

## Atividade biológica do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* Link sobre *Herpetomonas samuelpessoai* (Galvão.) Roitman

PEREIRA, A.C.S.<sup>1</sup>; RIBEIRO, G.E.<sup>2</sup>; SOUZA, L.C.R.<sup>1</sup>; RUFINO, L.R.A.<sup>1</sup>; CABRAL, I.S.R.<sup>2</sup>; BORIOLLO, M.F.G.<sup>1</sup>; NOGUEIRA, D.A.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, N.M.S.<sup>1</sup>; FIORINI, J.E.<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Univesidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos Rodovia MG 179, Km 0, CEP: 37130-000, Alfenas, MG, Brasil. \**microrganismo@unifenas.br*; <sup>2</sup>Univerversidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básica, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Centro, CEP: 37130-000, Alfenas, MG, Brasil.

**RESUMO:** Inúmeros esforços têm sido dirigidos para conferir às plantas seu real papel e valor na terapia. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana, mutagênica, toxicidade, e os efeitos no crescimento e diferenciação de *Herpetomonas samuelpessoai*, do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata*. Para avaliar a atividade antimicrobiana foi realizado o teste de difusão em ágar, bem como a determinação das concentrações inibitória (CIM) e microbicida mínimas (CMM). O potencial clastogênico e/ou aneugênico, *in vivo*, foi avaliado usando o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos *Swiss albinus*. Foi determinada também a dose letal média (DL<sub>50</sub>). O extrato inibiu o crescimento de oito bactérias, mostrando-se mais ativo para Gram-positivas e não foi eficiente para os fungos, tendo sido ativo nas concentrações de 2000, 1000, 500 e 250 mg/mL contra os microrganismos testados. Os resultados mostraram que nas concentrações administradas (500, 1000 e 2000 mg/Kg), não houve aumento estatisticamente significativo de micronúcleos. Não houve ação no crescimento e diferenciação de *Herpetomonas samuelpessoai* nas concentrações testadas. Com relação a DL<sub>50</sub>, o extrato não apresentou toxicidade.

**Palavras-chave:** *Bauhinia forficata*, *Herpetomonas samuelpessoai*, pata de vaca, antimicrobianos, mutagenicidade.

**ABSTRACT:** Biologic activity of the hydroalcoholic extract of *Bauhinia forficata* Link on *Herpetomonas samuelpessoai* (Galvão.) Roitman. Numerous efforts have been directed to discover the role and the value of plants in therapy. This work aimed to evaluate the antimicrobial activity, mutagenicity, toxicity and effects on growth and differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai* of the hydroalcoholic extract of *Bauhinia forficata*. To evaluate the antimicrobial activity it was performed the agar diffusion test, minimum inhibitory (MIC) and microbicidal (MMC) concentrations. The *in vivo* clastogenic and / or aneugenic potential was evaluated using the micronucleus test in mice bone marrow *Swiss albinus*. It was also determined the median lethal dose (LD<sub>50</sub>). The extract inhibited the growth of eight bacteria, being more active against Gram-positive ones, and was not active against fungi. The microorganisms tested had MIC concentrations of 2000, 1000, 500 and 250 mg / mL. The results showed that the tested concentrations (500, 1000 and 2000 mg / kg) had no statistically significant increased the micronucleus. There was no action on the growth and differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai* at the concentrations tested. In respect to the LD<sub>50</sub>, the extract showed no toxicity.

**Key words:** *Bauhinia forficata*, *Herpetomonas samuelpessoai*, cow's-paw, antimicrobial, mutagenicity.

### INTRODUÇÃO

Algumas espécies do gênero *Bauhinia* são conhecidas popularmente como “pata-de-vaca”, “unha-de-vaca”, entre outros nomes e são utilizadas para fins medicinais. Este gênero pertence à família

Leguminosae e abrange cerca de 300 espécies presentes em áreas tropicais do mundo (Lusa e Bona, 2009).

*Bauhinia forficata* é utilizada na medicina

popular brasileira e se destaca pela sua relevância terapêutica no tratamento do diabetes mellitus (Trojan-Rodrigues et al., 2012). Possui atividades biológicas como hipoglicemiante (Curcio et al., 2012), antioxidante (Khalil et al., 2008; Peroza et al., 2013) e anticoagulante (Oliveira et al., 2005). Esta espécie desperta o interesse para produção de fitoterápicos e se encontra na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (Ministério da Saúde, 2009).

Estudos recentes mostram que substâncias presentes em preparações medicinais podem causar efeitos tóxicos, como danos no DNA, devido à sua citotoxicidade, mutagenicidade e propriedades carcinogênicas. A avaliação dos danos causados são de extrema importância para minimizar os riscos destes agentes, principalmente em tratamentos a longo prazo (Sisenando et al., 2009).

O desenvolvimento de novos fármacos requer uma completa investigação da eficácia e segurança da substância-teste. O potencial de risco e benefício deve ser cuidadosamente considerado, de modo que os benefícios de seu uso superem os efeitos colaterais (Varanda, 2006).

Os estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com *B. forficata* sugerem a presença de proantocianidinas, leucoantocianidinas, triterpenos, esteróides, flavonóides, além de açúcares redutores (Marques et al., 2012; Cechinel Filho, 2003). A literatura aponta os flavonóides como responsáveis pela atividade biológica, sendo a kaempferitrina o marcador químico e farmacológico de excelência (De Sousa et al., 2004; Lino et al., 2004).

Apesar da larga utilização da *B. forficata* na medicina popular, há poucos estudos sobre a atividade antimicrobiana e seus efeitos genotóxicos, tornando-se necessários estudos científicos que comprovem a eficácia ou ações indesejáveis de suas propriedades.

Este trabalho teve como objetivo verificar a atividade antimicrobiana e mutagênica do extrato hidroetanólico da folha de *B. forficata*. Segundo Mateuca et al. (2006) a frequência de micronúcleos é forte preditivo para o desenvolvimento de câncer. O teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*, além de atender às exigências dos órgãos nacionais que regulam os registros farmacológicos e químicos, também segue as recomendações do Gene-Tox Program da Environmental Protection Agency. Ensaio com sistemas eucarióticos envolvendo seu metabolismo podem indicar a capacidade mutagênica de produtos naturais e sintéticos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparo do material vegetal e extrato bruto

As folhas de *Bauhinia forficata* foram coletadas, em um único exemplar da planta, em sua parte média, na Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS) campus de Alfenas, MG no mês de fevereiro/2010. A cidade fica localizada no sul de Minas Gerais cuja região apresenta clima temperado com temperaturas variando entre 21-25°C na época da coleta das folhas. Em seguida, lavadas em água corrente e secas em estufas a 35°C durante uma semana para eliminação da umidade e estabilização do conteúdo enzimático. Depois, foram trituradas em moinho elétrico para obtenção do pó. A exsiccata foi depositada no Herbário da Unifenas, sob o nº BF-468.

Para preparação do extrato hidroalcoólico foram pesados 200 g das folhas trituradas, previamente lavadas e secas, e suspensas em 800 mL de etanol 70% (v/v), e submetidas à maceração por sete dias. Após, foi realizada a filtração em papel filtro e o extrato obtido foi concentrado em rotoevaporador em temperatura inferior a 40°C. Em seguida, foi realizada liofilização do extrato.

### Avaliação da atividade antimicrobiana

#### Microrganismos e preparo do inóculo

Foram utilizados os microrganismos relacionados na Tabela 1, oriundos do Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos, da Universidade José do Rosário Vellano/ UNIFENAS, rotulados na *American Type Culture Collection* (ATCC).

As cepas foram repicadas em ágar Mueller Hinton (pH 7,2), incubadas a 37°C, por 24 h. Para o preparo do inóculo, as culturas de cada microrganismo foram transferidas para tubos de ensaio contendo 9 mL de salina esterilizada de forma a obter-se turbidez correspondente ao tubo 0,5 da Escala de Mc Farland.

#### Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)

A concentração inibitória mínima (CIM) (NCCLS, 2003) foi determinada nos extratos que apresentaram atividade inibitória no teste de difusão em ágar. Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços. No primeiro poço foi adicionado o extrato com concentração de 2000 mg/mL, e a partir deste foram preparadas diluições seriadas decrescentes de 2000 mg/mL a 3,9 mg/mL. Foram inoculados nos poços 10 µL da suspensão microbiana com turvação equivalente ao tubo 0,5 da

**Tabela 1.** Microrganismos utilizados nos ensaios com *Bauhinia forficata*.

Microrganismos	
Bactérias Gram-positivas	Bactérias Gram-negativas
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13046)
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC12226)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25619)
	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)
Fungos	Protozoário
<i>Candida albicans</i> (ATCC 1023-1)	<i>Herpetomonas samuelpessoae</i> (ATCC 30252)
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC 20509)	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)	

Escala de Mac Farland. Foi realizado o controle de esterilidade do meio de cultura e de esterilidade dos extratos. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas e após este período foi observado presença ou ausência de turvação. Foi considerado CIM a menor concentração que não apresentou turvação.

A CMM foi realizada nas concentrações do extrato que apresentaram inibição para o crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton (pH7,2) e incubadas a 37°C por 24 horas.

#### Teste de difusão em ágar

Foi utilizado o método de difusão em ágar atualmente recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)(NCCLS, 2003), que se baseia originalmente no método descrito por Bauer et al. (1966). Foram preparadas placas de Ágar Mueller-Hinton (pH 7,2) para bactérias e Ágar Mueller-Hinton com glicose ( pH 6,0) para leveduras. Posteriormente foram feitos poços de 4 mm de diâmetro na superfície do ágar, com auxílio de um tubo de metal. Foram preparadas suspensões microbianas em soro fisiológico com turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de Mc Farland. Esta suspensão foi inoculada (0,1 mL) na superfície do ágar, com auxílio de *swab*. Foram colocados nos poços os extratos de folhas de *Bauhinia forficata* concentrados 10 X objetivando diminuir o volume a ser depositado nos poços e de modo a obter as concentrações finais utilizadas nos experimentos. Um controle positivo com solução de clorexidina a 0,12% (v/v) foi também utilizado. Este procedimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Barkvoll (1998) e Barros & Fiorini (2000) onde os Autores não utilizaram antibióticos comerciais no procedimento. Também foi utilizado um controle negativo com água destilada. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Após a

incubação foi feita a leitura dos halos de inibição do crescimento microbiano.

#### Crescimento e diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpessoai*

A diferenciação celular foi realizada em meio de cultivo quimicamente definido (pH6,5) (Roitman et al., 1972). Cerca de 10<sup>6</sup> células foram incubadas juntamente com doses crescentes do extrato hidroalcolólico do vegetal, a 28°C por 72 horas.

As células foram coletadas por centrifugação e lavadas 2X em PBS, pH 7,2. Após a lavagem, as células foram ressuspensas no mesmo tampão e realizado um esfregaço fino lâmina de vidro. A lâmina foi deixada secar a temperatura ambiente e, posteriormente, as células foram coradas pelos métodos Panótico e Giemsa e foram observadas em microscopia óptica objetivando estimar os percentuais de formas pro, para e opistomastigota.

O crescimento de *H. Samuelpessoai* foi estimado por contagem das células em câmara de Neubauer com sistemas controle e submetidos ao tratamento com o extrato após incubação em estufas BOD 28°C, por um período de 72 horas. Os tripanosomatídeos foram fixados em formalina a 10%. Foram considerados os resultados médios obtidos de pelo menos dois experimentos realizados em duplicata.

#### Dose letal média (DL<sub>50</sub>)

Para determinação da dose letal média (DL<sub>50</sub>) foram utilizados grupos de camundongos *Swiss albinus* (n=3 animais/grupo/sexo), pesando entre 30 e 40 gramas, provenientes do Biotério Central da UNIFENAS, que receberam, por via oral (V.O.), dose única de diferentes concentrações (3, 50, 300 e 2000 mg/Kg) do extrato hidroalcolólico de *Bauhinia forficata*, seguindo as normas da

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 1998) para testar toxicidade oral aguda de produtos químicos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade José do Rosário Vellano- UNIFENAS, Campus de Alfenas-MG, sob nº 02A/2010.

### Teste do Micronúcleo

Para a realização do teste do micronúcleo (Schmid, 1976), foram utilizados camundongos *Swiss albinus*, adultos jovens, provenientes do Biotério Central da UNIFENAS. Os animais foram divididos em seis grupos (n=6 por grupo, sendo 3 machos e 3 fêmeas).

O extrato de *B. forficata* foi testado separadamente empregando-se 3 doses (1000; 1500 e 2000 mg/Kg de peso corporal), selecionadas de acordo com a DL<sub>50</sub>, e administrados via gavagem (100µL/10 g de animal). O grupo controle negativo recebeu NaCl (150 mM) por gavagem e o controle positivo foi tratado com N-Nitroso-N-ethylurea (ENU) (50 mg/Kg - Sigma N8509) de modo intraperitoneal.

Após 24 e 48 horas do término do tratamento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os fêmures foram removidos, a epífise proximal foi retirada para expor o canal medular e, com o auxílio de uma agulha 13 x 4.5 mm e 3 mL de solução de NaCl (150 mM), a medula foi retirada, lavando-se o canal medular com solução de NaCl. O material foi transferido para tubos de vidro e centrifugados a 1000 rpm/5 min.

Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, e o sedimento foi ressuspenso com solução de formaldeído 4% e levemente homogeneizado com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Uma gota desta suspensão celular foi colocada em uma lâmina limpa e seca, e depois, realizou-se o esfregaço.

As lâminas foram secas à temperatura ambiente e, após 24 horas, coradas com Leishman eosina-azul de metileno e submetidas à análise microscópica. Em cada lâmina 2000 eritrócitos policromáticos foram analisados.

### Análise estatística

Para os ensaios de ação antimicrobiana foi utilizada estatística descritiva. Os dados obtidos no teste do micronúcleo foram submetidos à análise estatística de variância *one-way* (ANOVA), em delineamento inteiramente casualizado e esquema fatorial 5x2x2 (tratamento x sexo x tempo), e ao teste de Tukey empregando o software SAS® (versão 8.01). O teste de Scott-Knott foi empregado para os resultados de crescimento e diferenciação celular. Diferenças estatísticas foram fixadas como sendo significativas para p≤0,05.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do potencial antibacteriano do extrato hidroalcoólico de *B. forficata*, demonstrou atividade sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, porém não foi eficaz para as cepas fúngicas. Todos os microrganismos que apresentaram CIM nas concentrações de 250, 1000, e 2000 mg/mL, obtiveram halos de inibição no teste de difusão em ágar, exceto *P. mirabilis*. Somente *Bacillus cereus* e *Micrococcus luteus* apresentaram CMM de 1000 e 2000 mg/mL, respectivamente. Isto poderia ser explicado pelo tipo de processo metabólico dos mesmos o que os levaria a apresentarem maior sensibilidade à ação do extrato nas concentrações propostas. Ademais, observa-se que houve diferença expressiva entre as duas bactérias, relacionada à CMM, provavelmente pelo fato de *B. cereus* ser um organismo formador de endósporo e aeróbio estrito e o *Micrococcus* ser fermentador facultativo e não formador de esporo. (Tabela 2).

Os resultados obtidos confirmaram estudo realizado por Silva e Filho (2002), no qual os extratos de *B. forficata* foram testados contra fungos filamentosos e leveduras patogênicas, por meio do teste de diluição em caldo, não havendo atividade antifúngica.

Kumar et al. (2005) verificaram a atividade antimicrobiana do extrato de *Bauhinia racemosa*, sendo este efetivo para *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*, em concentrações que variaram de 25 a 200 µg/mL.

Ahmed et al (2012) avaliaram atividade antimicrobiana das espécies *Bauhinia bowkeri*, *Bauhinia galpinii*, *Bauhinia petersiana* e *Bauhinia variegata*. Todas apresentaram boa atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, nas concentrações de 30 a 2500 µg/mL.

Sousa et al. (2000) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos das frações da *B. forficata* e *B. microstachya* por meio do método de difusão em ágar, observando que somente uma fração da *B. forficata* inibiu o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* na concentração de 1000 µg/mL.

Estes estudos corroboram com os resultados deste trabalho, demonstrando que não só *B. forficata*, mas várias espécies deste gênero possuem propriedades antimicrobianas. No entanto, há uma diferença entre as concentrações consideradas inibitórias. Isso pode ser explicado pela

**Tabela 2.** Halos de inibição, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato hidroalcoólico de *B. forficata* ante as cepas fúngicas e bacterianas.

Microrganismos	Halos de Inibição (mm)	CIM (mg/mL)	CMM (mg/mL)
Bactérias Gram-positivas			
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	17	250	1000
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	19	2000	-
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)	31	1000	2000
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	24	2000	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC12226)	25	250	-
Bactérias Gram-negativas			
<i>Enterobactera erogenes</i> (ATCC 13046)	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	18	1000	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933)	16	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25619)	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	20	2000	-
Fungos			
<i>Candida albicans</i> (ATCC 1023-1)	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC 20509)	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)	-	-	-

diferença de espécie, na qual cada uma apresenta composição química diferente e conseqüentemente maior ou menor concentração de princípios ativos, podendo haver ainda diferenças decorrentes do solo, clima e sazonalidade.

Os flavonoides, que são solubilizados em meio alcoólico, foram descritos como responsáveis pelas atividades biológicas de *B. forficata* (Silva e Filho, 2002), além de outros princípios ativos que sinergicamente contribuem para a atividade antimicrobiana.

As cepas Gram-positivas demonstraram-se mais sensíveis ao extrato do que as Gram-negativas. Isso se deve, provavelmente, a diferenças da composição química e física da parede celular entre os dois grupos de bactérias, entre outros fatores.

Tripanosomatídeos não patogênicos, como *Herpetomonas samuelpessoai*, surgiram como modelos importantes para o estudo dos processos biológicos básicos realizados por uma célula eucariótica (Gomes et al., 2012) sendo o mesmo utilizado como modelo para o estudo dos efeitos do extrato hidroalcoólico de *B. forficata* sobre o crescimento e diferenciação celular.

Os experimentos de crescimento celular em presença do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* demonstraram que o número de tripanosomatídeos não foi reduzido e nem aumentado mesmo exacerbando-se a concentração do extrato, o que demonstra que este não inibe e nem estimula o crescimento de *Herpetomonas samuelpessoai*, nas concentrações testadas.

Com relação à diferenciação celular, não foram observadas formas diferenciadas (parapistomastigota) estatisticamente significativas, quando comparadas com os sistemas controles (Tabela 4), indicando a ausência de substâncias contidas no extrato potencialmente mitogênicos e, ou, mutagênicos, nesse sistema experimental.

Não foi encontrado na literatura estudos dos efeitos de *B. forficata* sobre este flagelado, nem mesmo utilizando plantas do mesmo gênero. No entanto, estudos utilizaram este modelo experimental para avaliar os efeitos de diferentes plantas medicinais (Fernandes et al., 2011; Perazzo et al., 2011).

No que tange à determinação da DL<sub>50</sub>, após tratamento dos camundongos *Swiss albinus*,

**Tabela 3.** Diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpeessoai* em meio quimicamente definido (ROITMAN et al., 1972), a 28°C, por 72h, na presença e ausência do extrato hidroalcoólico de *Bauhiniaforficata*.

Concentração do extrato (mg/mL)	Forma promastigota %	Forma paramastigota %	Forma opistomastigota %
0,0	87	9,5	3,83
2000,0	73,8	19,8	6,7
1000,0	93,17	6,83	0
500,0	92	7,3	1,83
250,0	93,7	4,2	2,8
125,0	91,7	6,83	1,7
62,5	95	4,7	1
31,25	88,8	6,7	4,5
15,625	79,8	13,5	6,5
7,8	87	9,8	3,3
3,9	85,2	13,8	1,3

**Tabela 4.** Diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpeessoai* em meio quimicamente definido (ROITMAN et al., 1972), a 28°C, por 72h, na presença e ausência do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata*.

Concentração do extrato (mg/mL)	Forma promastigota %	Forma paramastigota %	Forma opistomastigota %
0,0	87	9,5	3,83
2000,0	73,8	19,8	6,7
1000,0	93,17	6,83	0
500,0	92	7,3	1,83
250,0	93,7	4,2	2,8
125,0	91,7	6,83	1,7
62,5	95	4,7	1
31,25	88,8	6,7	4,5
15,625	79,8	13,5	6,5
7,8	87	9,8	3,3
3,9	85,2	13,8	1,3

com concentrações de 1000 mg/kg, 1500 mg/Kg e 2000 mg/kg do extrato hidroalcoólico de *B. forficata* observação detalhada por um período de 14 dias, não foi constatado nenhum óbito, indicando que este extrato não apresenta toxicidade relativa para estes animais nas concentrações testadas.

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. A análise da relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos fornece o indicativo do extrato estar diminuindo a produção de novos eritrócitos (policromáticos). Se isto ocorrer, a droga poderá ser considerada citotóxica (Fernandes

et al., 2011).

Os dados da Tabela 5 demonstram os resultados do teste do micronúcleo obtidos em camundongos *Swiss* fêmeas e machos, tratados com as três doses do extrato de *B. forficata* (1000, 1500 e 2000 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. Esta Tabela também mostra a média da razão entre o número de eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE), em 2.000 células analisada/ animal.

Os resultados revelaram diferenças estatísticas significativas do número/índice percentual de PCEs micronucleados entre o grupo de animais do controle positivo (ENU 50mg/

**Tabela 5.** Número de eritrócitos policromáticos (PCE) analisados, índice percentual de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) 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 *B. forficata*.

Gupos Experimentais	PCE analisados		PCEMN		PCEMN		PCE/NCE	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
	(n)	(n)	(n)	(%)	(n)	(%)		
Controle NaCl 150 mM macho	6208	6260	28 <sup>a</sup>	0,4500 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	0,5600 <sup>a</sup>	67,48	156,50
Controle NaCl 150 mM fêmea	6276	6281	27 <sup>a</sup>	0,4300 <sup>a</sup>	28 <sup>a</sup>	0,4500 <sup>a</sup>	261,50	330,58
Controle ENU 50 mg/Kg macho	6057	5984	194 <sup>b</sup>	3,2000 <sup>b</sup>	109 <sup>b</sup>	1,8200 <sup>b</sup>	1,04	0,96
Controle ENU 50 mg/Kg fêmea	6034	6055	85 <sup>b</sup>	1,4100 <sup>b</sup>	101 <sup>b</sup>	1,6700 <sup>b</sup>	1,17	3,47
<i>B. forficata</i> L. 1000mg/Kg macho	6266	6207	9 <sup>a</sup>	0,1436 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	0,0967 <sup>a</sup>	90,81	105,20
<i>B. forficata</i> L. 1000mg/Kg fêmea	6200	6227	1 <sup>a</sup>	0,0161 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	0,1124 <sup>a</sup>	119,23	127,08
<i>B. forficata</i> L. 1500mg/Kg macho	6209	6166	13 <sup>a</sup>	0,2094 <sup>a</sup>	9 <sup>a</sup>	0,146 <sup>a</sup>	43,12	57,63
<i>B. forficata</i> L. 1500mg/Kg fêmea	6155	6096	4 <sup>a</sup>	0,0650 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	0,2789 <sup>a</sup>	80,99	80,21
<i>B. forficata</i> L. 2000mg/Kg macho	6186	6089	23 <sup>a</sup>	0,3718 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	0,1971 <sup>a</sup>	28,91	28,86
<i>B. forficata</i> L. 2000mg/Kg fêmea	6205	6181	16 <sup>a</sup>	0,2579 <sup>a</sup>	24 <sup>a</sup>	0,3883 <sup>a</sup>	65,32	51,94

Kg) e controle negativo (NaCl 0,9%), bem como controle positivo e tratamentos (1000-2000mg/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 (24-48h), sugerindo que o extrato hidroalcoólico de folhas de *B. forficata* não apresenta potencial clastogênico e/ou aneugênico. Este dado confirma os resultados encontrados no teste de diferenciação celular com *H. samuelpeessoai* onde não foram constatadas células diferenciadas para opistomastigotas.

Estudo realizado por Macedo et al. (2008), utilizando folhas de *Bauhinia monandra*, por meio do teste do micronúcleo em *Allium cepa* (cebolas) e transformação plasmidial em *Escherichia coli*, comprovaram os resultados obtidos neste experimento, no qual o gênero *Bauhinia* não apresenta propriedades clastogênicas.

Menezes (2007) isolou dois flavonóides, quercetina-3,7-O-diramnosídeo e canferol-3,7-O-diramnosídeo do extrato aquoso de *B. forficata*. Os flavonóides, devido às suas propriedades antioxidantes e a capacidade de modular várias enzimas e receptores celulares, dependendo do número e posição dos grupos hidroxílicos no anel A e B, podem agir como mutagênicos ou um pró-oxidante (Skibola e Smith, 2000; Silva et al., 2000; Hodek et al., 2002). Este fato pode estar relacionado

com a ausência de mutagenicidade da *B. forficata*, no qual os grupos hidroxílicos podem estar em posições e em números não específicos para exercer ação mutagênica.

Conclui-se que o extrato hidroalcoólico apresenta atividade antimicrobiana e considerando as concentrações, tempo e sistemas testes avaliados, não é tóxico, nem apresenta clastogenicidade. Contudo, ensaios adicionais de mutagenicidade devem ser realizados para confirmar a hipótese de uso seguro da planta.

#### REFERÊNCIA

- AHMED, S.J. et al. Study of comparison of antimicrobial potencies of *Bauhinia Variegata* leave extracts with antibiotics against selected bacteria. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, v. 4, n. 3, p. 44-46, 2012.
- BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Amer. J. Clín. Path.*, v. 45, p. 493 - 496, 1966.
- BARKVOLL, P., ROLLA, G. & BELLAGAMBA, S. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium monofluorophosphate *in vitro*. *Scand. Jour. of Dent. Research* v.96 , n.1, p.30 – 33, 1988.
- BARROS L.M, FIORINI J.E. Efeito da clorexidina e água ozonizada contra *S. viridans* na placa dentária bacteriana supragengival. *Rev. Ass. Paul Cir. Dent*, São Paulo, v.54, n. 1, p.47-52, 2000.
- CECHINEL FILHO, V.; CAMPOS, F; CORRÊA, R Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma

- revisão da literatura. **Quim. Nova**, v.2, p. 230-241, 2003.
- CURCIO, S.A. et al. Efeitos hipoglicemiantes de um extrato aquoso de *Bauhinia forficata* sobre as glândulas salivares de ratos diabéticos. **Pak. J. Pharm. Sci.** v. 25, n. 3, p. 493-9, 2012.
- DE SOUSA, E. et al. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3,7-O-( $\alpha$ )-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 829-832, 2004.
- FERNANDES, A.P. et al. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* na mutagênese “*in vivo*”, e avaliação antimicrobiana, e interferência no crescimento e diferenciação celular “*in vitro*”. **Rev. Med. Minas Gerais**, v.21, n.3, p. 267-274, 2011.
- GOMES, M.D. et al. Efeitos da corrente elétrica sobre *Herpetomonas samuelpessoai*: um estudo ultra estrutural. **Bioelectromagnetics.**, v. 33, p. 334-345, 2012.
- Hodek P. et al. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes. **Chemico-Biological Interactions** v.139, p. 1-21, 2002.
- KUMAR et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1015-1024, 2005.
- KHALIL, N.M. PEPATOM. T and BRUNETTI. L. Free Radical Scavenging Profile and Myeloperoxidase Inhibition of Extracts from Antidiabetic Plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. **Biol Res.**, v. 41, n. 2, p. 165-71, 2008.
- LINO, C.S. et al. Atividade antidiabética da *Bauhinia forficata* extraída aloxano em ratos diabéticos. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 125-127, 2004.
- LUSA, M.G.; BONA, C. Análise morfoanômica comparativa da folha de *Bauhinia forficata* Link e *B. variegata* Linn. (Leguminosae, Caesalpinioideae) **Acta Bot. Bras.**, v. 23, n. 1, p. 196-211, 2009.
- Macêdo MFS, Sisenando HAAACN, Queiroz JDF, Argolo ACC, Saturnino ACRD, Coelho LCBB, Batistuzzo-de-Medeiros SR. Determinar a genotoxicidade de uma infusão aquosa de *Bauhinia monandra* folhas. **Rev. Bras Farmacogn** 18: 509-516, 2008.
- MARQUES, G. S. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Quím. Nova**, v.35, n.3, p.517-522, 2012.
- MATEUCA, R. et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v.88, n.11, p. 1515-31, 2006.
- MENEZES, F.S.; MINTO, A.B.M.; RUELA, H.S.; KUSTER, R.M.; SHERIDAN, H.; FRANKISH, N.; . Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Rev. Bras. Farmacogn**, V.17, p. 8-13, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>. 2009. Acesso em: 4 de abril de 2013.
- NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for Bacteria That Grow aerobically, (6<sup>th</sup> ed.) NCCLS document M7-A6. NCCLS, 949 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA: 19087-1898 USA, 2003.
- OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, ENV/JM/MONO(2000)7.
- OLIVEIRA, C.Z. et al. Propriedades anticoagulantes e antifibrinogenolíticas do extrato aquoso de *Bauhinia forficata* contra venenos de serpentes. **J. Ethnopharmacol.**, v. 98, n. 1-2, p. 213-6, 2005.
- PEROZA, L.R. et al. *Bauhinia forficata* impede movimentos de mastigação vazios induzidos por haloperidol em ratos e tem potencial antioxidante *in vitro*. **Neurochem Res.**, v. 38, n. 4, p. 789-96, 2013.
- PERAZZO, F.F. et al. *Ginkgo Biloba* leaves extract on growth and morphology of trypanosomatids. **Bol Lat Caribe Plant Med Arom.**, v.10, n. 2, p. 147-54, 2011.
- ROITMAN, et. al. Growth of an insect *trypanosomatid* at 37° C in defined medium. **Journal of Protozoology**, v. 19, p. 346-349, 1972.
- SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Hollaender, A. (Ed.). **Chemical mutagens: principles and methods for their detection**. New York: Plenum Press, p.31-53, 1976.
- SILVA, K. L.; FILHO, V. C. Plantas do Gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico. **Quim. Nova**, v. 25, p.449, 2002.
- SILVA, K. L. et al. Cechinel, V.; Phytochemical and pharmacognosic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). **Z. Naturforsch C**, v. 55(5-6), p. 478-80, 2000.
- SISENANDO, H.A. et al. Evaluation of the genotoxic potential of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL). **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 303-308, 2009.
- SKIBOLA, C.F.; SMITH, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3- 4, p. 375-383, 2000.
- SOUZA, R S. S.; Santos, D. R; BELLA CRUZ, R C.; VI Seminário Integrado de Iniciação Científica, Camboriú, Brasil, 2000.
- TROJAN-RODRIGUES, M. et al. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 155-163, 2012.
- VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 27, n.1, p.1-7, 2006.