

Ensaio de atividade antimicrobiana *in vitro* e mutagênica *in vivo* com extrato de *Vernonia polyanthes* Less (Assa-peixe)

Analysis on the *in vitro* antimicrobial activity and *in vivo* mutagenicity by using extract from *Vernonia polyanthes* Less (Assa-peixe)

RIALA6/1344

Giovanna Vallim JORGETTO¹, Marcelo Fabiano Gomes BORIOLO², Lucimara Maria SILVA², Denismar Alves NOGUEIRA³, Thiago Donizete da Silva JOSÉ³, Grazielle Esteves RIBEIRO³, Nelma de Mello Silva OLIVEIRA³, João Evangelista FIORINI³

*Endereço para Correspondência: Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos, Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Rodovia MG 179, Km 0, Alfenas, MG, Brasil, CEP: 37130-000, tel: 35 3299-3201, e-mail: microrganismo@unifenas.br

¹Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Poços de Caldas, MG, Brasil.

²Laboratório de Genética, Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Alfenas, MG, Brasil.

³Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos, Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Alfenas, MG, Brasil.

Recebido: 23.02.2010 – Aceito para publicação: 31.03.2011

RESUMO

Neste estudo foram analisados os efeitos do extrato hidroalcoólico de *Vernonia polyanthes* Less (Assa-peixe) sobre crescimento e diferenciação celular do protozoário *Herpetomonas samuelpessoai*, a susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*, a dose letal média (DL₅₀) e a mutagenicidade *in vivo* (teste do micronúcleo). A inibição do crescimento de *H. samuelpessoai* foi evidenciada, quando exposto às concentrações crescentes do extrato, embora sem aparecimento de forma diferenciada de opistomastigota, em percentual relevante. As linhagens-padrão de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Salmonella* Typhimurium mostraram halos de inibição quando expostas ao extrato de *V. polyanthes* Less. Contudo, os efeitos bacteriostáticos foram observados em *Bacillus cereus* (180,1 mg/mL), *Escherichia coli* (72,04 mg/mL) e *Proteus mirabilis* (144,08 mg/mL). A avaliação mutagênica do extrato de *V. polyanthes* Less revelou ausência e moderado efeito clastogênico e/ou aneugênico, respectivamente, nas dosagens de 1000 e > 1500 mg/Kg, independentemente do tempo de tratamento (24/48 h) e do sexo do animal. Tais resultados foram sugestivos de ocorrência de toxicidade sistêmica, em virtude de aumento de eritrócitos normocromáticos na medula óssea dos camundongos, que também ocorreram independentemente da dose, gênero e tempo de tratamento. Contudo, a ausência de DL₅₀ foi observada em todas as concentrações testadas (250-2000 mg/Kg).

Palavras-chave. susceptibilidade antimicrobiana, mutagenicidade, *Vernonia polyanthes* Less, diferenciação celular, fitoterápicos.

ABSTRACT

The effects of the hydroalcoholic extract from *Vernonia polyanthes* Less (Assa-peixe) were analyzed on the cellular growth and differentiation of the protozoan *Herpetomonas samuelpessoai*, the *in vitro* antimicrobial susceptibility, the LD₅₀, and the *in vivo* mutagenicity (micronucleus test). The growth inhibition of *H. samuelpessoai* was found when it was exposed to increasing concentrations of the extract, but without the percentually relevant emergence of the opisthomastigote forms. The pattern-strains *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Salmonella* Typhimurium showed inhibitory halo to *V. polyanthes* extract. However, the bacteriostatic effect was observed on *Bacillus cereus* (180.1 mg/mL), *Escherichia coli* (72.04 mg/mL) and *Proteus mirabilis* (144.08 mg/mL). The mutagenic evaluation of hydroalcoholic extract from *V. polyanthes* revealed a lack or moderate clastogenic effects and/or aneugenic at the concentrations of 1000 and > 1500 mg/Kg, respectively, independently of the treatment time (24/48h) and the animal gender. These results were suggestive of an occurrence of systemic toxicity due to the increase of normochromatic erythrocytes in mice bone marrow, independently at the treatment time, extract dose and animal gender. However, absence of DL₅₀ was observed in the all of tested concentrations (250-2000 mg/Kg).

Keywords. antimicrobial susceptibility, mutagenicity, *Vernonia polyanthes* Less, cell differentiation, phytotherapics.

INTRODUÇÃO

Vernonia polyanthes Less (*Asteraceae*), conhecida popularmente como “assa-peixe”, é uma planta típica da Mata Atlântica e é empregada na medicina popular para o tratamento de pneumonia, bronquite, cálculo renal¹, malária e febre². Levantamento etnofarmacológico apontou também o uso dessa espécie no tratamento de afecções gástricas³.

Estudo demonstrou que o extrato bruto de *V. polyanthes* apresenta os seguintes compostos: fenóis, taninos, chalconas, auronas, flavonoides, saponinas, ácidos fixos fortes, esteroides livres e quinonas sintetizados pelas plantas durante o chamado metabolismo secundário, apresentando diversas propriedades biológicas⁴.

Ensaios de diferenciação celular em tripanosomatídeos constituem parte do processo que leva a célula a se transformar, de modo reversível ou irreversível, envolvendo comandos em nível gênico. Essa transformação ou diferenciação celular tem sido amplamente avaliada com modelos eucarióticos unicelulares, utilizando-se extratos vegetais ou drogas sintéticas, objetivando contribuir com a elucidação desse complexo processo^{5,6}. Outros ensaios, com relação à ação dos extratos vegetais, são também utilizados para testes de atividade antimicrobiana. O uso indiscriminado de antibióticos tem gerado um grande número de micro-organismos resistentes; sendo assim, logo surgirá a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos. A fitoterapia tem sido extensamente estudada no desenvolvimento de medicamentos alternativos utilizados pela população através do conhecimento popular⁷.

O Brasil registra a maior biodiversidade vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas; no entanto, apesar do aumento de estudos fitoquímicos, os dados disponíveis revelaram que apenas 15 a 17% das plantas foram analisadas quanto ao seu potencial medicinal⁸.

Sendo a *V. polyanthes* utilizada em larga escala na medicina caseira, torna-se de fácil acesso à população por ser amplamente distribuída em quase todo o território brasileiro.

Dessa forma, o presente estudo teve por objetivos analisar os efeitos do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes* em um sistema eucariótico, utilizando o tripanossomatídeo *H. samuelpeessoai* como modelo, para avaliar alterações que possam ocorrer na diferenciação e crescimento desse flagelado; analisar o extrato sobre diversos tipos de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos quanto ao efeito antimicrobiano; determinar sua Dose Letal Média 50 (DL₅₀), além de testar

os efeitos clastogênicos e aneugênicos *in vivo*, utilizando o Teste do Micronúcleo em eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos *Swiss albinus*⁹.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta da amostra:

Folhas de *V. polyanthes* foram coletadas no Campus da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS (Alfenas/MG) e identificadas pelo Prof. Dr. Marcelo Pólo (Laboratório de Botânica, Universidade Federal de Alfenas/MG), sendo a exsicata depositada no herbário da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Minas Gerais, Brasil, sob a sigla Vp n° 203.

Obtenção do extrato bruto:

Após secagem, à temperatura ambiente, as folhas de *V. polyanthes* foram pesadas (1,0 Kg) e maceradas com etanol-água (70/30 v/v) à temperatura ambiente por 15 dias. O extrato hidroalcoólico foi filtrado e evaporado até *secura*, rendendo 0,7204 g de extrato cru¹⁰.

Obtenção do inóculo:

Para a realização de todos os experimentos o inóculo foi obtido a partir de culturas em fase logarítmica e comparável com o tubo 0,5 da Escala de Mac Farland, aproximadamente 1,5x10⁸ células/mL para bactérias e 1x10⁶ células/mL para leveduras¹⁰.

Micro-organismos utilizados:

Foram utilizadas as seguintes amostras microbianas: *Herpetomonas samuelpeessoai* (ATCC 30252), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Cryptococcus neoformans* (ICC 107 – sorotipo B), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615).

Experimentos de crescimento/diferenciação celular:

A diferenciação celular foi realizada em meio de cultivo quimicamente definido descrito por Roitman e colaboradores¹¹. Cerca de 10⁶ células foram incubadas juntamente com doses crescentes do extrato

hidroalcoólico de *V. polyanthes*, a 28 °C por 48 horas. Os percentuais de formas paramastigota, promastigota e opistomastigota foram determinados através de microscopia de luz, em lâminas coradas pelo método Panótico ou Giemsa. Pelo menos 200 células foram examinadas em cada preparação. O crescimento foi estimado pela contagem das células em câmara de Neubauer.

Atividade antimicrobiana:

A atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes* foi avaliada seguindo a técnica de difusão em Ágar Mueller – Hinton¹², em duplicata e repetidos pelo menos duas vezes. Foram utilizadas as concentrações de 36,02; 72,04; 108,06; 144,08; 180,1 e 216,12 mg/mL de extrato. As leituras dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano foram medidas em milímetros (mm), com auxílio de um paquímetro.

Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração microbicida mínima (CMM):

Para os ensaios da CIM e CMM foram realizadas diluições seriadas em tubos e plaqueadas em meio Brain Heart Infusion (BHI), para bactérias e meio Sabouraud Dextrose (SAB) para fungos¹³.

Dose letal média 50 (DL₅₀):

Foram utilizados seis grupos de camundongos *Swiss albinus* (n = 10 animais/grupo), pesando entre 27 e 36 gramas, provenientes do Biotério da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Campus de Alfenas, MG, que receberam, por via oral, dose única de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes* (250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 mg/Kg), segundo técnica já descrita na literatura¹⁴.

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 Schimd¹⁵ e modificada por Zambrano, Targa e Rabello-Gay¹⁶. O extrato de *V. polyanthes* foi testado separadamente empregando-se 3 doses, levando-se em consideração os dados obtidos na metodologia empregada para se estabelecer a DL₅₀ (i.e., 80%^{DL50}, 50%^{DL50} e 25%^{DL50}, ou ainda, ≤ 2.000 mg/Kg na inexistência de letalidade), e ensaiados em 3 doses (1000, 1500 e 2000 mg/Kg de peso corporal), selecionadas de acordo com as doses mínima e máxima que poderiam ser utilizadas em humanos. Cada ensaio foi realizado empregando-se 5 grupos de animais,

cada grupo constituído por 3 machos e 3 fêmeas: (1) controle negativo (NaCl 0,9%) administrado por gavagem; (2) controle positivo (50 mg/Kg de Etil-Nitroso-Ureia (ENU), Sigma N8509) administrado via intraperitoneal; (3) tratamento 01 (1000 mg/Kg) administrado por gavagem; (4) tratamento 02 (1500 mg/Kg) administrado por gavagem; (5) tratamento 03 (2000 mg/Kg) administrado por gavagem. Foram analisados ± 2000 eritrócitos policromáticos (PCE) por animal (camundongo *Swiss albinus*), para cada tempo de coleta (24 e 48 h) de tratamento, quanto à presença de micronúcleos (PCMN). A relação entre o número total de PCE e eritrócitos normocromáticos (NCE), obtidos da medula óssea, também foi avaliada, conforme modelo proposto por Margolin e Risko¹⁷. Embora o teste do micronúcleo forneça evidências de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos para determinada substância teste, o aumento da frequência de NCE, um valor significativamente decrescente na relação PCE/NCE em comparação com o controle negativo, é sugestivo de toxicidade sistêmica, bem como para medula óssea¹⁸. Este ensaio foi realizado seguindo as normas do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais (CEP/UNIFENAS, Campus de Alfenas, MG, Protocolo nº. 15/2007).

Análise estatística dos ensaios de ação antimicrobiana, diferenciação/crescimento celular e mutagenicidade:

Para os ensaios de ação antimicrobiana e diferenciação, foi utilizada estatística descritiva. Aos resultados obtidos nos ensaios de mutagenicidade foram empregados tratamentos estatísticos de Análise de Variância em esquema fatorial, considerando sexo, tempo e tratamento (2x2x5), com três repetições e um delineamento inteiramente casualizado. As médias foram comparadas utilizando o Teste de Tukey-Kramer – 2%¹⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protozoário *H. samuelpessoai* foi utilizado como modelo para o estudo dos efeitos do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes* (assa-peixe) sobre o crescimento e diferenciação celular.

Conforme demonstrado na Tabela 1, o extrato de assa-peixe nas concentrações que variaram de 36,02 mg/mL a 720,4 mg/mL não causou o aparecimento percentualmente significativo de forma opistomastigota, considerada a forma diferenciada, embora tenha sido detectada a inibição no crescimento do flagelado, se comparada ao aumento das concentrações do extrato.

Essa ocorrência poderia ser um indicativo de que substâncias presentes no extrato estejam sinalizando, com receptores da membrana celular, o mecanismo de inibição do crescimento, mas não o da diferenciação. Indiretamente, essa ocorrência pode indicar a inexistência de produtos

contidos no extrato potencialmente mitogênicos e, ou, mutagênicos, pelo menos nesse sistema experimental.

Em estudos realizados por Castellanos et al.²⁰, *H. samuelpessoai*, quando cultivada em meio contendo concentrações de 4 a 20 mg/mL de dimetilsulfóxido,

Tabela 1. Números de células no crescimento e diferenciação celular de *H. samuelpessoai* na presença e ausência do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes* Less (assa-peixe)

Extrato (µl)	Concentração do extrato (mg/mL)	Número de células/mL	Promastigota	Paramastigota	Opistomastigota
Sem adição	0	32 x 10 ⁷	99	1	0
50	36,02	28 x 10 ⁷	98	2	0
100	72,04	25 x 10 ⁷	97	3	0
200	144,08	21 x 10 ⁷	96	3	1
500	360,2	07 x 10 ⁷	96	3	1
750	540,3	05 x 10 ⁷	96	3	1
1000	720,4	05 x 10 ⁷	95	4	1

Tabela 2. Diâmetro dos halos de inibição das cepas fúngicas e bacterianas submetidas ao extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes* Less (assa-peixe) em diferentes concentrações

Micro-organismos	Halos de inibição (mm) ¹				
	Concentração do extrato (mg/mL)				
	36,02	72,04	108,06	144,08	180,1
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	19	22	26	27	28
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	..**	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ICC 107- sorotipo B)	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048)	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	-	12	14	14,5	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933)	-	-	-	16	17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25619)	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028)	-	-	-	-	18
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	-	-	-	17,5	17,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)	-	-	-	-	17

¹Nota: halos de inibição em milímetros medidos com paquímetro

** Resistentes

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes* Less, submetido às cepas microbianas

Micro-organismos	UFC/ mL ¹	CIM ²
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	8,0 x 10 ⁶	180,1
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	1,5 x 10 ⁸	- *
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	2,6 x 10 ⁶	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ICC 107- sorotipo B)	1,5 x 10 ⁶	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048)	1,44 x 10 ⁸	-
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	1,44 x 10 ⁹	72,04
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	1,5 x 10 ⁸	-
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9341)	1,5 x 10 ⁸	-
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933)	1,44 x 10 ⁹	144,08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25619)	1,5 x 10 ⁸	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)	1,27 x 10 ⁷	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028)	1,5 x 10 ⁸	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	1,5 x 10 ⁸	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	315 x 10 ⁸	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)	1,5 x 10 ⁸	-

¹ Concentração Inibitória Mínima

² Unidade formadora de colônia por mL

* Resistente

multiplicava-se aproximadamente na mesma proporção que as células controle e, com o aumento progressivo da concentração, observou-se uma inibição do crescimento do flagelado. Dados semelhantes foram obtidos em estudos realizados por Venturelli²¹ e Perazzo et al.²², com o extrato de *Ginkgo biloba* e que corroboram este estudo.

Fiorini et al.²³, realizando ensaios com *Herpetomonas megaseliae*, observaram o aumento de células diferenciadas opistomastigotas em um período de incubação de 96 horas, quando tratadas com lipopolissacarídeo, extraído de *Escherichia coli*. Entretanto, esses autores verificaram que, nas mesmas condições, tal tratamento não interferiu com o crescimento celular. Já foi demonstrado que o GMP-cíclico é o mensageiro intracelular que induz a divisão celular e limita a diferenciação e o AMP-cíclico inibe a divisão e promove a diferenciação²⁴.

Na ação antimicrobiana do extrato (Tabela 2), apresentaram halo de inibição as seguintes cepas bacterianas: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus*

(ATCC 6538), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19675). As cepas de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Cryptococcus neoformans* (ICC 107- sorotipo B), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619), *Sccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601) e *Staphylococcus epdermides* (ATCC 12228) não apresentaram halos de inibição nos testes de difusão em ágar. Estes resultados indicam, indiscutivelmente, que tais micro-organismos sejam resistentes, segundo a metodologia utilizada.

Quanto à Concentração Inibitória Mínima (CIM) demonstrada na Tabela 3, o estudo revelou que o extrato apresentou efeito bacteriostático sobre *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), nas concentrações de 180,1; 144,08 e 72,04 mg/mL, respectivamente. Contudo, não houve efeito bacteriostático para *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Cryptococcus neoformans* (ICC 107- sorotipo B), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Micrococcus*

luteus (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619), *Sccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19675).

Nenhuma bactéria Gram-positiva, Gram-negativa ou levedura utilizada neste estudo apresentou Concentração Microbicida Mínima (CMM), ou seja, efeito bactericida com as doses ensaiadas do extrato.

Embora vários estudos, a exemplo de Loureiro²⁵, Santos et al.²⁶, Amorozo²⁷ e Guarim Neto e Moraes⁸, terem demonstrado o uso popular da planta assa-peixe pela população do Estado do Mato Grosso e pelos sítios da Reserva de Rio das Pedras, em Mangaratiba/RJ²⁸, para o tratamento de doenças do aparelho digestório, respiratório, geniturinário, circulatório, sistema osteomuscular, para envenenamentos, doenças do sangue e órgãos hematopoiéticos, pele, glândulas endócrinas e tecido conjuntivo, não foram encontrados estudos que rebatem a sua ação antimicrobiana, o que reforçaria o seu uso, visto conter flavonoides e óleos essenciais²⁹.

Quando foi iniciada a industrialização da penicilina, no início da década de 1940, cerca de 80-90% das amostras isoladas de *Staphylococcus aureus* eram sensíveis a esse antibiótico. Nos dias atuais, verifica-se exatamente o oposto do ocorrido naquela época, além da resistência múltipla observada em muitos micro-organismos a vários antibióticos disponíveis no mercado. Por esse motivo, dentre outros, os órgãos governamentais que regem as atividades relacionadas com a saúde têm colocado como uma de suas metas prioritárias o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas utilizando plantas da rica flora brasileira. Em estudo realizado por Duarte et al.³⁰, extratos naturais como *Achyrocline satureioides* (d.C.) Lam, *Achillea millefolium*, *Mikania laevigata*, *Solidago millefolium* e *Piper marginatum* apresentaram atividade antimicrobiana sobre cepas bacterianas como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Em outro estudo realizado por Silveira³¹, micro-organismos como *S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 25619), *S. mutans* (ATCC 25175) e *S. salivaris* (CDC 262) apresentaram halo de inibição e CIM, quando expostos ao extrato glicolítico de *Tabebuia hepaphylla* (Vell.) Toledo.

Gonçalves et al.³² compararam a atividade antimicrobiana de diversos extratos vegetais em dez micro-organismos, dos quais o de *Casearia sylvestre* apresentou ação contra dois microrganismos – *Proteus mirabilis* e *Shigella sonnei* –, e constataram, também, a

resistência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Sato³³ descreveu a atividade do extrato de *Casearia sylvestre* em cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, em que foi observada no antibiograma a atividade do extrato em *S. aureus*, mas não em *E. coli*.

Em estudos realizados com plantas utilizadas na medicina popular, como *Achillea millefolium*, *Mikania laevigata*, *Solidago chilensis*, *Piper marginatum*, *Aloysia fratissima*, *P. marginatum*, *M. laevigata*, *Mentha pullegium*, *Mikania glomerata*, *Stachytarpetta cayensis*, *Lafoensia pacari* St. Hill. e *Bacharia dracunculifoliae*, foi atribuída atividade antimicrobiana, em sua maioria a produtos do metabolismo secundário das plantas, como terpenoides e compostos fenólicos, como flavonoides e saponinas, assim como a ácidos diterpênicos, ácidos caurenóico e cupressênico (esses últimos principais constituintes dos extratos de *M. laevigata*), que também na forma pura exibem atividade²⁸.

Os achados acima descritos relacionam quantidades de princípios ativos presentes nos extratos, com a ação destes, o que poderia explicar os resultados obtidos no presente estudo, no qual a sensibilidade das cepas bacterianas de *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e *Escherichia coli* (ATCC 8739) apresentou uma ação bacteriostática e não bactericida do extrato.

Segundo Newall³⁴, os flavonoides apresentam várias ações farmacológicas, tais como atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante e hipolipidêmica. Assim, a atividade antimicrobiana apresentada por *V. polyanthes* pode estar relacionada com a presença de flavonoides em sua composição³⁵.

Em relação ao que tange à determinação da Dose Letal Média (DL₅₀) do extrato em estudo, neste trabalho, não se verificaram mortes após a administração do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes*, mesmo nas concentrações mais elevadas (2000 mg/Kg), por via oral, desde as primeiras 72 horas até o 7º dia, sugerindo ausência de DL₅₀ nas concentrações analisadas.

As concentrações do extrato para cada tratamento, o número e o gênero de animais por grupo e o tempo de tratamento usados no presente ensaio foram determinados de acordo com OECD (*Guideline for the Testing of Chemicals*)¹⁸.

A análise do número/índice percentual de PCEMNs entre o grupo de animais controle positivos (Etil-Nitroso-Ureia - ENU 50 mg/Kg) e negativo (NaCl 0,9%), bem como controle positivo e tratamentos (1000-

Tabela 4. Número de eritrócitos policromáticos (PCE) analisados, número e frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN_s) e relação entre PCE e eritrócitos normocromáticos (NCE), observada em células de medula óssea de camundongos Swiss albinus (fêmeas e machos), tratados com o extrato hidroalcoólico de *Vernonia polyanthes* Less, e os respectivos controles, nos tempos de 24 e 48h

Tempos de Tratamento	Número de PCEs	PCEMN _s	PCEMN _s	PCE/NCE
	Analisados	(n)	(%)	
24h				
NaCl 0,9%	12288	14	0,11c	106,24 ^a
Etil-nitroso-ureia (50 mg/kg)	12298	117	0,95a	9,34 ^b
<i>Vernonia polyanthes</i> Less (1000 mg/Kg)	12146	34	0,28c	6,47 ^b
<i>Vernonia polyanthes</i> Less (1500 mg/Kg)	12227	34	0,28c	8,24 ^b
<i>Vernonia polyanthes</i> Less (2000 mg/Kg)	12141	60	0,49b	5,71 ^b
48h				
NaCl 0,9%	12536	23	0,18c	152,02 ^a
Etil-nitroso-ureia (50mg/kg)	12143	102	0,84a	10,41 ^b
<i>Vernonia polyanthes</i> Less (1000 mg/Kg)	12189	24	0,20c	9,26 ^b
<i>Vernonia polyanthes</i> Less (1500 mg/Kg)	12210	22	0,18c	11,77 ^b
<i>Vernonia polyanthes</i> Less (2000 mg/Kg)	12280	46	0,37b	11,00 ^b

Análise estatística de variância, em delineamento inteiramente casual e esquema fatorial 5x2x2 (tratamentose-xotempo), e ao teste de Tukey-Kramer (P < 0,05)

^{a,b,c} Letras iguais, estatisticamente não significativas
Letras diferentes, estatisticamente significativas

2000mg/Kg), revelou diferenças estatísticas significativas, sugerindo ausência de potencial clastogênico e/ou aneugênico do extrato hidroalcoólico de *V. polyanthes*, independentemente do tempo de tratamento ou sexo do animal. Entretanto, essas diferenças foram observadas entre os grupos de animais controle negativos e tratamento na maior concentração (2000 mg/kg), o que sugere uma leve predisposição aos efeitos genotóxicos desse extrato a partir de uma dosagem acima de 1500 mg/Kg.

A relação entre PCE e NCE mostrou-se significativamente reduzida nos grupos de animais controle positivos e de todos os tratamentos, independentemente do tempo ou gênero, devido ao aumento de NCE na medula óssea, indicando toxicidade tanto sistêmica como na medula óssea.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conclui-se que houve inibição do crescimento de *H. samuelpessoai*, ante as concentrações crescentes do extrato de *V. Polyanthes*,

sem aparecimento da forma diferenciada opistomastigota, estatisticamente significativo. Demonstraram halo de inibição, na presença do extrato de *V. Polyanthes*, as cepas de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Salmonella* Typhimurium. Todavia, demonstraram efeitos bacteriostáticos somente para *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*. A avaliação mutagênica/mitogênica do extrato de *V. polyanthes* revelou ausência (1.000 mg/Kg e 1.500 mg/Kg) e moderado (2.000 mg/Kg) efeito clastogênico e/ou aneugênico nas dosagens de 1000 e > 1500 mg/Kg, respectivamente, independentemente do tempo de tratamento (24/48h) e sexo do animal. Adicionalmente, tais resultados foram sugestivos de toxicidade sistêmica, visto o aumento de eritrócitos normocromáticos na medula óssea de camundongos, também independentemente da dose, gênero e tempo. Contudo, a ausência de DL₅₀ foi observada em todas as concentrações testadas (250- 2000 mg/Kg). Portanto, o extrato de *V. polyanthes* Less apresenta potencial terapêutico, pois possui atividade antimicrobiana e

não apresenta atividade mutagênica (i.e., clastogênica e/ou aneugênica) significativa a partir da dosagem \leq 1500 mg/Kg. Finalmente, estudos complementares de mutagenicidade (teste de Ames, teste Cometa) e toxicidade tecido-específico poderiam elucidar outros possíveis mecanismos e efeitos genotóxicos e tóxicos e, ainda, estabelecer concentrações com baixa toxicidade ou sem efeitos tóxicos que assegurem a saúde humana e a atividade fitofarmacológica de *V. polyanthes*.

REFERÊNCIAS

1. Barbastefano V, Cola MM, Camargo EES, Vilegas W, Hiruma-Lima CA, Brito ARMS. Anais da XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE; 2003, v. 12067.
2. Rossato SC. Utilização de plantas por populações do litoral norte do estado de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1996.
3. Benfatti AC, Barbastefano V, Rodrigues J, Rinaldo D, Santos LC, Brito ARMS et al. Estudo químico do extrato clorofórmico das folhas de *Vernonia polyanthes* Less. (*Asteraceae*). 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, fevereiro de 2007, São Paulo.
4. Silva NCC. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas [dissertação de mestrado]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências; 2010.
5. Lopes AH, Dutra PM, Rodrigues CO, Soares MJ, Angluster J, Coredeiro RS. Effect of platelet-activating factor on the process of cellular differentiation of *Herpetomonas muscarum muscarum*. *J Euk Microbiol*. 1997; 44(4):321-5.
6. Naves MMV, Moreno FS. Diferenciação Celular: Importância na Hepatocarcinogênese e Papel Modulador do β – Carotene. *Rev Bras Canc*. 2000; 46(4): 389-9.
7. Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* 1992; 257: 1050-5.
8. Guarim neto G, Morais RG. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. *Acta Bot Bras*. 2003; 17(4): 561-4.
9. Jorgetto G. Ação antimicrobiana do extrato de *Vernonia polyanthes* Less (assa – peixe) e seus efeitos genotípicos e fenotípicos em modelos *in vitro* e *in vivo*. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética. Salvador: Sociedade Brasileira de Genética, 2008:133.
10. Harbone JB. *Phytochemical Methods*. London: Chapman e Hall; 1983.
11. Roitman C, Roitman I, de Azevedo HP. Growth of an insect trypanosomatid at 37°C in defined medium. *J Protozool*. 1972; 19(2): 346-9.
12. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Amer J Clín Path*. 1966; 45: 493-6.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards [NCCLS]. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, (5th ed.) NCCLS document M7-A5. Wayne (PA): National Committee for Clinical Laboratory Standards.
14. Malone MH, Robicha UD. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lhoydia*. 1962; 25: 320-2.
15. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Hollaender, A. (Ed.). *Chemical mutagens: principles and methods for their detection*. New York: Plenum Press; 1976: 31-53.
16. Zambrano MA, 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. Margolin BH, Risko KJ. The statistical analysis of *in vivo* genotoxicity data. Case studies of the rat hepatocyte UDS and mouse bone marrow micronucleus assay. In: ASHBX, J. et al. Evaluation of short-term tests for carcinogens. Report of the international programme on chemical safety's collaborative study on *in vivo* assay. Oxford: Oxford University Press, 1998: 29-44.
18. Oecd Guideline for the Testing of Chemicals: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (474, Adopted: 21 st July 1997).
19. Mendes BA. Métodos Estatísticos. [acesso em: 2007 jan. 09]. Disponível em: [<http://www.uac.pt/~amendes/mestrado/regrMultvResd.pdf>].
20. Castellanos GB, Angluster J, Souza W. Induction of differentiation in *Herpetomonas samuelpeisoai* by dimetilsulfoxide. *Acta Tropica*. 1981; 38: 29-37.
21. Venturelli SM. Ação da *Ginkgo biloba* em tripanossomatídeos do gênero *Herpetomonas* [dissertação de mestrado] Alfnas: Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS; 2000. p. 78.
22. Perazzo FF et al. *Ginkgo Biloba* leaves extract on growth and morphology of trypanosomatids. *Bol Lat Caribe Plant Med Arom*. 2011; 10 (2): 147-54.
23. Fiorini JE, Alviano CS, Esteves MJG, Angluster J, De Souza W, Roitman I. Effect of lipopolysacáride (LPS) an the metabolism and cell surface of the trypanosomatid *Herpetomonas megaseliae*. *Comp Biochem Physiol*. 1985; 80(3): 537-42.
24. Fiorini JE, Roitman I, Angluster J, Alviano CS, Silva-Filho FC, Souza W. *Herpetomonas megaseliae*: effect of lipopolysacáride on cell surface anionogenic groups. *Parasitol Res*. 1991; 77(2): 102-08.
25. Loureiro RNO. Plantas medicinais no cotidiano da comunidade de Baxiú, Barra do Bugres, Mato Grosso [dissertação de mestrado]. Cuiabá (MT): Universidade Federal do Mato Grosso; 1999. p. 104.
26. Santos ALS et al. Secreted phosphatase activity induced by dimethyl sulfoxide in *Herpetomonas samuelpeisoai*. *Arch Biochem Biophys*. 2002; 405(2): 191-8.
27. Amorozo MCM. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. *Acta Bot Bras*. 2002; 16 (2): 561-84.
28. Medeiros MFT et al. Plantas medicinais e seus usos pelos sitiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. *Acta Bot Bras*. 2004; 18 (2): 391-9.
29. Corrêa RM et al. Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de assa-peixe submetidas a diferentes métodos de secagem. *Ciênc Agrotec*. 2004; 28 (2): 339-44.

30. Duarte MCT, Figueira GM, Pereira B, Magalhães PM, Delarmelina C 2004. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Rev Bras Farmacog*. 14(1): 6-8.
31. Silveira DG, Pereira MA, Cardoso LGV, Silva JMSE, Carvalho JCT, Fiorini JE. Atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima de *Tobebuia heptaphylla* (Vell.) Tolledo (IPÊ ROXO). *In: Seminário de Iniciação Científica da Unifenas. Alfenas: Seminário de Iniciação Científica. 2004: 45.*
32. Gonçalves AI, Alves Filho A, Menezes H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq Inst Biol*. 2005; 72 (3): 353-8.
33. Sato, MEO. Estudo da estabilidade de uma formulação na forma gel, veiculando o extrato fluido de *Casearia sylvestris* Sw., Flacourtiaceae (“guaçatonga”) [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1998. Pág. 164 .
34. Newall CA, Anderson LA, Phillipson DJ. *Herbal Medicines: A Guide for Health-care Professionals*. The Pharmaceutical Press: Londres; 1996.
35. Souza FA, Sena J, Maranhão LT, Oliveira CMR, Guimarães ATB. Caracterização fitoquímica preliminar de infusões populares obtidas das partes aéreas das espécies *Apium leptophyllum* (Pers.) F. Muell. ex Benth. (Apiaceae), *Elvira biflora* L. (DC.) e *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae). *Rev Bras Farm*. 2008; 89(1): 24-7.