

---

# **AVALIAÇÃO**

---

# **DO POTENCIAL**

---

# **MUTAGÊNICO**

---

# **DE BAUHINIA L. SP.\***

---

JOÃO ANTÔNIO XAVIER MANSO, **ALEX LUCAS HANUSCH**,  
CLÁUDIO CARLOS DA SILVA, **APARECIDO DIVINO DA**  
**CRUZ**, DAMIANA MÍRIAN DA CRUZ E CUNHA

Resumo: *plantas do gênero Bauhinia L. têm sido empregadas empiricamente na sociedade humana para fins terapêuticos, não se examinado a existência de eventos de toxicidade. Este trabalho teve como objetivo a avaliação do possível potencial mutagênico e citotóxico de Bauhinia L. sp. pelo biomonitor Poecilia reticulata. Os resultados deste estudo não apresentaram significância nas variáveis, micronúcleo e alterações eritrocíticas totais testadas.*

Palavras-chave: *Planta medicinal. Micronúcleo. Pata-de-vaca. Citotoxicidade.*

O consumo de plantas medicinais é uma das mais antigas práticas realizadas pela sociedade antrópica e ainda é muito difundida na contemporaneidade. Nos últimos anos, tem se aumentado o número de pessoas e profissionais da saúde a optarem por terapias com plantas medicinais, como complemento para os tratamentos baseados em medicamentos sintéticos (SANTOS; VARANDA, 2006).

O uso de plantas medicinal e fitoterápico para tratamentos e manutenção da saúde, tem se demonstrado como um mercado muito favorável. Sendo que no ano de 2010, foram movimentados aproximadamente US\$ 44 bilhões pelo mercado mundial de fitoterápicos (ARAÚJO *et al.*, 2006). No Brasil apesar da ausência de dados oficiais relacionados ao tamanho desse mercado, estima-se que se tenha uma variação entre US\$ 350 milhões e US\$ 550 milhões (ABI-FISA, 2010).

Na sociedade brasileira, verifica-se que o consumo de plantas medicinais da flora nativa é frequente, sendo com pouca ou total ausência da comprovação de suas propriedades farmacológicas, considerando a toxicidade dos agentes

terapêuticos mais utilizados pela sociedade (fármacos sintéticos, fitoterápicos e plantas medicinais), sugere-se que seja desprezível o evento de efeitos tóxicos por parte dos compostos vegetais. Porém, este pensamento torna-se equivocado, pois as plantas medicinais podem causar efeitos adversos como possíveis adulterações, toxidez e ações sinérgicas (interação com outras drogas) que caracteriza então, o consumo de plantas medicinais como um problema sério de saúde pública (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005).

Em meio à densidade de plantas com potencial terapêutico, observa-se o gênero *Bauhinia* Linneaus, 1753 (*Bauhinia* L.) pertencente à família leguminosae, comumente encontrado em áreas tropicais constituindo cerca de 300 espécies (MENEZES, 2007). Destas, 200 são brasileiras (VAZ; TOZZI, 2005), sendo as espécies *B. affinis*, *B. forficata* encontradas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009), por serem utilizadas pela população, como agente terapêutico empregadas no tratamento de infecções, dores e especialmente diabetes mellitus. Conhecidas popularmente como Pata-de-vaca, estas plantas também são encontradas em ambientes antropizados e possuem compostos que são interessantes medicinalmente (DA SILVA; CECHINEL, 2002).

As espécies pertencentes a este gênero podem apresentar porte arbóreo ou arbustivo, e conforme os nomes populares sugerem, as folhas assemelham-se a uma pata de bovino, sendo fendida no meio, formando dois folíolos. Possuem flores zigomorfas dispostas em cachos (inflorescência) axilares que variam de cor, de acordo com a espécie e subespécie. Seus frutos são vargens achatadas deiscentes (LORENZI; MATOS, 2002).

Análises direcionadas à fotoquímica das plantas do gênero *Bauhinia* L. apontam como principais constituintes os glicosídeos esteróidicos, triterpenos, lactonas e flavonóides (CECHINEL FILHO, 2000).

Para Elgorashi e colaboradores (2003) e Arora e colaboradores (2005) os estudos de plantas medicinais tradicionalmente utilizadas são válidos nos seguintes aspectos: na pesquisa de drogas com potencial quimioterápico ou farmacológico e em medidas de segurança para o uso popular.

A atividade tóxica exercida por flavonóides parece ser extremamente rara para animais e humanos (KITAMURA *et al.*, 2003). Entretanto, na administração em doses crônicas tem-se observado relatos de reações adversas (JAENGER *et al.*, 1988).

Segundo Surh e Ferguson, (2003) os organismos de maneira geral estão sujeitos à presença de substâncias mutagênicas, algumas de origem natural como os fitoterápicos e outras sintéticas como os fármacos.

Substâncias que lesam ou danificam o DNA são chamadas de genotóxicas e na ausência de reparo após o processo de divisão celular são denominadas como mutagênicas. Estas lesões podem afetar de forma vital os processos relacionados à manutenção da própria molécula (DNA) quanto da célula (COSTA; MENK, 2000).

Dentre as metodologias avaliativas em mutagênese o Teste do Micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais empregado, o qual permite a detecção de agentes clastogênicos e agentes aneugênicos (MACGREGOR *et al.*, 1987; HAYASHI *et al.*, 1994).

Uma alternativa para rastreamento indicativo de atividade tóxica é a utilização de peixes como biomonitores, pois estes respondem aos agentes tóxicos de forma semelhante aos vertebrados superiores (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

Para Al-Sabti (1991) os peixes são excelentes biomonitorios para os estudos avaliativos do potencial mutagênico e/ou carcinogênico, uma vez que os mesmos conseguem metabolizar, concentrar e armazenar substâncias contaminantes na água.

Kumar e colaboradores (1995) destacam a utilização da espécie *Poecilia reticulata* (*P. reticulata*) em testes de toxicidade, devido à ótima capacidade de adaptação as condições de laboratório, sendo apontada, em APHA (1998), como organismo teste.

Visando a obtenção de novas informações, aos estudos de toxicologia de plantas medicinais e fitoterápicos, este trabalho teve como objetivo a avaliação do possível potencial mutagênico e citotóxico do infuso de folhas de *Bauhinia L. sp.* em eritrócitos de *P. reticulata*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório Núcleo de Pesquisas Replicon vinculado ao Departamento de Biologia e ao programa de Mestrado em Genética, localizados no campus I da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás).

### • *Preparo do Infuso de Folhas de Bauhinia L. sp.*

Para o preparo do infuso, foram coletadas folhas de *Bauhinia L. sp.* localizadas no campus I na área IV da PUC Goiás, as folhas foram desidratadas, maceradas e armazenadas em recipientes. O extrato aquoso foi preparado através do método de infusão, despejado o farmacógeno em água fervente seguida da homogeneização.

### • *Coleta dos espécimes P. reticulata*

Os espécimes de *P. reticulata* foram coletados no mês de maio no ano de 2012 no lago do Instituto Trópico Subúmido da PUC Goiás, seguido do armazenamento em recipientes com água e transposição para os aquários, respeitando o tempo mínimo de sete dias, para a observação das condições de saúde dos peixes, visando à recuperação do estresse provocado pelo transporte.

### • *Teste CL<sub>50/48h</sub>*

A CL<sub>50</sub> é um teste que tem por finalidade, indicar ou sinalizar uma concentração que tenha efeito letal em 50% dos organismos expostos por um período de tempo (MATIAS *et al.*, 2006).

Para a determinação da CL<sub>50/48h</sub> foram coletados espécimes *P. reticulata* adultos de aproximadamente 60 dias, aclimatados por uma semana em aquários (MURTY, 1988b), distribuídos em no máximo um grama de peixe para cada litro de água (IBAMA, 1987). Utilizou-se nos testes de CL<sub>50/48h</sub> 10 peixes para cada concentração e o controle negativo sendo inicialmente utilizada a concentração de 50 g.L<sup>-1</sup>.

A CL<sub>50/48h</sub> para o infuso de folhas de *Bauhinia L. sp.* em *P. reticulata* foi determinada através do auxílio do software *Trimmedp Spearman-Karber* versão 1.5 (HAMILTON *et al.*, 1977) estabelecendo-se em 26,75 g.L<sup>-1</sup>.

### • *Teste Micronúcleo*

A metodologia foi realizada conforme Heddle (1973), apresentando modificações. Primeiramente, os peixes foram expostos durante 48 horas às diferentes concentrações do extrato aquoso de *Bauhinia L. sp.*, sendo depois eutanasiados, para logo em seguida a coleta do sangue da região branquial, depositado- os em tubos eppendorfs homogeneizando-os com 100 µL de soro fetal bovino. A confecção das lâminas ocorreu através do método de esfregaço sanguíneo, passando em sequência por um período de secagem (*overnight*). Depois, elas são fixadas em etanol absoluto e coradas com o corante hematológico rápido segundo as recomendações do fabricante, para análise.

A análise ocorreu por meio do uso de aparelhos de microscopia óptica, permitindo a contagem e registro de alterações. Foram observadas 4000 células por tratamento sendo 1000 por indivíduo, quantificando-se a frequência de micronúcleos e de alterações eritrocíticas nucleares (AENs).

### • *Análise estatística*

Para os cálculos estatísticos, empregou-se o software *BioEstat*<sup>®</sup> 5.0. Quando os dados apresentaram uma distribuição não paramétrica, foi necessário o emprego de testes específicos, segundo Sheats e Pankratz (2002). Para a contagem de micronúcleos e AENs, optou-se pelo teste não paramétrico de análise de variância Kruskal-Wallis.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações utilizadas nos tratamentos para o teste micronúcleo foram obtidas a partir do teste  $CL_{50/48h}$ , sendo esta determinada em 26,75 g.L<sup>-1</sup> empregando-se de 10 a 60% da mesma.

Por meio da análise em microscopia óptica, verificou-se o número de alterações nas células. Porém, os resultados obtidos para as variáveis micronúcleos e AENs não apresentaram diferenças significativas pelo teste Kruskal-Wallis ( $p=0,7231$  e  $p=0,8057$ ). Em alguns casos, obteve-se grande dispersão dos dados devido à presença de valores extremos (Tabela 1).

Tabela 1: Frequência de micronúcleos e AENs em eritrócitos de *P. reticulata* expostos ao infuso de folhas de *Bauhinia L. sp.*

Concentração g.L <sup>-1</sup>	Número de células Analisadas	Micronúcleos		AENs	
		Frequência (%)	Total de Micronúcleos	Frequência (%)	Total de AEN's
16,05	4000	0,10	4	0,10	4
10,7	4000	0,10	4	0,05	2
5,35	4000	0,08	3	0,08	3
2,67	4000	0,05	2	0,08	3
0*	4000	0,05	2	0,05	2

A determinação de padrões seguros para o consumo de produtos naturais é de grande importância na sociedade, pois a toxicidade é uma grande limitação no desenvolvimento de medicamentos (STANGE *et al.*, 2009). Sendo a ausência de toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, fator positivo para a população devido à maior segurança no consumo de medicamentos sejam eles naturais ou sintéticos.

Os resultados deste estudo não indicaram a atividade mutagênica e citotóxica do infuso de folhas de *Bauhinia L. sp.* em eritrócitos de espécimes *P. reticulata*, pois, as frequências entre o grupo exposto e o controle negativo, apresentaram-se próximas. Esta observação foi confirmada através do teste de análise de variância Kruskal-Wallis, demonstrando ausência de significância.

Os estudos realizados por Macedo e colaboradores (2008), o qual se fez em sistema *in vitro* DNA plasmidial, e *in vivo*, em procariotos e em eucariotos (*teste Allium Cepa*) expostos a diferentes concentrações do infuso de folhas de *Bauhinia monandra sp.*, não foram observadas atividades mutagênicas e citotóxicas, ocorrendo entretanto, a atividade genotóxica nas concentrações mais elevadas. Em outros, Sisenando (2009) verificou diminuições de mutações espontâneas em cepas de *Escherichia coli* tratadas com lectina de folhas de *Bauhinia monandra sp.*, constatando um potencial antioxidante.

Em estudos de micronúcleos realizados com eritrócitos de medula óssea de roedores (ratos da linhagem Wistar) expostos ao extrato da planta *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba) por Stange e colaboradores (2009) não indicaram efeito mutagênico e citotóxico, porém, levantaram informações a respeito da fitoquímica da planta, indicando a presença de metabólitos secundários sendo uns deles os flavonóides, encontrados no gênero *Bauhinia L.* Este foi considerado por Camparoto e colaboradores (2002) um dos agentes responsáveis pela ausência de efeitos citotóxicos e mutagênicos em estudos com *Maytenus ilicifolia* e *Bauhinia candicans*.

Mesmo sabendo sobre a presença de metabólitos secundários em extratos de plantas, e supondo atividades relacionadas a toxidez dos mesmos, ainda não se compreende a maneira ou os mecanismos que esclareçam as atividades genotóxicas e citotóxicas destes metabólitos (FAGUNDES *et al.*, 2005), quanto também não se tem uma explicação bem elucidada a respeito dos mecanismos das ações reversas.

O consumo de plantas para fins terapêuticos é bastante difundido na sociedade. Entretanto, evidências de suas ações farmacológicas são na maioria das vezes desconsideradas devido à confiança que sociedade possui nos produtos naturais. Deixando evidente a carência de divulgações de políticas de orientações de consumo, e de programas de incentivo a pesquisa, visando o emprego de padrões seguros para o uso.

### Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo não indicaram atividade mutagênica e citotóxicas do infuso de *Bauhinia L. sp.* para as concentrações testadas, considerando que o mesmo não abordou todos os parâmetros de análise ponderando exclusivamente um tipo de biomonitor. A realização de outras metodologias voltadas à investigação toxicológica de *Bauhinia L. sp.* são necessárias para complementar a compreensão do seu potencial toxicológico, surge como uma abordagem comparativa de informações entre os estudos.

É importante ressaltar que mesmo não indicando efeitos mutagênicos e/ou citotóxicos a análise realizada não prescreve certeza de segurança para o consumo de plantas do gênero *Bauhinia* L., pois não envolveu um monitoramento respectivo a uma exposição crônica, a qual se supõe o desempenho de efeitos adversos, e também pelo fato de estender-se a um único tipo de organismo.

Para que ocorra uma maior compreensão dos eventos de toxicidade, é relevante, que também sobrevenham os estudos dos mecanismos responsáveis pelas atividades tóxicas e também pelas ações repressoras (quando presentes), sendo até então, uma área pouco explorada em se tratando de plantas do gênero *Bauhinia* L.

#### EVALUATION OF POSSIBLE MUTAGENIC POTENTIAL OF *Bauhinia* L. sp.

*Abstract: the genus Bauhinia L. have been employed in human society empirically for therapeutic purposes, not examined the existence of events toxicity. This study aimed to evaluate the possible cytotoxic and mutagenic potential of Bauhinia L. sp. by biomonitor Poecilia reticulata. The results of this study did not show significance in the variables, and changes erythrocytic micronucleus total tested.*

*Keywords: Medicinal plant. Micronucleus. Paw-of-cow. Cytotoxicity.*

#### Referências

ABIFISA, 2010. Disponível em: <[http://www.abifisa.org.br/noticias\\_ver.asp?news=3594](http://www.abifisa.org.br/noticias_ver.asp?news=3594)>. Acesso em: 08 dez. 2012.

AL-SABTI, K. Handbook of Genotoxic Effects and Fish Chromosomes. Jozef Stefan Institute. Slovenia: Jamova, 1991.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat. Res.* 343. Ljubljana (Slovenia), p. 121 -135, 1995.

APHA - American Public Health Association; AWWA – American Water Works Association; WPCF – Water Pollution Control Federation. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20. ed. Washington DC.,1998.

ARAUJO, A. A. S. et al. Determinação dos teores de umidade de cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 42, n. 2, 2006.

ARORA, S. et al. Evaluation or genotoxicity of medicinal plant extracts by the comet and Vitotox (R) tests. *J. Environ Pathol Toxicol Oncol.*, Punjab (India), v. 24, 2005.

CAMPAROTO, M. L. et al. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bonemarrow cells. *Genetics and Molecular Biology*. Brazilian Society of Genetics, Maringá, v. 25, p. 85 -89, 2002.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos. *Quim. Nova*. Itajaí (SC), v. 23, 2000.

COSTA, R. M. A MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. *Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento*, São Paulo, v. 2, n. 12, p. 24 -26, 2000.

- Química e Potencial farmacológico. *Quim. Nova*, Itajaí, v. 25, n. 3, p. 449 -454, 2002.
- ELGORASHI, E. E. et al. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. *Toxicol Lett.*, Belgium, v. 143, p. 195-207, 2003.
- FAGUNDES, F. A. et al. Annona coriacea induz efeito genotóxico em camundongos. *Rev Eletron Farmacia*, Goiânia, v. 2, p. 24 -29, 2005.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman – Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Techno*, v. 7, p. 714 –719, 1977.
- HAYASHI, M.; TICE, R. R.; MACGREGOR, J. T. In vivo rodent erythrocyte micro-nucleus assay. *Mutation Research*, Tokyo, v. 312, p. 293 -304, 1994.
- HEDDLE, J. A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutation Research*. San Francisco, v.18, 187-190, 1973.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasil, Ministério do Meio Ambiente. Avaliação da toxicidade aguda para peixes. In: Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília, p. 20 -32, 1987.
- JAEGER, A.; WALTI, M.; NEFTEL, K. Plant Flavonoids in: *Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular, and Medical Properties*. New York, p. 379 – 394, 1988.
- KITAMURA, Y. et al. A subchronic toxicity study of shea nut color in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 41, n. 11, p. 1537-1542, 2003.
- KUMAR, S.; SAHAY, S. S.; SINHA, M. K. Bioassay of distillery effluent on common guppy, *Lebistes reticulatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, Bhagalpur, v. 54, p. 309-316, 1995.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas. *Instituto Plantarum*, Nova Odessa: 2002.
- MACEDO, M. F. S. et al. Determining the genotoxicity of an aqueous infusion of *Bauhinia monandra* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Natal, v. 18, n. 4, p. 509 -516, 2008.
- MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M. Guidelines for the conduct of micro-nucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*, Berkeley, v. 189, p. 103 -112, 1987.
- MATIAS, W. G. et al. Avaliação da toxicidade aguda de fluidos de corte utilizados em processos de usinagem usando como organismos-teste *Poecilia reticulata* e *Daphnia magna*. *Revista Biotemas*, Florianópolis, v. 19, n. 3, p. 7 -13, 2006.
- MENEZES, F. S. et al. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 08-13, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS). Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 09 dez. 2012.
- MURTY, A. S. Toxicity of pesticide to fish. *CRC Press*. United States, v. 2, 1988.
- SANTOS, F. V. *Avaliação da mutagenicidade in vivo e in vitro de compostos obtidos de plantas nativas do cerrado*. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP Araraquara, 2006.
- SHEATS, R. D.; PANKRATZ, V. S. Understanding distributions and data types. *Semin Orthod.*, Rochester (USA), v. 8, n. 2, p. 62-66, 2002.

SISENANDO, H. A. A. C. N. Avaliação do potencial de mutagenicidade e toxicidade da lectina hipoglicemiante de folha de *Bauhinia monandra* (Pata-de-vaca). 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

STANGE, V. S. et al. Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto, por meio de bioensaios *in vivo* e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), Cecropiaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Vitória, v. 19, n. 2B, p. 637-642, 2009.

SURH, Y.; FERGUSON, L. R. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential – highlights of a symposium. *Mutation Research*, Seoul, v. 523, n. 4, p. 1 -8, 2003.

VAZ, A. M. S. F.; TOZZI, A. M. G. A. Sinopse de *Bauhinia* sect. *Pauletia* (Cav.) D.C. (Leguminosae: Caesalpinoideae: Cercideae) no Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, Campinas, v. 28, p. 477-491, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas Medicinais: Cura Segura? *Quim. Nova*, Rio de Janeiro, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

\* Recebido em: 11.11.2014. Aprovado em: 20.11.2014.

JOÃO ANTÔNIO XAVIER MANSO

Biólogo pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás). Integrante do Núcleo de Pesquisas Replicon.

ALEX LUCAS HANUSCH

Biólogo pela PUC Goiás. Integrante do Núcleo de Pesquisas Replicon.

CLÁUDIO CARLOS DA SILVA

Doutor em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal de Goiás. Professor na PUC Goiás desde 2002.

APARECIDO DIVINO DA CRUZ

Doutor em Biologia Molecular pela University of Victoria – BC, Canadá . Professor Titular nos Departamentos de Biologia e Medicina da PUC Goiás. Biomédico pela PUC Goiás. Biomédico Geneticista da Secretaria de Estado da Saúde de Goiás.

DAMIANA MÍRIAN DA CRUZ E CUNHA

Bióloga. Especialista em Genética pela PUC Goiás. Professora no Departamento de Biologia da PUC Goiás.