1972; 19: 346-9.
15. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. Hollander A, editor. *Chemical mutagens, principles and methods for their detection.* New York: Plenum Press; 1976. v.4, p.31-53.
16. Zambrano M.A, Targa HJ, Rabello-gay MN. Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleus and metaphase slide preparations. *Stain Technol.* 1982; 57(1):48-9.
17. Duarte MCT, Figueira GM, Pereira B, Magalhães PM, Delarmelina C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Rev Bras Farmacogn.* 2004; 14(1):06-08.
18. Ferreira Trevisan D, Alvares PSM, Houghton PJ. Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre sua importância medicinal. *Química Nova.* 2000; 23(1): 42-6.
19. Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Inst Biol.* 2005; 72(3):353-8.
20. Cunico MM, Carvalho JLS, Kerber VA, et al. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (*Piperaceae*). *Rev Bras Farmacogn.* 2004; 14 (2):97-103.
21. Zauli RC, Pereira MA, Cardoso LGV, Silva JMSF, Carvalho JCT, Fiorini, JE. Atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de *Dillenia indica* L. (flor de abril). In: Seminário de Iniciação Científica. Alfenas: Unifenas; 2004. v.3.
22. Lopes KC, Pereira MA, Nascimento LC, Fiorini JE. Avaliação da atividade antimicrobiana e ação de *Cissus sicyoides* e *Copaifera langsdorffii* na diferenciação celular de sistemas eucarióticos unicelulares. In: Seminário de Iniciação Científica. Alfenas: Unifenas; 2006.
23. Pereira MA, Freitas ABDA, Nascimento LC, Fiorini, JE. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *Sambucus nigra* L. e *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. In: Seminário de Iniciação Científica. Alfenas: Unifenas; 2006.
24. Pinto PCM, Pereira MA, Fiorini JE. Ação antimicrobiana de *Cassia angustifolia vahl.* (sene) e seus efeitos no crescimento e diferenciação. In: Seminário de Iniciação Científica. Alfenas: Unifenas; 2007.
25. Cunha LS. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos brutos de plantas do cerrado, substâncias isoladas e derivados semi-sintéticos frente a microrganismos bucais [dissertação]. Franca: Universidade de Franca; 2006. 170 f.
26. Cechinel Filho V, Yunes RA. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. *Química Nova.* 1998; 21(1): 99-105.
27. Holetz FB. Efeito de extratos de plantas medicinais no crescimento, diferenciação e ultraestrutura de *Herpetomonas samuelpessoai* [dissertação]. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2003.
28. Holetz FB, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, et al. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100 (4):397-401.
29. Chaves ECL. Ação da bupivacaína e epinefrina sobre *Herpetomonas samuelpessoai* [dissertação]. Alfenas: Unifersidade Federal de Alfenas; 2002.
30. Aguiar Netto A, Pereira MA, Freitas ABD, Nascimento LC, Fiorini JE. Ação do extrato hidroalcoólico de *Dillenia indica* L. no crescimento e diferenciação de *Herpetomonas samuelpessoai*. In: Seminário de Iniciação Científica. Alfenas: Unifenas; 2006.
31. Aguiar Netto A, Pereira MA, Freitas ABDA, Fiorini JE. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Dillenia indica* L. sobre o crescimento e diferenciação de *Herpetomonas roitmani*. *Rev Eset Farm. Odontol.* 2005; 27:65-74.
32. Gollapudi BB, Mcfadden LG. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutat Res.* 1995; 347(2):97-9.
33. Ribeiro JC, Andrade SF, Bastos JK, Maistro EL. Investigação do potencial clastogênico da fração clorofórmica do extrato do caule de *Austroplenckia populnea* em células da medula óssea de ratos Wistar: teste do micronúcleo. In: Seminário de Iniciação Científica. Alfenas: Unifenas; 2006.
34. Fagundes FA, Oliveira LB, Cunha LC, Valadares MC. *Annona Coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos. *Rev Eletrôn Farm.* 2005; 2(1):24-9.
35. Gaiani TF, Campos LC, Carvalho JCT, Maistro EL. Avaliação do potencial mutagênico do extrato bruto de *Rosmarinus officinalis* em células da medula óssea de ratos Wistar. In: Seminário de Iniciação Científica. Alfenas: Unifenas; 2005.
36. Souza DS, Pereira FMV, Leite MF, Maistro EL. Estudo do potencial mutagênico do extrato de *Tamarindus indica* em células da medula óssea de ratos wistar. In: Seminário de Iniciação Científica. Alfenas: Unifenas; 2006.
37. Valadares MC, Castro NC, Cunha, LC. *Synadenium umbellatum: citotoxicidade* e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Rev Bras Ciênc Farmacêut.* 2007; 43(4):631-8.