

Avaliação da Atividade Genotóxica e Antigenotóxica do Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*)

Assessment of Genotoxic and Antigenotoxic Activity of Barbatimão Stryphnodendron adstringens

Dwight Assis Chaves¹, Susy Ricardo Lemes¹, Maria Alice Montes de Sousa², Eloíza Gonçalves Antônio da Rocha Souza³,
Lilhian Alves de Araújo⁴, Fátima Mrué⁵, Paulo Roberto de Melo-Reis⁴

1 Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade. Universidade Federal de Goiás. Av. Esperança Vila Itatiaia, Campus II – Samambaia. CEP 74001-970, Goiânia, GO, Brasil.

2 Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde. Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO). Área V, Campus I, Rua 232, nº 128, 3º andar, CEP 74605-140, Goiânia, GO, Brasil.

3 Faculdade Morgana Potrich. Segunda Avenida, nº 58, Centro, CEP 75830-000, Mineiros - GO, Brasil.

4 Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos, Rua 232, nº 128, 3º andar, CEP 74605-140, Goiânia-GO, Brasil.

5 Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas; Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde; Pontifícia Universidade Católica de Goiás; 1ª Avenida, nº1069 - Setor Leste Universitário, CEP 74605-020, Goiânia - GO, Brasil

Resumo: o Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) é uma planta medicinal encontrada no bioma Cerrado e apresenta importantes atividades farmacológicas tais como: anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante. Neste estudo, o objetivo foi investigar a atividade genotóxica e antigenotóxica da solução aquosa do barbatimão (SAB). Foi realizado o teste do micronúcleo em medula óssea de 20 camundongos. Para obtenção da SAB foram utilizadas 30g da casca triturada em um litro de água, com uma concentração final de 30mg/mL. Os resultados demonstraram que a dose de 30 mg.ml⁻¹ peso corporal da SAB apresentou diferença ($p < 0,05$) na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em comparação com o grupo controle negativo, evidenciando uma atividade genotóxica desta solução. No entanto, estes dados não são concludentes, sendo necessários outros experimentos para esclarecer os reais mecanismos de ação do barbatimão, juntamente com seus princípios ativos, a fim de que seu uso seguro seja estabelecido.

Palavras-chave: Genotóxica. Antigenotóxica. *Stryphnodendron adstringens*. Micronúcleo.

Abstract: barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) is a medicinal plant found in the Cerrado biome and has important pharmacological activities such as: anti-inflammatory, analgesic and cicatrizant. In this study, the objective was to investigate the genotoxic and antigenotoxic activity of barbatimão aqueous solution (SAB). The micronucleus test was performed in bone marrow of 20 mice. To obtain SAB, 30 g of crushed bark were used in one liter of water, with a final concentration of 30 mg / mL. The results showed that the dose of 30 mg.ml⁻¹ body weight of SAB showed a difference ($p < 0,05$) in the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes compared to the negative control group, evidencing a genotoxic activity of this solution. However, these data are not conclusive, and other experiments are needed to clarify the real mechanisms of action of barbatimão, along with its active principles, so that its safe use is established.

Keywords: Genotoxic. Antigenotoxic. Barbatimão. Micronucleus

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais apresentam várias substâncias descritas na literatura como mutagênicas e carcinogênicas. Dentre elas estão as hidrazinas, flavonoides, furocumarinas, quinonas, alcalóides de pirrolozidina, glicosídeos cardiotônicos e teobrominas^{1,2}. Entretanto, algumas substâncias, como os alcalóides, apesar de sua conhecida genotoxicidade, apresentam alto potencial farmacológico através de atividades antimicrobiana, antiplasmodial e antitumoral³.

A principal porta de entrada de agentes mutagênicos para as substâncias originadas das plantas medicinais é por via oral, através de chás, infusões e outros preparados. Vários testes são realizados para prevenir o efeito adverso em plantas medicinais pela triagem de seu potencial genotóxico. São eles testes rápidos, realizados especialmente com bactérias, drosófila, camundongos (teste de micronúcleo) e cultura de células⁴.

O teste do micronúcleo é abundantemente utilizado para o acompanhamento de danos genotóxicos em populações expostas a substâncias mutagênicas e carcinogênicas. A frequência de Micronúcleos (MN) analisada em um determinado momento pode ser apontada complexa entre a atividade genotóxica e a eficiência do mecanismo fisiológico de defesa do organismo teste^{5,6}.

Considerando, portanto, o amplo uso das plantas medicinais pela população, ressalta-se que a maioria dessas substâncias vegetais ainda não foi estudada no que se refere ao potencial citotóxico e genotóxico, sendo de grande importância que estudos relativos a estas propriedades sejam conduzidos minimizando riscos e garantindo segurança⁷.

Dentre os inúmeros vegetais com atividade biológica, destaca-se o barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), o qual possui amplo uso popular no tratamento da leucorreia, diarreia, hemorragia, hemorroida, cicatrização de feridas, conjuntivite, inflamação da garganta e úlcera gástrica⁸⁻¹⁰. As folhas, cascas e raízes são comumente utilizadas para formulação de extratos^{8,9}. Além disso, o barbatimão também é aplicado no curtimento de couro, na fabricação de tintas, na indústria madeireira e como planta ornamental.

Diante disso, este estudo foi desenhado com o objetivo de avaliar as atividades genotóxica e antigenotóxica da solução aquosa da casca do barbatimão, pelo tratamento simultâneo do extrato da

planta e de composto Mitomicina C (MMC), utilizando-se o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Solução aquosa da casca do barbatimão (SAB)

A casca de Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) foi adquirida na cidade de Goiânia-GO, no Império das Raízes, Av. Tocantins, nº 840, Setor Central, lote: 22112, data de fracionamento: 12/2013, validade: 12 meses. A solução aquosa de barbatimão foi preparada no Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos-MCAS-PUC-Goiás, sendo 30g da casca triturada diluída em 1 litro de água (concentração final: 30mg mL⁻¹).

2. Animais da experimentação

Para o teste do micronúcleo foram utilizados 20 camundongos hígidos, oriundos do biotério da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, apresentando peso corpóreo entre de 25,0 ± 2,5 g e faixa etária entre 50 e 70 dias. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de polipropileno, com piso sólido, forradas com maravalha esterilizada, conforme padrões internacionais. Os animais foram acomodados em ambiente com temperatura média de 242°C e umidade relativa de 555%; com ciclo de claro-escuro de 12 horas e tiveram água e alimentação *ad libitum*. Foi utilizada a mitomicina C (MMC) como controle positivo. O experimento deu-se início após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, protocolo nº 003-1.

3. Controles e reagentes (Teste do micronúcleo)

- Soro fetal bovino de Laborclin Produtos para Laboratórios.
- Corante para células hematológicas segundo Leishman (eosina, azul de metileno), preparados no LAS-CBB.
- Controle positivo - Mitomicina C (MMC), Bristol-Myers Squibb, 5mg, Lote no 360.170.2, fabricação: 26/03/2013, validade: 28/02/2015.
- Controle negativo - Água destilada estéril;

4. Procedimento Experimental

Os camundongos foram divididos em grupos de cinco animais e tratados em dose única, via intraperitoneal (i.p.), com solução aquosa de barbatimão na concentração de 30 mg.ml⁻¹. Os animais do grupo controle negativo foram tratados com água destilada estéril, enquanto que o grupo controle positivo recebeu mitomicina C - MMC (4 mg.kg⁻¹). Para a avaliação da antigenotoxicidade, foram administradas via i.p. as doses de 30 mg.ml⁻¹ de solução aquosa de barbatimão em concomitância com a MMC (4 mg.kg⁻¹)¹¹.

Decorridas 24 horas após os tratamentos, todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os fêmures retirados. As epífises do fêmur foram cortadas e a medula óssea lavada com 1 ml de soro fetal bovino. Após homogeneização da medula no soro, esta foi centrifugada a 300 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi parcialmente descartado. O precipitado de células foi homogeneizado e uma gota de suspensão celular foi transferida para a lâmina de vidro onde foi confeccionado o esfregaço celular. Após secagem das lâminas, estas foram fixadas em metanol absoluto durante 5 minutos e coradas em solução corante de Leishman, por um período de 15 minutos¹².

Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar em temperatura ambiente. As contagens dos esfregaços foram realizadas pelo procedimento “duplo-cego”, utilizando microscópio de luz comum Nikon, com a finalidade de se detectar possíveis alterações e/ou perdas cromossômicas (micronúcleos) nos eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea dos animais submetidos aos diferentes tratamentos.

As células foram visualizadas em objetiva de imersão (100x) e ocular (10x), usando duas lâminas para cada animal, avaliando-se 1000 EPC por lâmina. Foi utilizada a média de duas lâminas como resultados. Para a avaliação da citotoxicidade, foram contados até 1.000 eritrócitos normocromáticos (ENC), além do cálculo da razão entre EPC/ENC^{13,14}.

5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software BioStat, versão 5.0. As frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em 1.000 EPC de cada grupo foram comparadas em relação ao grupo controle negativo ou positivo pelo teste de ANOVA e todos os pares foram comparados pelo teste de Friedman. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Para a avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica da SAB foi realizado o teste de micronúcleo na medula óssea hematopoiética de camundongos. Os resultados da frequência de MNEPC, média, desvio padrão e relação EPC/ENC para a atividade genotóxica e antigenotóxica estão representados nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Na tabela 1 observa-se que a dose da solução aquosa da casca de barbatimão (30 mg.ml⁻¹ peso corporal) apresentou diferença significativa ($p < 0,05$.) na frequência de EPCMN em comparação com o grupo controle negativo. Em relação ao grupo controle positivo as diferenças também foram significativas ($p < 0,05$).

Tabela 1. Frequência de MNEPC e relação entre EPC/ENC após 24 horas do tratamento com óleo do pequi e controles.

Tratamentos	Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (MNEPC)			Relação EPC/ENC
	Dados Individuais MN /1000EPC	%	Média ± Desvio Padrão MN/1000 EPC	
SAB *	7-5-8-7-8	0,7	7 ± 1,09 ^a	0,77 ^a
H ₂ O (CN) **	2-3-3-5-4	0,34	3,4 ± 1,01 ^b	0,89 ^b
MMC (CP) ***	19-17-15-17-16	1,68	16,8 ± 1,32	0,57 ^c

Legenda: ^{a,b,c} $p > 0,05$. Todos os resultados (teste e controle negativo) foram comparados com o grupo controle negativo. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado indicativo de significância. * Solução aquosa de barbatimão + MMC; ** Controle negativo: água destilada; *** Controle Positivo: MMC (4mg. kg⁻¹ peso corporal).

Na tabela 2 observa-se que não houve uma atividade antigenotóxica da SAB administrada concomitantemente com dose de mitomicina C. Na comparação da frequência de EPCMN da dose do tratamento de

SAB+MMC em concomitância com o controle positivo, não houve diferença significativa ($p>0,05$). Em relação ao grupo controle negativo, as diferenças foram significativas ($p<0,05$).

Tabela 2. Frequência de MNEPC e relação entre EPC/ENC após tratamento simultâneo com MMC e da solução aquosa do barbatimão.

Tratamentos	Eritrócitos policromáticos micronucleados (MNEPC)			Relação EPC/ENC
	Dados Individuais MN /1000EPC	%	Média ± Desvio Padrão MN/1000 EPC	
SAB + MMC *	15-13-10-12-11	1,22	12,2 ± 1,72 ^a	0,61 ^a
H ₂ O (CN) **	2-3-3-5-4	0,34	3,4± 1,01	0,89 ^b
MMC (CP) ***	19-17-15-17-16	1,68	16,8± 1,32 ^a	0,57 ^a

Legenda: ^a $p>0,05$. ^b $p<0,05$. Todos os resultados (teste e controle negativo) foram comparados com o grupo controle positivo. O valor de $p\leq 0,05$ foi considerado indicativo de significância. * Solução aquosa de barbatimão + MMC; ** Controle negativo: água destilada; *** Controle Positivo: MMC (4mg. kg⁻¹ peso corporal).

DISCUSSÃO

Alguns vegetais podem exercer efeitos tóxicos devido aos diferentes compostos naturais derivados de seu metabolismo primário e secundário, os quais são responsáveis pelos efeitos terapêuticos¹³. Os órgãos responsáveis pela entrada de novos fitoterápicos no mercado, Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) no Brasil e FDA (Food 53 and Drug Administration) órgão governamental dos Estados Unidos da América, são responsáveis por testes e estudos criteriosos de novos fármacos, exigindo que a normatização de medicamentos fitoterápicos seja válida. Assim, garante-se a população, comprovação da eficácia e segurança do produto derivado de plantas medicinais. Neste sentido, os ensaios que visam avaliar a toxicidade de tais princípios ativos são de grande relevância¹⁵.

A solução aquosa de barbatimão apresentou atividade genotóxica na dose 30 mg ml⁻¹ testada, pois foi encontrada uma significância ($p<0,05$) na frequência de EPCMN em relação ao grupo controle negativo. Em relação ao grupo controle positivo as diferenças também foram significativas ($p<0,05$). Outro estudo realizado com extrato do barbatimão, detectou por meio de ensaio MN que este não foi possui efeito genotóxico em células da medula óssea de camundongos quando testados nas doses 750, 1500, 2250 mg/kg¹⁶.

No presente estudo não foi constatada uma ação antigenotóxica, pois a média de micronúcleo encontra-

da quando tratados com apenas MMC foi de: 16,8. Já quando tratados com a mesma SAB+MMC a media de micronúcleo caiu apenas para: 12,2 não apresentando diferença significativa ($p>0,05$). Com relação ao grupo controle negativo as diferenças foram significativas ($p<0,05$).

O extrato do barbatimão quando administrado na dose de 40mg/kg juntamente com a ciclofosfamida (fármaco indutor de mutagênese, efeito semelhante ao da MMC), apresenta atividade antigenotóxica em virtude de uma redução no percentual de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPMN) em relação ao controle positivo (ciclofosfamida), sendo estes dados semelhantes ao controle negativo (água destilada)¹⁶.

Os estudos realizados neste trabalho mostraram que o barbatimão apresentou atividade genotóxica com um aumento na quantidade de MN pela aplicação da Mitomicina+barbatimão. Ensaios realizados em cultura de Escherichia coli, por meio de testes in vitro, SOS cromoteste e SOS-inducteste, demonstram que o extrato etanólico da casca de barbatimão nas doses de 0,25; 0,5;1,0; 5,0 e 10 mg/placa ou tubo de cultura, possui efeito genotóxico. Através da metabolização do extrato etanólico do barbatimão há uma diminuição das atividades genotóxicas e citotóxicas. No entanto, estes dados não são concludentes, sendo necessários outros experimentos para esclarecer os reais mecanismos de ação do barbatimão, a fim de melhor concluir seu potencial risco para o consumo humano¹⁷.

Os dados de um estudo de mutagênese utilizando extrato do barbatimão (concentrações de 66%, 75% e 100%) através do teste de mancha da asa de *Drosophila melanogaster*, para investigação de mutação e recombinação somática – SMART demonstraram ausência de diferenças estatisticamente significativas nas frequências pontuais entre os controles e as séries tratadas. Para o teste de perda de anel X, não foram observados aumentos estatisticamente significativos nas perdas do anel, sugerindo que o extrato da casca do caule do barbatimão nas concentrações citadas não apresenta atividade genotóxica em células somáticas e germinativas de *D. melanogaster*¹⁸.

Diante dos achados deste estudo, concluiu-se que extrato da casca do barbatimão apresentou atividade genotóxica na dose 30 mg ml⁻¹. Sugerem-se pesquisas complementares que possam tornar sua viabilidade como novo fármaco, diferente do que se tem hoje disponível no mercado farmacêutico e, principalmente, direcionar estas novas pesquisas do barbatimão juntamente com mais princípios ativos, trabalhando o barbatimão em conjunto com outras plantas, potencializando ou não sua atividade genotóxica comprovada neste estudo.

REFERÊNCIAS

1. KHAN, T. H., ANURADHA, L. P. & SULTANA, S. S. 2005. Soy isoflavones inhibits the genotoxicity of benzo(a)pyrene in Swiss albino mice. *Human & Experimental Toxicology*. 24: 149-155.
2. MEI, N., GUO, L., FU, P. P., HEFLICH, R. H. & CHEN, T. 2005. Mutagenicity of comfrey (*Symphytum officinale*) in rat liver. *British Journal of Cancer* 92: 873-5.
3. FREDERICH, M., HAYETTE, M.-P., TITS, M., DE MOL, P. & ANGENOT, L. 1999. Vitro activities of Strychnos alkaloids and extracts against Plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2328-331.
4. CUNHA, K.S., CAMPESATO, V. R., REGULY, M. L., GIMMIER-LUZ, M. C., GRAF, U. & ANDRADE, H. H. 1995. Tanic Acid is not Mutagenic in Germ Cells but Weakly Genotoxic in Somatic Cells of *D. Melanogaster*. *Mutagenis* 10(4): 291-95.
5. MERSCH, J., BEAUVAIS, M. N. & NAGEL, P. 1996. Induction of micronucleus in haemocytes and gill cell of zebra mussels, *Dressena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutation Research*, 371: 47-55.
6. ASSUNÇÃO, L. A., LEMES, S. R., ARAÚJO, L. A., COSTA, C. R., MAGALHÃES, L. G., MOURA, K. K. & MELO-REIS, P. R. 2015. Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic activities of sucupira oil (*Pterodon emarginatus*). *Genetics and Molecular Research* 14 (2): 6323-6329.
7. BAGATINI, M. D., SILVA, A. C. F. & TEDESCO, S. B. 2007. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17(3): 444-447.
8. EURIDES, D., FRANCO, L. G., MOURA, M. I., CAMPOS, S. B. S. & FREITAS, S. L. R. *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville. 2010. In: Silva, L. A. F., Eurides, D., Paula, J. R., Lima, C. R. O. & Moura, M. I. *Manual do barbatimão*. Kelps, Goiânia. Pp. 69-78
9. LIMA, C. R. O. 2010. *Reparação de feridas cutâneas incisionais em coelhos após o tratamento com barbatimão e quitosana*. Dissertação de Mestrado, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 104 p.
10. HERNANDES, L., PEREIRA, M. S. L., PALAZZO, F. & MELLO, J. C. P. L. 2010. Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 46(3): 431- 436.
11. HEDDLE, J. A., CIMINO, N. C., HAVASHI, M., ROMAGNA, F., SHELBY, M. D., TUCKER, J. D., VANPARYS, P. & MacGREGOR, J. T. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 18: 277-291.

12. HEDDLE, J. A. 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research* 18: 187-190.
13. ALMEIDA, A. C., SOBRINHO, E. M., PINHO, L., SOUZA, P. N. S., MARTINS, R., DUARTE, E. R., SANTOS, H. O., BRANDI, I. V., CANGUSSU, A. S. & COSTA, J. P. R. 2009. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. *Ciência Rural* 40(1): 200-203.
14. MELO-REIS, P. R., BEZERRA, L. S. A., VALE, M. A. A. B., CANHÊTE, R. F. R. & CHEN-CHEN, L. 2011. Assessment of the mutagenic and antimutagenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex by micronucleus test in mice. *Brazilian Journal of Biology* 71(1): 169-174.
15. TUROLLA, M. S. R. & NASCIMENTO, E. S. 2006. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 42(2): 289-306.
16. COSTA, M. A., ISHIDA, K., KAPLUM, V., KOSIVK, E. D., MELLO, J. C., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS-FILHO, B. P. & NAKAMURA, C. V. 2010. Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) for use as a pharmacological agent. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 58: 330–335.
17. VILAR, J. B. D'OLIVEIRA, M. I. P., SANTOS, S. C. & CHEN, L. C. 2010. Cytotoxic and genotoxic investigation on barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, (1910) extract. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 46(4): 687-694.
18. SOUSA, N. C., CARVALHO, S., SPANÓ, M. A., & GRAF, U. 2003. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41:293-299.