

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO
MESTRADO EM SAÚDE

**AÇÃO MUTAGÊNICA “IN VIVO” E
ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Pyrostegia venusta* E
SEUS EFEITOS NO CRESCIMENTO E
DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM UM SISTEMA
EUCARIÓTICO “IN VITRO”**

ADRIANA PONCIANO FERNANDES

Alfenas - MG
2008

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO
MESTRADO EM SAÚDE

**AÇÃO MUTAGÊNICA “IN VIVO” E
ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Pyrostegia venusta* E
SEUS EFEITOS NO CRESCIMENTO E
DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM UM SISTEMA
EUCARIÓTICO “IN VITRO”**

ADRIANA PONCIANO FERNANDES

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Evangelista Fiorini

Alfenas - MG
2008

FERNANDES, Adriana Ponciano.

Ação mutagênica "in vivo" e antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* e seus efeitos no crescimento e diferenciação celular em um sistema eucariótico "in vitro". Alfenas: UNIFENAS, 2008. 107 f.

Orientador: Prof. Dr. João Evangelista Fiorini

Dissertação (Mestrado em Saúde) – Universidade José do Rosário Vellano.

1. *Pyrostegia venusta*. 2. Diferenciação celular.
3. Atividade antimicrobiana. 4. Fitoterapia. 5. Mutagenicidade.

CDU: 576.8 (043)

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO

Adriana Ponciano Fernandes

**AÇÃO MUTAGÊNICA “IN VIVO” E ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DE *Pyrostegia venusta* E SEUS EFEITOS NO
CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM UM SISTEMA EUCARIÓTICO
“IN VITRO”**

Banca examinadora:

Prof. Dr. João Evangelista Fiorini – orientador
Universidade José do Rosário Vellano – Alfenas

Prof. Dr. Luiz Carlos do Nascimento
UNIFAL– Alfenas

Profa. Dra. Nelma de Mello Silva Oliveira
Universidade José do Rosário Vellano – Alfenas

Profa. Dra. Sandra Maria Oliveira Morais Veiga – Membro suplente
UNIFAL– Alfenas

Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriolo – Membro suplente
Universidade José do Rosário Vellano – Alfenas

Alfenas, 13 de Outubro de 2008.

Aos meus pais, Juvenil e Maria Antonieta, que me ensinaram a nunca desistir diante das dificuldades, que me amam incondicionalmente e sempre acreditaram e torceram por mim. Amigos nos momentos difíceis, pessoas iluminadas, meu profundo amor e respeito.

À minha irmã, Patrícia, por quem tenho imenso amor e respeito. Agradeço a Deus por poder compartilhar de minha vida com você.

Aos meus sogro e sogra, Sebastião e Suely, segundos pais, que com amor, que somente pais têm por seus filhos, incentivaram, auxiliaram e tornaram possível a conclusão deste trabalho. Pessoas maravilhosas, que amo muito.

Ao meu querido filho, Anddrei, razão de vida, de luta e de busca diária de ser um ser melhor. Mesmo não compreendendo, soube aceitar os momentos de ausência.

Ao meu marido, companheiro e amigo, Neif, meu amor e porto seguro, grande incentivador em todos os momentos da minha vida. Nesta fase compreendeu meus momentos de ausência e dedicação a este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e por ter mantido a chama da esperança em meu coração.

Ao prof. Edson Antonio Velano (*in memoriam*), pela oportunidade de cursar este mestrado.

Ao meu querido orientador, prof. Dr. João Evangelista Fiorini, pela dedicação, pelo carinho de pai, companheirismo de amigo, força, serenidade e conhecimento de um mestre e a humildade que só os grandes homens têm.

Aos docentes, pelos ensinamentos, incentivo e dedicação.

Aos meus caros colegas de mestrado, turma unida que merece todo meu respeito e carinho. Grandes e fieis amigos.

À Claudia Umbelina Baptista Andrade, coordenadora da Faculdade de Enfermagem da UNIFENAS Campus de Alfenas, pela amizade, compreensão e incentivo no decorrer desta jornada. Amiga de todas as horas.

Ao Prof. Marcelo Fabiano Gomes Boriolo, pela dedicação e paciência na orientação no experimento de mutagenicidade.

À Lucimara Maria da Silva, pela inestimável ajuda na realização deste trabalho, com competência e dedicação.

À Maria Aparecida da Silva, pela paciência nos ensinamentos e pelo companheirismo nos dias e noites de pesquisa, pelo carinho, dedicação e amizade.

Ao Elias José Venâncio pelo auxílio nos experimentos, pela dedicação e carinho.

À Silvana Albino S. S. Novais, amiga e colega de trabalho, pela compreensão e incentivo nos períodos difíceis da execução deste.

Ao Prof. Denismar Alves Nogueira, pelo auxílio profissional na fase de conclusão desta pesquisa.

Ao Professores Marcelo Pólo e Paulo Landgraf pela pronta e inigualável ajuda.

À Rede Mineira de Ensaio Farmacológicos e Toxicológicos de Produtos Terapêuticos da FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

E a todos que direta e indiretamente, colaboraram para a realização e conclusão deste trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estágios morfológicos e de diferenciação celular apresentados pelos organismos da família <i>Trypanosomatidae</i>	31
Figura 2 – Foto ilustrativa da planta <i>Pyrostegia venusta</i>	47
Figura 3 – Foto ilustrativa do extrato hidroalcoólico de <i>Pyrostegia venusta</i>	48
Figura 4 a 9 – Fotos ilustrativas da obtenção das células de medula óssea para o estudo da frequência de micronúcleos	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Crescimento e diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpessoai* em meio quimicamente definido (ROITMAN et al., 1972), a 28° C, por 48h, na presença e ausência do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*.....63

TABELA 2 – Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) e razão de PCE/NCE observados em células do sangue de medula óssea de camundongos *Swiss* fêmeas (F) e machos (M) tratados com o extrato de *Pyrostegia venusta*, e os respectivos controles, no tempo de 24 horas65

TABELA 3 – Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) e razão de PCE/NCE observados em células do sangue de medula óssea de camundongos *Swiss* fêmeas (F) e machos (M) tratados com o extrato de *Pyrostegia venusta*, e os respectivos controles, no tempo de 48 horas65

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise Estatística de Variância
ATCC - *American Type Culture Collection*
BHI - Infusão de Cérebro e Coração
BOD - Demanda Bioquímica de Oxigênio
CMM - Concentração Microbicida Mínima
CIM - Concentração Inibitória Mínima
° C - Grau Celsius
% - Porcentagem
DL 50 - Dose Letal Média 50
DNA - Ácido Desoxirribonucléico
DPM - Desvio Padrão da Média
ENU – Etil-n-Nitroso -Uréia
F – Fêmea
g - Gramas
h – Horas
IH – Infecção Hospitalar
Kg - Quilograma
M - Macho
mg - Miligramas
mL - Mililitro
µL- Microlitro
mm - Milímetro
MN - Micronúcleo
n - Número
NCCLS - *National Commitee for Clinical Laboratory Standards*
NCE - Eritrócito Normocromático
OECD - *Organization for Economic Co-operation and Development*
OMS - Organização Mundial de Saúde
PCE - Eritrócito Policromático
PCEs - Eritrócitos Policromáticos
PCEMN - Eritrócito Policromático Micronucleado
RNA - Ácido Ribonucléico
SBMCTA - Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese
TAB. - Tabela
UNIFENAS - Universidade José do Rosário Vellano
UNIFAL - Universidade Federal de Alfenas
V.O. - Via Oral

RESUMO

FERNANDES, Adriana Ponciano. **Ação mutagênica “in vivo” e antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* e seus efeitos no crescimento e diferenciação celular em um sistema eucariótico “in vitro”**. Orientador: João Evangelista Fiorini. Alfenas: UNIFENAS, 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde, área de concentração – Microbiologia e Genética).

Este estudo teve por objetivos analisar os efeitos do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*, conhecida popularmente como cipó-de-são-joão, sobre diversos tipos de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e também sobre leveduras, além de analisar seu efeito no crescimento e diferenciação celular em *Herpetomonas samuelpessoai* “in vitro” e mutagênico “in vivo”, através do Teste do Micronúcleo. A atividade antimicrobiana do extrato foi verificada por dois métodos: teste de difusão em ágar e teste de diluição em tubo. Os experimentos de crescimento e diferenciação celular de *H. samuelpessoai* foram realizados em meio quimicamente definido, após incubação a 28 °C, por 48 horas, sendo o crescimento estimado pela contagem das células em câmara de Neubauer e a diferenciação pela observação das células coradas pelo método Panótico em microscopia óptica, objetivando estimar os percentuais de formas pró, para e opistomastigota. Para a determinação da DL 50 foram utilizados grupos de camundongos Swiss albinos fêmeas que receberam, por via oral, dose única de diferentes concentrações do extrato (300 e 2000 mg/Kg). Para a avaliação mutagênica foram utilizados camundongos Swiss albinos, com idade aproximada de 12 semanas. Cada ensaio foi realizado empregando-se cinco grupos de animais, cada grupo constituído por 3 machos e 3 fêmeas, sendo assim tratados: controle negativo (NaCl 0,9%); controle positivo (50 mg/kg ENU); tratamento 1, 2 e 3 (1000, 1500 e 2000mg/Kg do extrato, respectivamente). O teste do micronúcleo em eritrócitos da medula óssea de camundongos foi realizado 24 e 48 horas após o tratamento, e os eritrócitos policromáticos (PCEs) foram observados em microscopia óptica e contados com o auxílio de um contador de células digital. Os resultados evidenciaram que o extrato hidroalcoólico da folha de *Pyrostegia venusta*, nas concentrações testadas (72,6 mg/mL e 145,2 mg/mL), não possui atividade antimicrobiana para as dezenove cepas testadas de bactérias e fungos. No que se refere à DL50, o extrato não apresentou dose letal média nas concentrações testadas de 300mg/kg e 2000mg/kg. Ao teste de micronúcleo, os resultados revelaram diferenças estatísticas significativas do número/índice percentual de PCEs micronucleados entre o grupo de animais do controle positivo (ENU 50mg/Kg) e controle negativo (NaCl 0,9%), bem como controle positivo e tratamentos com o extrato. 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 *P. venusta* não apresenta potencial clastogênico e/ou aneugênico

PALAVRAS-CHAVES: Ação Antimicrobiana; Mutagênese; *Pyrostegia venusta*; Diferenciação Celular.

ABSTRACT

FERNANDES, Adriana Ponciano. **Mutagenic action “in vivo” and antimicrobial of the *Pyrostegia venusta* hydroalcoholic extract and its effects on the growth and cell differentiation in an “in vitro” eukaryotic system.** Adviser: João Evangelista Fiorini. Alfenas: UNIFENAS, 2008. Dissertation (Master's degree in Health Care; concentration area in Microbiology and Genetics).

This study analyzed the effects of the hydroalcoholic extract of *Pyrostegia venusta*, popularly known as “cipó-de-são-joão”, on various types of Gram negative and Gram positive bacteria, and on yeasts. It also evaluated the effects of the extract on the growth and cell differentiation in *Herpetomonas samuelpessoai* “in vitro”, and the “in vivo” mutagenic effect by the micronucleus test. The antimicrobial activity of the extract was evaluated by two methods: agar diffusion test, and tube dilution test. The growth and cell differentiation of *H. samuelpessoai* occurred in chemically defined medium after incubation at 28°C, for 48 hours. Growth was calculated by cell count in a Neubauer chamber, and differentiation was measured by observing cells stained by the panoptic method to calculate the percentages of the pro-, para- and opistomastigote forms. To determine the LD 50, groups of female albino Swiss mice received a single oral dose of different extract concentrations (300 mg/kg and 2000 mg/kg). For mutagenic evaluation, Swiss albino mice, aged approximately 12 weeks, were used. Each trial was carried out in five groups of animals, each group consisting of 3 males and 3 females: negative control (0.9% NaCl); positive control (50 mg/kg of ENU) treatments 1, 2 and 3 (1000, 1500 and 2000 mg/kg of extract, respectively). The micronucleus test in mouse bone marrow erythrocytes was done 24 and 28 hours after treatment. The polychromatic erythrocytes (PCEs) were observed through an optical microscope and counted with the help of a digital cell counter. The results showed that the hydroalcoholic extract of *Pyrostegia venusta* leaves at the concentrations of 72.6 mg/mL and 145.2 mg/mL had no antimicrobial activity on the 19 strains of bacteria and yeasts tested. With regard to LD50, the extract did not show median lethal dose at the concentrations of 300 mg/kg and 2000 mg/kg. The micronucleus test showed statistically significant differences in the number/percentage index of micronucleated PCEs between the positive control group (ENU 50mg/kg) and negative control (0.9% NaCl), and positive control and extract treatments. But these differences were not observed either between the negative controls and the extract-treated group, or between the sexes and times of treatment (24 hr-48hr), thus suggesting that the hydroalcoholic extract of *P. venusta* leaves does not exhibit either clastogenic or aneugenic potentials.

KEY WORDS: Antimicrobial action; Mutagenesis; *Pyrostegia venusta*; Cell differentiation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.2.1 GERAL	15
2.2.2 ESPECÍFICOS	15
3. JUSTIFICATIVA.....	17
4. REVISÃO DE LITERATURA	18
4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	18
4.1.1 Antibioticoterapia e resistência	18
4.1.2 Antibioticoterapia x fitoterapia.....	20
4.2 UTILIZAÇÃO DE TRIPANOSOMATÍDEOS COMO MODELOS PARA O ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR	26
4.2.1 Diferenciação celular	26
4.2.2 Diferenciação celular em tripanosomatídeo	27
4.2.3 Diferenciação no gênero <i>Herpetomonas</i>.....	31
4.3 AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE (TESTE DO MICRONÚCLEO)	34
4.4 CIPÓ DE SÃO JOÃO - <i>Pyrostegia venusta</i>.....	41
5. MATERIAL E MÉTODOS	45
5.1 ASPECTOS ÉTICOS	45
5.2 MICRORGANISMOS	45
5.3 COLETA DO MATERIAL.....	46
5.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO	47
5.5 MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS	48
5.5.1 Tripanosomatídeos	48
5.5.2 Cepas bacterianas e de leveduras.....	49
5.6 ENSAIOS DE AÇÃO ANTIMICROBIANA	49
5.6.1 Teste de difusão em ágar	49

5.6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbida mínima (CMM).....	50
5.7 ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR	51
5.7.1 Experimentos de crescimento	51
5.7.2 Experimentos de diferenciação celular	52
5.8 DOSE LETAL MÉDIA (DL 50) DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>Pyrostegia venusta</i>	52
5.8.1 Descrição do método	53
5.9 ENSAIO DE MUTAGENICIDADE	54
5.9.1 Animais utilizados no estudo	54
5.9.2 Grupos experimentais.....	55
5.9.3 Teste do Micronúcleo (MN)	56
5.9.3.1 Obtenção do material de medula óssea	56
5.9.3.2 Coloração e montagem das lâminas	58
5.9.3.3 Análise da relação entre eritrócitos policromáticos/ normocromáticos	59
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS DE AÇÃO ANTIMICROBIANA, DIFERENCIAÇÃO/CRESCIMENTO CELULAR E MUTAGENICIDADE.....	60
6. RESULTADOS.....	61
6.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	61
6.2 DETERMINAÇÃO DA CIM E CMM EM BACTÉRIAS E FUNGOS.....	61
6.3 CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO EM <i>Herpetomonas samuelpessoai</i>	62
6.4 DOSE LETAL MÉDIA (DL 50)	63
6.5 TESTE DO MICRONÚCLEO (MN)	64
7. DISCUSSÃO	66
8. CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXO	91
APÊNDICE.....	92

1. INTRODUÇÃO

O estudo da biologia celular envolve o esforço para a compreensão dos diversos fenômenos biológicos relacionados à vida da célula. Assim, ao longo das últimas décadas tem-se observado um enorme desenvolvimento das investigações que buscam a elucidação de processos, tais como crescimento, proliferação, diferenciação e morte celular.

A diferenciação celular é um processo que está relacionado com a patogenia e patologia de muitos microrganismos, bem como o resultado de uma expressão gênica seletiva levando à biossíntese de proteínas específicas. Assim, tais processos podem estar envolvidos com o aparecimento de neoplasias benignas ou malignas, entre outras patologias. Com o desenvolvimento dos Projetos Genoma e Proteoma, esperam-se grandes avanços nesta área, a curto e médio prazos.

Dentre as muitas espécies de protozoários, os tripanosomatídeos têm recebido especial atenção por parte dos pesquisadores no estudo da diferenciação celular. As vantagens em se trabalhar com tais organismos incluem a facilidade de manuseio, ausência de riscos de contaminação, e a relativa simplicidade com que esses se desenvolvem em meios artificiais.

Em razão dos crescentes problemas associados à terapêutica de diversas infecções, como o uso indiscriminado de antimicrobianos, resistência microbiana, assim como os efeitos colaterais dos antibióticos, entre outros fatores, os estudos de substâncias oriundas de vegetais adquiriram novas perspectivas, sendo que várias pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de plantas têm sido realizadas. Com a crescente resistência de microrganismos aos novos antibióticos, cria-se a

necessidade do estudo de novas drogas, com preços mais acessíveis e efeitos colaterais mais amenos.

A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico é uma tendência generalizada na medicina popular brasileira. Esta tendência tem contribuído significativamente para o consumo não só de plantas medicinais, como também de medicamentos fitoterápicos. Os conhecimentos acumulados ao longo do tempo mostram que tais produtos podem causar efeitos nocivos. A fitoterapia é um recurso terapêutico muito utilizado na automedicação e, devido à facilidade do acesso, pode agravar seus riscos potenciais, uma vez que poucas comprovações científicas são encontradas nesta área.

Acrescenta-se à utilização dos fitofármacos a necessidade da realização de testes para determinar o efeito mutagênico dos mesmos, desta forma garantindo a segurança de seu uso em larga escala.

Assim, será estudado o extrato da planta *Pyrostegia venusta*, conhecida popularmente por cipó-de-são-joão, objetivando analisar seus possíveis efeitos ao nível celular, utilizando-se como modelo célula de protozoário cultivada em meio de composição quimicamente definida, bem como a possível ação inibitória deste extrato para várias espécies bacterianas e fúngicas, e seu efeito mutagênico, através do Teste do Micronúcleo.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a ação mutagênica e antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* e seus efeitos no crescimento e diferenciação celular em sistemas eucarióticos “in vitro”.

2.2 ESPECÍFICOS

- 1- Testar o extrato hidroalcoólico da planta *Pyrostegia venusta* sobre diversos tipos de bactérias Gram negativas e Gram positivas e fungos.
- 2- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CMM) do extrato em bactérias e fungos.
- 3- Estudar as alterações que possam ocorrer na diferenciação e no crescimento de *H. samuelpeessoai* na presença do extrato.
- 4- Determinar a Dose Letal Média (DL50) do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*.

- 5- Analisar os efeitos mutagênicos “in vivo”, do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*, através do Teste do Micronúcleo.

3. JUSTIFICATIVA

A crescente resistência de microrganismos aos antibióticos cria a necessidade do estudo de novas drogas, com preços mais acessíveis e efeitos colaterais mais amenos.

A fitoterapia é um recurso terapêutico muito utilizado na automedicação e, devido à facilidade do acesso, pode agravar seus riscos potenciais.

Existe uma lacuna que deve ser preenchida através de ações que busquem melhorar a difusão do conhecimento sobre o uso seguro e racional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, entre elas a disponibilização de informações que devem ser transmitidas aos profissionais de saúde e aos usuários.

Para tanto, estudos sobre os efeitos que estas plantas podem ocasionar nos seres humanos se tornam necessários. Desta forma, os testes de mutagenicidade “in vivo” aliado a ensaios de diferenciação celular em modelos eucarióticos “in vitro”, utilizando-se o extrato vegetal, assumem significância para elucidar tais efeitos, cientificamente comprovados.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.1.1. Antibioticoterapia e resistência

Aproximadamente 7 décadas atrás, ocorreu a descoberta do primeiro agente antimicrobiano seletivo, sendo uma das grandes conquistas na história da medicina e saúde humana. O conseqüente desenvolvimento da terapia antimicrobiana centrou-se na busca por novas drogas, com ação efetiva contra microrganismos, que eram susceptíveis até então (FINLAND, 1979).

Essas novas e poderosas drogas salvaram vidas quando usadas no tratamento de infecções severas e na prevenção de doenças, profilaticamente, em algumas situações clínicas. Uma vez que os antibióticos são isolados de microrganismos, alguns destes desenvolveram a capacidade de inativar ou se tornarem impermeáveis a estas substâncias, tornando-se resistentes às mesmas (FINLAND, 1979).

Nas últimas décadas, as infecções hospitalares (IH) têm significado alto risco à saúde dos usuários e funcionários dos hospitais. Doenças infecciosas matam de 17 a 20 milhões de pessoas por ano no mundo. Cerca de 10 milhões de pessoas adquirem as infecções hospitalares. Desse universo, quase 300 mil morrem. Os dados divulgados pela Sociedade Internacional de Doenças Infecciosas indicam

também que não há nenhum hospital no mundo que não tenha caso de infecção hospitalar (FREITAS, 2002).

As doenças infecciosas são as principais causas de morbidade e mortalidade nas populações dos países em desenvolvimento desde os tempos remotos (COURA e CASTRO, 2002). Elas são importantes causas de mortes prematuras no mundo, estimadas em torno de 50.000 pessoas por dia (AHMAD e BEG, 2001).

“O combate à infecção nosocomial é uma guerra que, provavelmente, nunca será ganha por qualquer das partes envolvidas, mas devemos ter atenção, pois o inimigo possui arma muito sofisticada”. Exemplos desta afirmativa é a aparição de espécies de *Acinetobacter*, resistentes a todos os antibióticos conhecidos. *Micobacterium tuberculosis*, *Enterococcus (Streptococcus faecalis)* e *Staphylococcus spp* multirresistentes, são outros exemplos (FREITAS, 2002).

Freitas (2002) observou um alarmante aumento da resistência tanto nas bactérias Gram-negativas quanto nas Gram-positivas no ambiente hospitalar. Porém, essa disseminação não fica restrita ao ambiente hospitalar e chega ao *home care* e outros locais para onde os pacientes são transferidos. As novas drogas que são empregadas devido a este aumento da resistência têm um alto custo, e poderão não ser suportadas pelos financiadores da assistência.

Conseqüentemente, pesquisadores procuram agentes que sejam ativos contra cepas na qual a resistência se torna prevalente. A expansão de tipos de antimicrobianos, particularmente os antibióticos, proveu alternativa na maioria dos casos, mas o controle de infecções, em alguns casos, é prejudicado se a resistência do microrganismo infectante não é reconhecida imediatamente. Logo, a medicina necessita de drogas cada vez mais tóxicas, mais caras e menos efetivas do que

aquelas que serão selecionadas se o microrganismo infectante não for resistente (HARRISON e LEDERBERG, 1998).

Simultaneamente ao crescente desenvolvimento de vários agentes antibacterianos, ocorreu também um aumento rápido na incidência de resistência antibacteriana (NORRBY e NORD, 2005).

A seleção do antibiótico correto exige o conhecimento da bactéria causadora da enfermidade. O diagnóstico bacteriológico requer rastreamento da bactéria e o estudo de sua sensibilidade e resistência aos antibióticos (JARAMILLO, 1996).

4.1.2. Antibioticoterapia x fitoterapia

Aproximadamente 25% dos fármacos empregados atualmente nos países industrializados advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas superiores. No entanto, nos últimos 20 anos, os fármacos de origem natural que apareceram no mercado são, em proporção majoritária, oriundos de pesquisas científicas realizadas na China, Coréia e Japão (LOZOYA, 1997).

Segundo o Ministério da Saúde do Brasil (2001), os fitoterápicos são medicamentos, cujos componentes com atividade terapêutica ativa são exclusivamente partes de plantas (caule, folhas, raiz, semente, fruto, etc.) ou derivados vegetais (extratos brutos, sucos, óleos, ceras, etc.), não tendo em sua composição a inclusão de substâncias ativas isoladas de outras origens, nem associações destas com extratos vegetais. Estão sob a regulamentação de

produtos naturais das respectivas leis nacionais de medicamentos e apresentam as indicações profiláticas ou terapêuticas.

Somente no período entre 1989 e 1994, cerca de 200 medicamentos aprovados pela Agência Americana de Controle de Medicamentos e Alimentos (FDA) foram obtidos de fontes naturais. Além disso, 10 entre os 20 medicamentos vendidos no ano 1998, também foram desenvolvidos a partir de produtos naturais e muitas moléculas desenvolvidas a partir destes produtos estão em fase de estudo clínico. Esse percentual é ainda mais elevado se considerarmos as drogas anticancerígenas e os antibióticos, no qual aproximadamente 70% foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (FARNSWORTH e MORRIS, 1976; TURNER, 1996; CRAGG, NEWMAN e SNADER, 1997; PANDEY, 1998).

Os medicamentos fitoterápicos são preparações padronizadas, contendo extrato de uma ou mais plantas, amplamente comercializados em países pobres ou ricos. De acordo com a definição proposta pela OMS (Organização Mundial de Saúde), os medicamentos fitoterápicos são substâncias ativas presentes na planta como um todo, ou parte dela, na forma de extrato total ou processado (AKERELE, 1993).

Desde o princípio das civilizações, os vegetais têm sido utilizados não só como fonte alimentícia, como também medicamentosa. As mais diversas enfermidades têm sido tratadas com chás (infuso, decocto, macerado), sucos, tinturas, banhos, cataplasma e unguentos, preparados a partir de parte das plantas (ROBERTS, SPEEDIE e TYLER, 1997; ALMEIDA, 1993). Usualmente, as substâncias ativas, responsáveis por seu efeito farmacológico, são desconhecidas. Dentre as inúmeras vantagens dos fitoterápicos estão seu largo uso terapêutico, seu

baixo custo e a grande disponibilidade para a população de baixa renda (CALIXTO, 2000).

Embora a presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores não seja um fato recente, a busca das mesmas teve grande impulso após a descoberta da penicilina (TAVARES, 1984). As plantas são possuidoras de várias vias metabólicas secundárias que dão origem a compostos, incluindo alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos, óleos que, por vezes, são específicos a determinadas famílias, gêneros ou espécies, e cujas funções, até há pouco tempo, eram desconhecidas (SIMÕES *et al.*, 1999).

O conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido revisto e ampliado, devido aos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos (RECIO, RIOS e VILLAR, 1989).

Em razão dos crescentes problemas associados à terapêutica de diversas infecções, e considerando-se o limitado espectro de ação, assim como os efeitos colaterais dos antibióticos, entre outros fatores, os estudos de substâncias oriundas de vegetais adquiriram novas perspectivas. Neste sentido, numerosas pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de plantas contra bactérias, fungos, protozoários e vírus têm sido publicadas (YUNES e CALIXTO, 2001; EBI, IFEANACHO e KAMALU, 1999).

O uso das plantas como remédio é provavelmente tão antigo quanto à própria humanidade. Nas Ilhas Oceânicas, por exemplo, há séculos a planta kava kava (*Piper methysticum*) é usada como calmante. Durante muito tempo, foi utilizada em cerimônias religiosas, para um tipo de "efeito místico". Depois, cientistas alemães comprovaram que seu extrato tem efeito no combate à ansiedade (BILIA *et al.*, 2004).

Carvalho e Ferreira (2001) fizeram um estudo sobre o tratamento de leishmaniose com o uso de fitoterapia. Em seu estudo descreveram as receitas de diversas comunidades indígenas no tratamento desta doença, que ocorre em diversos países.

Viegi *et al.* (2003) pesquisaram uma grande gama de plantas, usadas como medicamentos para animais domésticos, no sul da Itália.

Pesquisas mais específicas são feitas com relação ao relacionamento do homem como sociedade e da planta como remédio, visto no estudo feito por Loi *et al.* em 2004. Neste estudo foram descobertas 17 plantas ainda não descritas como fitoterápicos, sendo realizado em uma aldeia com 200 pessoas, com idades variando de 64 a 104 anos, de Villagrande Strisaili, na Sardenha Italiana. Da mesma forma, Scherrer *et al.* (2005) concluíram um estudo no qual plantas da área de Monte Vesole e Ascea, Cilento, no sul da Itália, foram catalogadas em um herbário. Este herbário, segundo os pesquisadores, ajudará na identificação das plantas e no isolamento de fitoterápicos.

Guarrera (2005) fez uma revisão sobre a fitoterapia tradicional utilizada na região central da Itália. Foram encontradas espécies tanto para o tratamento humano quanto animal.

No Vale Parvati ao sopé do Himalaia na Índia Sharma, Chauhan e Lal (2004) estudaram o uso de plantas medicinais pelos habitantes dessa região. Foram encontradas 50 espécies diferentes de plantas que serviam como medicamentos, além de outras que tinham utilidades na alimentação e fabricação de tecidos.

Jorge e Diaz (2001) pesquisaram três plantas que crescem em Cuba, amplamente utilizadas na medicina popular, objetivando validar sua atividade

antimicrobiana “in vitro” frente a 4 bactérias Gram-positivas, 8 bactérias Gram-negativas e uma levedura.

Pessini *et al.* (2003) selecionaram extratos de 13 plantas utilizadas na medicina popular brasileira, para avaliar a atividade antimicrobiana, utilizando a bioautografia. Destes, 10 extratos apresentaram níveis variados de atividade antibacteriana. Os resultados podem explicar o uso etnobotânico das espécies estudadas para o tratamento de várias doenças infecciosas.

Em La Paz e em El Alto na Bolívia, as pessoas comercializam diversos tipos de plantas, como descrito por Macia, García e Vidaurre (2005), onde foram descritas 129 espécies de plantas medicinais para o tratamento de diversas doenças, como problemas de estômago, reumatismo, doenças renais, doenças pulmonares entre outras. Perry *et al.* (1999) criticaram o uso das plantas medicinais sem o prévio estudo científico da atuação do fitoterápico sobre a fisiologia do corpo humano. Segundo Perry *et al.* (1999), a medicina natural, presente em países asiáticos, como a China, ajuda no entendimento de mecanismos de atuação de doenças como Síndrome de Alzheimer. Porém, os estudos precisam ser mais intensivos para barrar o empirismo que ainda existe nesta área da ciência farmacêutica.

Apesar de os efeitos colaterais na utilização dos fitoterápicos serem menos freqüentes do que na das drogas sintéticas, os testes clínicos atestam que eles existem. Na verdade, há poucos dados sobre a eficácia, segurança e qualidade de muitas plantas medicinais e a sua larga utilização não é suficiente para validá-las eticamente como medicamentos seguros e eficazes (CALIXTO, 2000). Nesse sentido, é imprescindível que o fitoterápico, para ser comercializado, esteja registrado no Ministério da Saúde (LAPA *et al.*, 2000).

Segundo Macia, García e Vidaurre (2005), a prática da magia e da fitoterapia, como ciências em La Paz e em El Alto, estão muito próximas. A cultura popular tem grande influência na utilização das plantas como remédio.

Segundo Cordeiro *et al.* (2006), a utilização de extratos vegetais vem se tornando uma alternativa importante para a prevenção de doenças periodontais. Estes realizaram um trabalho com o objetivo de desenvolver uma formulação de enxaguatório bucal (contendo, em associação, extratos hidroalcoólicos de *Rosmarinus officinalis*, *Plantago major*, *Tabebuia impetiginosa*, *Achillea millefolium* e *Nasturtium officinale*), avaliar sua composição farmacognóstica e sua atividade antibacteriana. Todas as bactérias testadas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*) foram inibidas pelos extratos, observando-se que as espécies *S. aureus* e *B. subtilis* mostraram, aparentemente, maior sensibilidade. A CIM variou, em relação à sensibilidade de cada espécie bacteriana estudada, de 312,5 µL/mL a 1250 µL/mL para os extratos vegetais e de 625 µL/mL a 2500 µL/mL para o enxaguatório bucal.

Carvalho *et al.* (2002) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da folha e caule do *Psidium guajava* L. (goiabeira-vermelha) contra bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella* sp, *Shigella* sp, *Proteus* sp, *Salmonella* sp) pelo o método de difusão em ágar com disco e a determinação da CIM em meio sólido. Os dois extratos apresentaram atividade para todas as 88 cepas testadas, com exceção da *Klebsiella* sp.

Novais *et al.* (2003) testaram 137 extratos de espécies nativas do semi-árido brasileiro, sendo que sete desses extratos, pelo método de difusão em ágar com disco, mostraram eficácia contra *S. aureus*, e nenhum mostrou atividade contra *E.*

coli, que foram as bactérias testadas. Os sete extratos ativos pertencem às famílias *Leguminosae* e *Rutaceae*.

4.2. UTILIZAÇÃO DE TRIPANOSOMATÍDEOS COMO MODELOS PARA O ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR

4.2.1. Diferenciação celular

A diferenciação celular resulta da expressão diferencial de genes e é um processo ontogenético que ocorre no desenvolvimento dos seres multicelulares. Nesse sentido, é uma seqüência precisa de eventos que devem acontecer em tempos e locais apropriados, gerando e mantendo estados de diferenciação (redução do número de funções), com especialização para determinadas atividades estáveis. Esse fenômeno pode alterar a forma da célula, seus produtos para exportação e para sua própria estrutura e as moléculas de sua superfície. Essas alterações refletirão no modo com que essa célula interage com outras células e com a matriz extracelular. É, portanto o processo pelo qual as células de um organismo começam a se tornar diferentes em sua forma, composição e função (ALBERTS *et al.*, 1997).

O processo de diferenciação celular é amplamente distribuído nos seres vivos, podendo ser observado em procariotas, passando por organismos mais complexos e chegando aos organismos superiores, onde importantes fenômenos,

além da embriogênese, são também resultados de processos de diferenciação celular, tais como hematopoiese e a produção de anticorpos (DAWID e BROWN, 1996), entre outros.

4.2.2. Diferenciação celular em tripanosomatídeos

Os tripanossomatídeos foram supostamente vistos pela primeira vez por Anton Van Leeuwenhoek, em 1680, ao observar, no intestino de tabanídeos, formas que podiam corresponder ao *Trypanosoma theilei* (HOARE, 1972). Mais tarde, Dobell, em 1832, relatou organismos semelhantes nestes mesmos insetos (WALLACE, 1966).

A família *Trypanosomatidae* inclui um grande número de espécies pertencentes a vários gêneros, incluindo patógenos e não patógenos (COELHO *et al.*, 2002).

Dentre as muitas espécies de protozoários, os tripanosomatídeos têm recebido especial atenção por parte dos pesquisadores, uma vez que alguns gêneros dessa família, tais como *Leishmania* e *Trypanosoma*, incluem parasitas que são transmitidos por insetos vetores aos hospedeiros mamíferos, nos quais causam diversas doenças (FIORINI *et al.*, 1989; AFOLAYAN e MEYER, 1997).

Estudos sobre a diferenciação celular em tripanosomatídeos têm revelado que vários fatores são capazes de influenciar, induzindo ou reprimindo, este processo (WALLACE *et al.*, 1983; FIORINI *et al.*, 1985; COELHO *et al.*, 2002; SARAIVA *et al.*, 2005).

A forma e o aspecto dos tripanosomatídeos são mantidos por um conjunto de microtúbulos subpeliculares, os quais são unidos uns aos outros e à membrana plasmática. As células dos tripanosomatídeos possuem uma organização extremamente precisa de microtúbulos e filamentos, com algumas das suas organelas e estruturas, tais como a mitocôndria, cinetoplasto, corpo basal e flagelo, presentes em cada célula como simples cópias. A duplicação destas estruturas e mudanças em sua posição durante o ciclo de vida proporciona diferenciações marcantes dentro de eventos envolvidos na determinação da forma e divisão celular (GULL, 1999).

Assim, as características típicas de um tripanosomatídeo são: (a) corpo em geral alongado, contendo um único flagelo, que emerge na extremidade anterior da célula (a motilidade do protozoário ocorre com o flagelo à frente, isto é, o batimento flagelar puxa o corpo); (b) o cinetoplasto, uma região especializada da mitocôndria, um túbulo alongado e único, onde o DNA mitocondrial está acumulado; (c) um conjunto de microtúbulos subpeliculares regularmente espaçados está presente abaixo da membrana plasmática; (d) o flagelo (usado para locomoção e/ou adesão ao substrato) emerge da bolsa flagelar, uma invaginação da membrana plasmática. Endocitose e exocitose ocorrem neste local, a única região do corpo celular onde microtúbulos subpeliculares estão ausentes; (e) o Complexo de Golgi, contendo poucas cisternas, está localizado próximo à bolsa flagelar. Há, ainda, um núcleo central e uma organela citoplasmática característica, o glicosomo, uma estrutura onde a maioria das enzimas da via glicolítica está concentrada. Os glicosomos estão distribuídos por todo o citoplasma das células e morfologicamente se assemelham a peroxisomos (WALLACE, 1977).

Durante o seu ciclo de vida em hospedeiros vertebrados ou invertebrados, os tripanosomatídeos não apresentam o mesmo aspecto, modificando sua dimensão, forma e organização. Dentro de cada forma ou estágio evolutivo, observa-se, em algumas espécies, certo grau de polimorfismo, caracterizado pela presença ou ausência da porção livre do flagelo, pela posição do cinetoplasto, pelas dimensões do parasito e pela presença de formas finas e grossas, entre outras. Cada forma é definida por critérios que incluem: aspecto geral da célula, a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e a região da qual o flagelo emerge da bolsa flagelar (HOARE e WALLACE, 1966).

Rey (2001) distingue, morfologicamente, os seguintes tipos ou formas que, em maior ou menor número, caracterizam os estágios evolutivos dos vários gêneros e espécies (FIGURA 1):

- Amastigota: forma de pequenas dimensões e contorno aproximadamente circular, ovóide ou fusiforme. O corpo é achatado, com pouco citoplasma e com núcleo relativamente grande, redondo e excêntrico. O cinetoplasto é bem visível, porém, o flagelo, reduzido ao segmento intracelular, em geral não é reconhecível nas preparações coradas e examinadas à microscopia óptica. Por não haver parte externa do flagelo, a amastigota é praticamente imóvel.

- Promastigota: é a forma com citossomo (corpo celular) longo e achatado, ora mais largo, ora mais delgado; por vezes, lanceolado ou espiralado. Núcleo situado na porção média, enquanto o cinetoplasto fica próximo à extremidade anterior, por onde sai o flagelo. Este atravessa um estreito canal denominado bolsa flagelar ou reservatório, que se abre para o exterior por uma abertura geralmente estreita, no pólo anterior do corpo celular.

- Epimastigota: distingue-se da promastigota porque o cinetoplasto está situado nas proximidades do núcleo e porque o reservatório, sempre estreito, abre-se lateralmente. O flagelo emerge, portanto, longe da extremidade anterior, mas mantém-se colado à membrana do citossomo por uma prega da bainha flagelar denominada ondulante, em vista de acompanhar os movimentos flagelares. Só depois de ultrapassar o pólo anterior da célula é que o flagelo se torna livre.

- Tripomastigota: esta forma tem o citossomo longo e achatado, como a forma promastigota, porém apresenta o cinetoplasto e a bolsa flagelar deslocados para a região entre o núcleo e a extremidade posterior, não raro muito próximo desta. O flagelo percorre toda a extensão do corpo celular aderido por sua longa membrana ondulante.

- Esferomastigota: distingue-se da forma amastigota por apresentar um flagelo mais longo, que se exterioriza e permite movimentar o corpo arredondado do parasito. Constitui, em verdade, uma forma de transição na evolução de amastigota para as demais formas flageladas do protozoário.

- Coanomastigota: nos flagelados do gênero *Crithidia*, encontram-se formas pequenas, com o corpo curto, truncado na extremidade flagelar e com ligeira constrição no terço anterior. A bolsa flagelar é mais ampla e afunilada, concorrendo para dar um aspecto de taça à região de onde parte o flagelo. O cinetoplasto é grande, lateralizado e relativamente posterior, situando-se, em geral, junto ao núcleo.

Além das formas citadas, são encontradas:

- Paramastigota: forma alongada com cinetoplasto lateral ao núcleo. É observada no gênero *Herpetomonas*.

- Opistomastigotas: forma alongada com cinetoplasto posterior ao núcleo e o flagelo se originando próximo ao cinetoplasto e emergindo na extremidade posterior, atravessando todo o citoplasma (WALLACE, 1977).

- Endomastigotas: formas alongadas com flagelos curvados intracelularmente, o que emerge pela extremidade anterior do corpo, tendo ou não porção livre (WENYON, 1913).

- Escleromastigotas: formas “císticas” ou de resistência encontradas em tripanosomatídeos monoxênicos (RANQUE *et al.*, 1974).

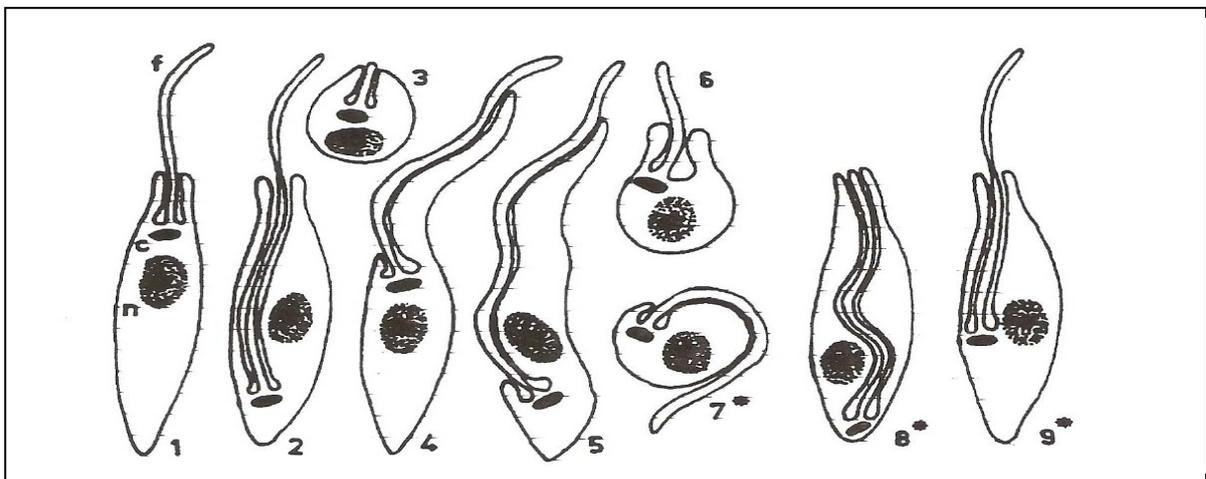


FIGURA 1 – Estágios morfológicos e de diferenciação celular apresentados pelos organismos da família *Trypanosomatidae*: 1. Promastigota; 2. Opistomastigota; 3. Amastigota; 4. Epimastigota; 5. Tripomastigota; 6. Coanomastigota; 7. Esferomastigota; 8. Endomastigota; 9. Paramastigota (f. Flagelo, c. Cinetoplasto, n. Núcleo). Fonte: Rey (2001).

4.2.3. Diferenciação no gênero *Herpetomonas*

Os tripanosomatídeos do gênero *Herpetomonas* têm recebido a denominação de monogenéticos, uma vez que, para as espécies desse grupo, não se conhece papel patogênico para animais ou vegetais (DAWID e BROWN, 1996).

Herpetomonas samuelpeessoai é um protozoário do gênero monogenético, uniflagelado, caracterizado por três formas de desenvolvimento (promastigota, paramastigota e opistomastigota) e cresce com relativa facilidade em meios artificiais quimicamente definidos (PICHARA *et al.*, 2002).

Promastigota (cinetoplasto anterior ao núcleo) é a forma freqüentemente observada em culturas ou no inseto. Ao se diferenciar, geralmente quando a cultura atinge a fase estacionária de crescimento, surgem as formas paramastigota (cinetoplasto lateral ao núcleo). Já foi observado que, em cultura, formas promastigota de *H. megaseliae* transformam-se em opistomastigotas (ANDRADE e ALMEIDA, 1980). Este último estágio desaparece quando o protozoário é introduzido no hospedeiro invertebrado (DAGGET, DOLLAHON e JANOVY, 1972). O estágio de desenvolvimento denominado opistomastigota (cinetoplasto posterior ao núcleo), considerado estágio de diferenciação ou transformação celular reversível (DE SOUZA, 1995), é característico do gênero *Herpetomonas*, não sendo observado em nenhum outro da família *Trypanosomatidae*. Entretanto, estágios semelhantes podem ser observados na forma coanomastigota de *Herpetomonas (Crithidia) roitmani* (FARIA e SILVA *et al.*, 1996), denominados opistomorfos (CAMARGO *et al.*, 1992) ou metacoano (SOUZA *et al.*, 1994).

Alterações morfológicas, bioquímicas, no crescimento, na diferenciação e motilidade podem ser observadas nesses flagelados, após tratamento com várias drogas (PICHARA *et al.*, 2002).

Vários estudos têm demonstrado que diversos fatores são capazes de induzir a diferenciação celular em *Herpetomonas*. Fatores que induzem o aparecimento da forma opistomastigota incluem o aumento do tempo de cultivo e da temperatura de incubação (ROITMAN, ROITMAN e AZEVEDO, 1972) e, ainda, o cultivo do

protozoário em presença de droga carcinogênica (PICHARA *et al.*, 2002), ou em condições que interferem com componentes da membrana plasmática ou com os ácidos nucléicos, tais como 2- deoxi- D-glicose (ANGLUSTER, BUNN e SOUZA, 1977), radiação ultravioleta (ESTEVES *et al.*, 1979), concanavalina A (ALVIANO *et al.*, 1981), anestésicos locais (THOMAS *et al.*, 1981a), dimetilsulfóxido (CASTELLANOS *et al.*, 1981; SOARES *et al.*, 1988; SANTOS *et al.*, 2002), drogas colinérgicas (THOMAS *et al.*, 1981b), corante fotodinâmico (azul de metileno) (CASTELLANOS *et al.*, 1985), propranolol (LOPES *et al.*, 1983), lipossacarídeos (FIORINI *et al.*, 1985), butirato (NAKAMURA e PINTO, 1989), anticorpos específicos (TORAS, 1991). Drogas que interferem com o ciclo celular, tais como a hidroxiuréia, induzem também um aumento do número de formas opistomastigotas em cultura (KNIGHT, 1976).

Holetz *et al.* (2002) realizaram uma pesquisa na qual verificou-se o efeito de 15 plantas medicinais (extratos brutos ou óleos essenciais) no crescimento e diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpessoai*. Destas, *Ocimum gratissimum*, *Lippia alba*, *Piper regnellii*, *Stryphnodendron adstringens*, e *Tanacetum vulgare* mostraram atividade antiprotozoário, *Psidium guajava* e *Punica granatum*, menor atividade e *Achillea millefolium*, *Eugenia uniflora*, *Mikania glomerata*, *Plantago major* e *Spilanthes acmella* não apresentaram atividade. Por outro lado, *Arctium lappa*, *Erythrina speciosa*, e *Sambucus canadensis* estimularam o crescimento de *H. samuelpessoai*, além de *L. alba* e *S. acmella* estimularem a diferenciação celular deste flagelado. Estes resultados indicaram que plantas medicinais possuem princípios ativos contra *H. samuelpessoai*, o qual parece ser útil como modelo para seleção de plantas que contém drogas tripanosomicidas.

Em adição, *Herpetomonas samuelpessoai* apresenta também antígenos semelhantes aos do *Trypanosoma cruzi* (HOLETZ *et al.*, 2002), podendo induzir resposta imune humoral e mediada por células em camundongos desafiados com *Trypanosoma cruzi* (SOUZA e ROITMAN, 1971; SOUZA *et al.*, 1980), fato que reforça a importância desses organismos no que tange à reatividade antigênica cruzada encontrada entre os mesmos, além de servir como modelo biológico na área de imunologia.

Apesar da utilização de tripanosomatídeos como modelos para o estudo de ação de drogas sintéticas ser bastante investigada no meio científico, ainda é pouco explorada a utilização destes em testes com extratos vegetais e, conseqüentemente, quais efeitos exerceriam ao nível celular “in vitro” (LOPES *et al.* 1989; FIORINI *et al.*, 1991; THOMAS *et al.*, 1981a).

4.3. AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE (TESTE DO MICRONÚCLEO)

Apesar da valiosa contribuição para o controle de muitas doenças, o uso de medicamentos na prática médica produz efeitos indesejáveis, entre os quais a carcinogênese. O teste de micronúcleo de roedores “in vivo” é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte da bateria de testes recomendados para estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial e que possam apresentar atividade mutagênica (RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES, 2003).

O teste do micronúcleo é o ensaio “in vivo” mais amplamente utilizado para detectar agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal). Foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos, mas é também realizado em ratos (RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES, 2003).

As características básicas do teste são: (1) o efeito do agente químico é observado em eritrócitos policromáticos anucleados (PCEs); (2) o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele contenha deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente; (3) os micronúcleos são facilmente identificáveis e a sua distribuição é bem definida; e (4) a frequência de micronúcleo induzida em eritrócito policromático é dependente do tempo de amostragem (RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES, 2003).

Os eritroblastos, na medula óssea, sofrem uma duplicação final dos cromossomos e se diferenciam em eritrócitos policromáticos. Os micronúcleos (MN) aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células precursoras. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, o qual será visível como um pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula (RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES, 2003).

Micronúcleos são núcleos pequenos, separados e adicionais ao núcleo principal da célula, produzidos durante a telófase da mitose por perda de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros. Eritrócito policromático (PCE) é um eritrócito imaturo, em um estágio intermediário de desenvolvimento, que ainda

contém ribossomos e, portanto, pode ser distinguido do eritrócito normocromático (NCE) por coloração seletiva para ribossomos (SBMCTA - Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese, 2005).

Heddle e Carrano (1997) mediram o conteúdo de DNA de micronúcleos induzidos por radiação gama na medula de camundongo e mostraram que esse conteúdo variou de 0,5 a 11,1% do núcleo diplóide em G1, com média de 3,5%. Tais resultados estão de acordo com o esperado, na hipótese de que os micronúcleos surgem de fragmentos acêntricos produzidos por quebra ao acaso do genoma do animal.

Segundo o procedimento original descrito por Heddle (1973) e Schmid (1976), os micronúcleos são contados nos eritrócitos jovens. Quando os eritroblastos expõem seu núcleo, ao se transformarem em eritrócitos maduros, os micronúcleos permanecem no citoplasma, onde são facilmente reconhecíveis. Durante um período de 10 a 24 horas, os eritrócitos jovens são policromáticos (RNA positivos), isto é, coram-se em azul e não em vermelho. Contando-se os micronúcleos em apenas nesse tipo de célula, sabe-se que eles se formaram na mitose anterior, na presença do agente mutagênico. Como o período entre a última divisão e a formação do eritrócito policromático é de 8 a 12 horas, é óbvio que só se encontram micronúcleos induzidos pelo agente cerca de 10 horas após o tratamento. Além disso, o intervalo mínimo dentro do qual os micronúcleos podem ser detectados corresponde à duração do estágio de policromático, entre 10 a 24 horas. Os micronúcleos são tipicamente arredondados, com diâmetro de 1/20 a 1/5 do diâmetro do eritrócito. Correspondem aos que se denomina, em hematologia, de corpúsculo de Howell-Jolly. A taxa espontânea de eritrócitos policromáticos com micronúcleo é baixa e consistente, apresentando cerca de três por mil células.

Recomenda-se usar animais entre 7 a 12 semanas de idade, sendo cinco para cada dose e contar 1000 eritrócitos policromáticos por animal. Outra possibilidade é contar 2000 eritrócitos porque, como a passagem de eritrócito policromático a maduro, normocromático, é um processo contínuo, a decisão de contar um eritrócito em transição como jovem ou adulto, é mais ou menos subjetiva (RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

As substâncias a serem testadas são, geralmente, administradas a roedores e o efeito verificado em esfregaço de medula óssea ou células de sangue periférico. Este ensaio serve como primeiro passo no estudo de compostos mutagênicos, tendo a vantagem de ser mais rápido que a análise de aberrações cromossômicas.

O ensaio de micronúcleo “in vivo” foi descrito por Schmid (1974), sendo uma técnica simples e rápida na preparação e leitura das lâminas, porém não exato como a análise das aberrações cromossômicas. No monitoramento da quebra de cromossomos, o teste de micronúcleo não é tão sensível como o teste da metáfase de medula óssea, porém é um método de rotina toxicológico amplamente apropriado para detectar a genotoxicidade de um composto.

São inúmeros os trabalhos utilizando a técnica do micronúcleo para a avaliação de mutagenicidade e/ou antimutagenicidade de diversos produtos, aos quais os seres humanos estão expostos.

A análise do potencial mutagênico da tributiltina (TBT) e ligação inorgânica (PbII), utilizando o teste do micronúcleo, revelou seu potencial genotóxico em *Hoplias malabaricus* (traíra), utilizando-se dose de 0,3mg/g de peso de TBT e 21mg/g de peso de PbII (FERRARO *et al.*, 2003).

Scher *et al.* (2000) analisando o potencial genotóxico do Saião, planta cujo extrato é amplamente utilizado como antiinflamatório por seres humanos, relataram

que o extrato aquoso da referida planta não apresentou ação mutagênica em camundongos, pelo teste de micronúcleo.

Rampazo *et al.* (2002) observaram, pelo teste do micronúcleo, um efeito protetor da clorofillina, um sal obtido da clorofila, contra mutações induzidas pela mitomicina C “in vitro”, em células de hamster chinês.

Os testes de micronúcleo e cometa foram utilizados para a análise do pesticida Carbofuran e seus quatro metabólitos (carbofuranphenol, 3- Ketocarbofuran, 3-hidrocarbofuran e nitrosocarbofuran) nas doses de 0,1 e 0,4 mg/Kg, administrados em ratos por via intraperitoneal, e os resultados mostraram que 3-Ketocarbofuran, 3-hidrocarbofuran e nitrosocarbofuran são potencialmente mutagênicos (ZHOU *et al.*, 2005).

No estudo realizado por Delmanto *et al.* (2000), demonstrou-se que o chá de cogumelo *Agaricus blazei*, conhecido como cogumelo do sol, possui efeito protetor contra mutagenicidade da ciclofosfamida em camudongos, pela análise de micronúcleos.

Ferreira, Carvalho e Maistro (2003) avaliaram o potencial antimutagênico do extrato de *Solanum melongena* (berinjela), frente ao quimioterápico doxorubicina, utilizando os ensaios citogenéticos de metáfase de medula óssea e também o ensaio do micronúcleo. Neste trabalho os animais que receberam o extrato de *Solanum melongena*, tiveram uma redução estatisticamente significativa dos efeitos clastogênicos causados pelo referido quimioterápico.

Hayashi *et al.* (1992) executaram o ensaio de micronúcleo usando reticulócitos de sangue periférico de ratos tratados com ciclofosfamida e mitomicina C. Até então, acreditava-se que o sangue periférico de ratos era inviável para a realização do teste do micronúcleo. Aplicou-se um método de coloração com revestimento das lâminas

com o corante laranja de acridina. Os ratos foram tratados com mitomicina C ou ciclofosfamida. Foram coletados 5 microlitros de sangue, em intervalos de 0 a 72h após o tratamento. Para comparação, utilizou-se a técnica do micronúcleo com células de medula óssea, sacrificando-se os animais 30 horas após o tratamento. Observou-se a incidência dos micronúcleos, sugerindo, assim, que os reticulócitos periféricos de ratos podem ser usados como células-alvo para o ensaio do micronúcleo, com resultados confiáveis.

Zanoni *et al.* (2005) observaram efeito clastogênico do extrato de caule de *Austroplenckia populnea*, utilizando os testes do micronúcleo e de aberrações cromossômicas. O extrato vem sendo estudado quanto ao seu potencial de reduzir a produção de espermatozóides. Os resultados obtidos evidenciaram potencial clastogênico do mesmo em células de ratos *Wistar*, sendo que, por sugestão dos autores, o seu uso por seres humanos deve ser interrompido até que sejam feitas investigações adicionais.

Maistro, Carvalho e Cascon (2005) avaliaram o potencial mutagênico do óleo essencial de *Copaifera duckey* em células de ratos *Wistar*, utilizando a análise de aberrações cromossômicas em células da medula óssea e o teste do micronúcleo, em células de sangue periférico. O estudo demonstrou efeito citotóxico do óleo em altas concentrações.

Duas técnicas podem ser avaliadas no mesmo animal e têm diversas vantagens, tais como reduzir o número de animais utilizados, esclarecer respostas clastogênicas marginais de agentes e correlacionar resultados de genotoxicidade de técnicas diferentes.

Bucker, Carvalho e Alves-Gomes (2006), com o objetivo de realizar um estudo sobre mutagenicidade e genotoxicidade em peixes da espécie *Eingenmannia*

virescens, pela exposição ao benzeno, utilizaram as técnicas de frequência de micronúcleos e o ensaio cometa. Foram coletadas amostras de sangue de 10 peixes em diferentes tempos de exposição (24h, 48h, 72h, 96h e 360h). Para análise das lâminas do teste do micronúcleo, foram coletadas mil células e estipulada a frequência de ocorrência de micronúcleos. Para a análise do ensaio cometa a contagem foi feita estipulando 4 classes de danos (I, II, III, IV) e para a análise estatística foram atribuídos valores numéricos (ranques) de 0 a 3, respectivamente, verificando diferenças significativas para a soma dos ranques em todos os tempos de exposição em relação ao tratamento oral. No teste do micronúcleo, não foi possível detectar efeitos mutagênicos significativos nos eritrócitos analisados. No entanto, para o ensaio cometa os resultados sugeriram ação genotóxica do benzeno.

Segundo Ribeiro, Salvadori e Marques (2003), quando se compara o teste do micronúcleo com o teste de aberrações cromossômicas em medula óssea “in vivo”, o teste do micronúcleo é tecnicamente mais simples, pode ser utilizado em menor tempo, tem um resultado menos subjetivo, detecta agentes clastogênicos e aneugênicos, requer menor número de animais e pode ser automatizado para análise de micronúcleo por análise de imagem e citometria de fluxo. Assim, é um teste muito apropriado para ser usado rotineiramente.

Os resultados positivos obtidos com o teste do micronúcleo fornecem fortes evidências de genotoxicidade sistêmica da substância química avaliada. Sob condições experimentais apropriadas (isto é, quando ocorre exposição da medula óssea), os resultados negativos suportam a conclusão de que a substância teste não é genotóxica “in vivo” (RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES, 2003).

Conforme citado e exemplificado através de relatos de pesquisas, o teste de micronúcleo é um método eficazmente desenvolvido para avaliar a habilidade de substâncias para induzir dano cromossômico estrutural e/ou numérico em células em estágio de divisão.

4.4. CIPÓ-DE-SÃO-JOÃO - *Pyrostegia venusta*

Pyrostegia venusta, planta da família *Bignoniaceae* é popularmente conhecida como flor-de-são-joão, cipó-de-são-joão, cipó-bela-flor, marquesa-de-belas, cipó-pé-de-lagartixa, cipó-de-lagarto. Pela etimologia da palavra, o nome científico significa: *Pyrostegia*: do grego *pyr* = fogo, *stege* = coberta, e *venusta*: do latim *venustus*, com referência às vistosas flores desta espécie (TAKAEDA e FARAGO, 2001).

O cipó-de-são-joão é uma trepadeira lenhosa, vigorosa, nativa em quase todo o território brasileiro, de ramagem densa, encontrada com muita frequência dispersa em campos, revestindo barrancos, margens de estradas e cercas de pastagens. O seu nome é alusivo ao seu constante uso na decoração das festividades de São-João, de norte a sul de todo país. É a flor que enfeita os mastros de festas juninas e que foi eleita representativa da cidade de Campinas-SP. Possui inflorescências numerosas, com flores tubulares, longas, alaranjadas, claras ou escuras, nos meses de inverno, quando se destaca do resto da vegetação. Ocorre também uma variedade de flores amarelas, muito rara em cultivo (LORENZI e SOUZA, 1999).

É uma espécie ornamental, com propriedades medicinais e tóxicas. É uma planta que mede de 2-4m de comprimento, com folhas opostas, compostas de dois

folíolos, eventualmente três gavinhas trifidas. Os folíolos possuem 3 cm de comprimento e 2cm de largura. Floresce mais intensamente do final de julho a setembro (TAKAEDA e FARAGO, 2001).

As suas flores, folhas e caules são utilizadas na medicina popular para tratamento de manchas brancas no corpo (leucoderma, vitiligo). O caule é utilizado como tônico antidiarréico. Trata-se de uma planta ornamental que se multiplica rapidamente, servindo para revestir muros e caramanchões (LORENZI, 1991).

Estudos do néctar das flores conduziram ao isolamento de aminoácidos e de açúcares (GOTTSBERGER *et al.*, 1984).

A espécie tem recebido pouca atenção por parte de fitoquímicos, com registro de pirostegina, um glicosídeo provavelmente relacionado com a toxidez da planta (LORENZI, 1991), carotenóides nas flores (HARBORNE, 1967) e rutina nas folhas (SANTOS e BLATT, 1998).

Ao considerar que o solo de cerrado e de mata apresentam diferenças na fertilidade das plantas, e, que este fator pode levar às diferenças na produção de compostos fenólicos, estudos foram realizados analisando quantidades de flavonóides, fenóis solúveis e taninos de folhas de *Pyrostegia venusta*, coletadas na mata e no cerrado, com o objetivo de verificar a influência desses biócoros na sua produção. Tanto os resultados de flavonóides como os de fenóis, não mostraram diferenças significativas entre as plantas de mata e cerrado, sugerindo que a espécie não apresenta plasticidade fenotípica baseada nesses caracteres, considerando as diferenças de solo dos locais de coleta. Não foram detectados taninos nas folhas desta espécie (SANTOS e BLATT, 1998).

O estudo químico das raízes de *Pyrostegia venusta* foi desenvolvido em continuidade à investigação fitoquímica que vem sendo realizada com a família

Bigoniaceae. O extrato etanólico das raízes forneceu quatro substâncias, que foram identificadas com base na interpretação de dados espectrais, principalmente RMN ^1H e ^{13}C , como alantoína, os esteróides β -sitosterol e 3 β -O- β -D-glicopiranosil-sitosterol e a flavanona hesperidina. Os dados de RMN uni-(1D) e bidimensional (2D) do derivado peracetilado foram usados para a confirmação estrutural, atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio (δH) e carbono (δC). Assim, foi possível também identificar a estrutura da flavanona natural 4 isolada de *Pyrostegia venusta*, a qual foi caracterizada definitivamente como hesperidina {4, 7-O-rutinosil-3',5-diidroxi-4'-metoxiflavanona = 7-O-[α -L-ramnopiranosil (1-6)- β -D-glicopiranosil]-3',5-diidroxi-4'-metoxiflavanona} substância natural já descrita na literatura e registrada pela primeira vez neste estudo como bioproduzida por espécie da família *Bigoniaceae* (FERREIRA TREVISAN, ALVARES e HOUGHTON, 2000).

Os flavonóides têm sido reconhecidos como responsáveis por atividade antialérgica, antiinflamatória, antiviral, antiproliferativa e anticancerígena, além de afetar alguns aspectos do metabolismo de mamíferos (WATTENBERG, 1995).

A alantoína possui atividade antiinflamatória, antipéptica, antipsoríase, antiúlceras, imunoestimulante e queratolítica, além de ser muito utilizada em dermatologia. O isolamento de 7-O- β -D glicopiranosilacacetina e meso-inositol das flores de *Pyrostegia venusta*, também requer atenção especial dos pesquisadores envolvidos em investigações de atividade biológica de produtos naturais. A flavona acacetina, aglicona, revelou atividade antiinflamatória, protetora capilar e espasmolítica (FERREIRA TREVISAN, ALVARES e HOUGHTON, 2000).

Na revisão de literatura, não foram encontradas pesquisas sobre a atividade antimicrobiana e mutagênica desta planta, assim como efeitos em sistemas

eucarióticos unicelulares “in vitro”, fato este que também justifica o presente trabalho.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Campus de Alfenas/MG, sob nº 14A/2007 (ANEXO A).

5.2 MICRORGANISMOS

Para o estudo de diferenciação celular, foi utilizado o tripanosomatídeo *Herpetomonas samuelpessoai* (ATCC 30252) (GALVÃO *et al.*, 1970; ROITMAN *et al.*, 1976).

Para os experimentos de ação antimicrobiana, foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas e leveduras:

BACTÉRIAS

Bacillus cereus (ATCC 11778)

Bacillus stearothermophilus (ATCC 7953)

Bacillus subtilis (ATCC 6633)

Enterobacter aerogenes (ATCC 13048)

Escherichia coli (ATCC 25922)

Escherichia coli (ATCC 8739)

Klebsiella pneumoniae (ATCC 13883)

Micrococcus luteus (ATCC 9341)

Proteus mirabilis (ATCC 25933)

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 25619)

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)

Salmonella typhimurium (ATCC 14028)

Staphylococcus aureus (ATCC 6538)

Staphylococcus epidermidis (ATCC 12228)

Streptococcus pyogenes (ATCC 19615)

Streptococcus salivarius (IAL 1863)

LEVEDURAS:

Candida albicans (ATCC 10231)

Cryptococcus neoformans (ATCC 20509)

Saccharomyces cerevisiae (ATCC 2601)

5.3 COLETA DO MATERIAL

As folhas de *Pyrostegia venusta* foram coletadas em Alfenas – MG, à beira da Rodovia BR 179, Km zero, no mês de junho de 2006. A exsicata foi identificada pela equipe do Laboratório de Botânica da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL,

coordenada pelo Prof. Dr. Marcelo Pólo, sendo posteriormente armazenada no Herbário da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas-MG, sob o nº 270.



FIGURA 2 – Foto ilustrativa da planta *Pyrostegia venusta*

Fonte: Takeda, 2001.

5.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO

O extrato das folhas frescas de *Pyrostegia venusta* foi obtido através de extração com álcool etílico a 70° GL conforme técnica descrita por Caceres *et al.* (1990,1995).

Foram pesados 600g de folhas da planta e colocadas em 3000 mL de álcool etílico 70° GL. Esta mistura foi macerada em balão volumétrico (5000mL), à temperatura ambiente, por 15 dias, ao abrigo da luz, sendo feita agitação manual diária. Após 15 dias, os extratos foram filtrados em papel de filtro tipo xarope e

mantidos sob refrigeração. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório e filtrados em filtro Millipore® (0,22µm). Posteriormente os extratos obtidos foram colocados em frasco âmbar estéril e mantidos sob refrigeração a 4°C.



FIGURA 3 – Foto ilustrativa do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos - UNIFENAS, 2006.

5.5 MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS

5.5.1 Tripanosomatídeo

A amostra de tripanosomatídeo foi cultivada e mantida em meio complexo de Roitman (ROITMAN *et al.*, 1972), com repicagens semanais, após a incubação a 28°C, por 48 horas, em estufa para BOD, sendo em seguida armazenada sob refrigeração.

5.5.2 Cepas Bacterianas e de Leveduras

As cepas bacterianas foram mantidas em meio BHI (DIFCO/OXOID), com repicagens quinzenais. O crescimento e manutenção das amostras foram feitos em estufa a 37°C, por 24 horas, sendo posteriormente refrigeradas.

As leveduras foram mantidas em ágar Sabouraud glicose e cultivadas a 25°C, por 48 horas. Após, as amostras foram refrigeradas.

5.6 ENSAIOS DE AÇÃO ANTIMICROBIANA

Os testes de atividade antimicrobiana do extrato vegetal de *Pyrostegia venusta* foram realizados por dois métodos, de acordo com padrões do *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002): teste de difusão em ágar e teste de diluição em tubo.

5.6.1 Teste de difusão em ágar

Foram utilizados o meio ágar Müller-Hinton, para antibiograma, numa espessura de 5 mm, distribuído em placas de Petri de 15 cm de diâmetro, ágar BHI para o cultivo das bactérias e ágar Sabouraud glicose para o cultivo dos fungos.

Foram confeccionados poços nos meios de cultura, utilizando-se um tubo de vidro de 4 mm de diâmetro. Com auxílio de um "swab", foram feitas as sementeiras das bactérias e dos fungos, em fase log de crescimento, nas placas perfuradas. A suspensão microbiana foi realizada em solução fisiológica a 0,9%, com turvação equiparada ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland. O extrato foi adicionado aos poços confeccionados nas concentrações de 72,6 mg/mL e 145,2 mg/mL.

Após o tempo de incubação de 24 horas, foram feitas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano, medidos em milímetros, com auxílio de um paquímetro.

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

A utilização da técnica de diluição em tubo permitiu avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*. Foram preparadas soluções de extrato vegetal em concentrações decrescentes, diluídas em Caldo BHI ou em Caldo Sabouraud. Numa série de 15 tubos, foram colocadas, respectivamente, concentrações decrescentes de extrato vegetal. No tubo número 15, não foi adicionado o extrato vegetal, servindo como controle do crescimento microbiano.

Foi preparada uma suspensão bacteriana em Caldo BHI e uma suspensão fúngica em Caldo Sabouraud, com turvação correspondente ao tubo nº 0,5 da escala de Mac Farland (BIER,1980). Um mL da suspensão microbiana foi inoculado nos

respectivos tubos, contendo concentrações decrescentes do extrato vegetal. Ao adicionar esta suspensão, as concentrações do extrato e da suspensão microbiana foram reduzidas à metade. Os tubos inoculados foram respectivamente incubados a 37°C ou 25°C, por 48- 72 horas. Após a incubação, foi avaliado o crescimento microbiano, pela presença de turvação do meio de cultura. Neste caso, determinou-se a CIM, o que corresponde à menor concentração do extrato de *Pyrostegia venusta* capaz de inibir o crescimento microbiano. Para avaliar a CMM, cada tubo foi inoculado em ágar Müller-Hinton ou ágar Sabouraud e, após incubação a 37°C ou 25°C, por 48 –72 horas, foram realizadas as leituras para a verificação da presença ou ausência do crescimento microbiano, isto é, propriedade microbicida mínima do extrato vegetal.

5.7 ENSAIOS DE CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

5.7.1 Experimentos de crescimento

O crescimento celular foi estimado por contagem das células em câmara de Neubauer, em sistemas controle e submetidos ao tratamento com doses crescentes do extrato, após incubação em estufas para BOD a 28°C, por um período de 48 horas.

5.7.2 Experimentos de diferenciação celular

A diferenciação celular foi realizada em meio de cultivo quimicamente definido (ROITMAN *et al.*, 1972). Cerca de 10^6 células foram incubadas juntamente com doses crescentes do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*, a 28°C, por 48 horas. Lâminas coradas pelo método Panótico foram observadas em microscopia óptica objetivando estimar os percentuais de formas pró, para e opistomastigota. Pelo menos 200 células foram examinadas em cada preparação.

5.8 DOSE LETAL MÉDIA (DL 50) DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Pyrostegia venusta*

O estudo da DL50 foi realizado conforme as normas preconizadas pela OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*)

É princípio do teste que, com base num procedimento passo-a-passo, com o uso de um número mínimo de animais por passo, informações suficientes sejam obtidas sobre a toxicidade aguda da substância teste, de modo a permitir sua classificação.

5.8.1 Descrição do método

Os animais utilizados foram camundongos *Swiss* albinos, fêmeas, com peso corporal entre 30 a 40 gramas.

Estes foram mantidos em caixas de polietileno, em ambiente climatizado a $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar igual a $50\% \pm 20\%$, e em ciclos de luminosidade de 12 horas (12 horas claro/12 horas escuro), tratados com ração comercial Labina Purina[®] (*Nestlé Purina Petcare Company*) e água *ad libitum*. Os animais foram selecionados aleatoriamente e agrupados em caixas por tratamento, marcados de modo a permitirem sua identificação individual, e mantidos nestas caixas por cinco dias antes da dose, a fim de se aclimatarem às condições do laboratório.

O extrato foi administrado em dose única por gavagem, usando-se um tubo gástrico.

Os animais jejuaram, antes de receber a dose do extrato, por 4 horas (o alimento foi negado, mas não a água). Em seguida ao período de jejum, os animais foram pesados e o extrato administrado. Após, o alimento ainda foi negado por mais 1-2 horas.

Três animais foram usados em cada passo. A dose inicial testada foi de 300 mg/Kg de peso corporal.

Os animais foram observados individualmente após a administração da dose pelo menos uma vez durante os primeiros 30 minutos, periodicamente durante as primeiras 24 horas, com especial atenção durante as primeiras 4 horas, e daí por diante diariamente, num total de 14 dias.

No término do teste, os animais sobreviventes foram pesados e sacrificados humanitariamente, por inalação com dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas (*Report of the American Veterinary Medical Association Panel Euthanasia*, 2000). O material contaminado foi acondicionado em sacos plásticos duplos e armazenado em locais específicos até o momento de sua incineração, conforme as normas de segurança e saúde da Instituição.

5.9 ENSAIO DE MUTAGENICIDADE

5.9.1 Animais utilizados no estudo

Foram utilizados camundongos Swiss albinos adultos jovens, com idade aproximada de 12 semanas, machos e fêmeas (CSGMT, 1986), com peso corporal entre 30g e 40g (a variação de peso entre os animais, para cada sexo, não excedeu a $\pm 20\%$ do peso médio) e saudáveis, provenientes do Biotério Central da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Alfenas, Minas Gerais, Brasil, para o teste do micronúcleo. Os animais foram mantidos em grupos do mesmo sexo, em caixas de polietileno, em ambiente climatizado a $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar igual a $50\% \pm 20\%$, e em ciclos de luminosidade de 12 horas (12 horas claro/12 horas escuro), tratados com ração comercial Labina Purina[®] (*Nestlé Purina Petcare Company*) e água *ad libitum*, e aclimatados às condições do Laboratório por 7 dias (período experimental) antes da realização do experimento. Ao final do período

experimental, cada animal foi pesado e, de acordo com o peso, recebeu tratamento de 100 μ L/10g de massa corpórea. Cada animal foi devidamente identificado na cauda (marcações numéricas) a fim de assegurar a continuidade dos registros e das interpretações ao longo do estudo.

Após o tratamento experimental, os animais foram sacrificados por inalação com dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas (*Report of the American Veterinary Medical Association Panel Euthanasia, 2000*). O material contaminado foi acondicionado em sacos plásticos duplos e armazenado em locais específicos até o momento de sua incineração, conforme as normas de segurança e saúde da Instituição.

5.9.2 Grupos Experimentais

O extrato de *Pyrostegia venusta* foi testado separadamente empregando-se 3 doses (1000, 1500 e 2000 mg/Kg de peso corporal). Cada ensaio foi realizado empregando-se 5 grupos de animais, cada grupo constituído por 3 machos e 3 fêmeas (SCHNAIDER e SOUZA, 2003): **(1)** controle negativo (NaCl 0,9%) administrado por gavage; **(2)** controle positivo (50 mg/kg de N-etil-n-nitroso-urea - ENU) administrado por via intraperitoneal; **(3)** tratamento 1 (1000 mg/Kg do extrato) administrado por gavage; **(4)** tratamento 2 (1500 mg/Kg do extrato) administrado por gavage; **(5)** tratamento 3 (2000 mg/Kg do extrato) administrado por gavage.

5.9.3 Teste do micronúcleo (MN)

O teste do micronúcleo em eritrócitos da medula óssea de camundongos foi realizado 24 e 48 horas após o tratamento, empregando-se a metodologia descrita por Schmid (1976) e Zambrano *et al.* (1982). Eritrócitos policromáticos (PCEs) foram observados em aumento de 1000× empregando-se microscopia óptica (Nikon Eclipse E-200) e contados (2000 eritrócitos policromáticos anucleados por animal), com o auxílio de um contador de células digital (Contador Diferencial CCS02, Kacil Indústria e Comércio Ltda., PE, Brasil).

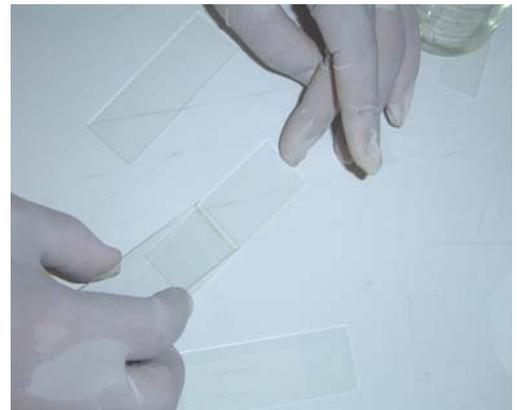
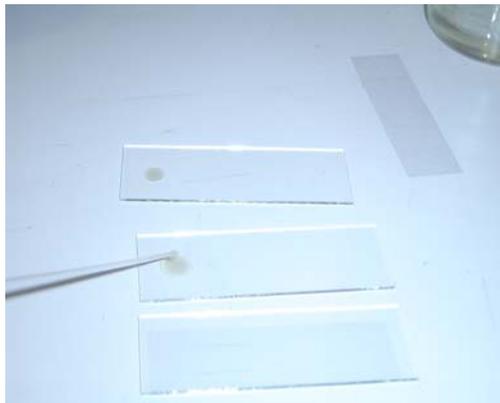
5.9.3.1 Obtenção do material de medula óssea

Resumidamente, seguem-se os passos para a obtenção do material de medula óssea:

1. Após o sacrifício do animal, rapidamente uma amostra do material de medula óssea foi coletada. Células da medula óssea foram coletadas dos fêmures, em 1 mL de solução de NaCl 0,9% (ZAMBRANO *et al.* 1982).
2. Para o sacrifício, a bancada do Laboratório foi preparada assepticamente para a coleta da amostra. Uma prancha de necropsia foi coberta com papel absorvente.
3. Após o sacrifício, a perna do animal foi limpa com álcool a 70° GL. Com o auxílio de uma pinça, tesoura de dissecação e papel absorvente, a pele foi cortada para a

retirada cuidadosa do fêmur. Os restos do animal foram enrolados em papel alumínio e colocados em sacos plásticos duplos apropriados, seguindo os procedimentos para o descarte.

4. A extremidade final proximal do fêmur foi cortada para expor o canal da medula.
5. Com o auxílio de uma seringa, 1 mL de solução de NaCl 0,9% foi injetado na abertura do fêmur, de modo a empurrar a medula para o interior de um tubo de centrifuga. Após este procedimento a seringa foi devidamente lavada com solução de NaCl 0,9% e reutilizada.
6. No tubo de centrifuga (2 mL), o material da medula óssea foi ressuspenso em NaCl 0,9% com o auxílio de uma pipeta Pasteur siliconizada a fim de se obter uma suspensão homogênea. Tal procedimento assegura uma distribuição ao acaso das células da medula óssea.
7. Essa suspensão foi centrifugada por 5 minutos, a 1.000 rpm, e o sobrenadante foi descartado com o auxílio da pipeta de Pasteur.
8. O sedimento foi ressuspenso em 0,5 mL de solução de NaCl 0,9%, contendo formol 4%.
9. Os esfregaços foram realizados (2 lâminas por animal) pingando-se duas gotas de suspensão na extremidade fosca de uma lâmina, previamente marcada com o código do animal, e com o auxílio de uma lamínula inclinada num ângulo de 45°.
10. Esses esfregaços foram secos à temperatura ambiente.



FIGURAS 4 a 9 – Fotos ilustrativas da obtenção das células de medula óssea para o estudo da freqüência de micronúcleos.

Fonte: Laboratório de Genética - UNIFENAS, 2008.

5.9.3.2 Coloração e montagem das lâminas

As células foram coradas, 24 horas após a preparação das lâminas, a fim de diferenciar eritrócito policromático (PCE) de eritrócito normocromático (NCE). O

método de coloração inclui o uso de corantes convencionais, como Leishman eosina-azul.

Para a coloração por Leishman, foi empregado o seguinte protocolo:

1. As lâminas foram colocadas em cuba de coloração, contendo corante puro de Leishman, por 3 minutos.
2. Posteriormente, essas foram transferidas para cuba de coloração contendo corante diluído em água destilada (1:6), por 15 minutos.
3. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada, por várias vezes, até a retirada total do excesso do corante.
4. Então, as lâminas foram secas à temperatura ambiente em suporte apropriado por 24 horas.
5. Os núcleos dos eritroblastos apareceram azuis escuros, os PCEs, azuis claros (acinzentados), e os NCEs, rosados. Os PCEs apresentam ser levemente maiores e mais arredondados que os NCEs.
6. Após a secagem, as lâminas foram montadas com lamínulas, empregando-se Permunt levemente diluído em xilol, e analisadas.

5.9.3.3 Análise da relação entre eritrócitos policromáticos/ normocromáticos

O número de eritrócitos policromáticos (PCEs), o número e a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN), e a relação entre

eritrócitos policromáticos e normocromáticos (PCE/NCE) foram demonstrados conforme o modelo proposto por Margolin e Risko (1998).

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS DE AÇÃO ANTIMICROBIANA, DIFERENCIAÇÃO/CRESCIMENTO CELULAR E MUTAGENICIDADE.

Para os ensaios de ação antimicrobiana e diferenciação celular, foi utilizada estatística descritiva. Os resultados obtidos nos ensaios de mutagenicidade foram submetidos à análise estatística de variância, em delineamento inteiramente casualizado e esquema fatorial $5 \times 2 \times 2$ (tratamento \times sexo \times tempo), e ao teste de Tukey (5% de significância), empregando o software SAS[®] (versão 8.01).

6. RESULTADOS

Os experimentos foram realizados em duplicada e repetidos para confirmação dos resultados.

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

6.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Não foi constatada atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da folha de *Pyrostegia venusta*, pela técnica de difusão em ágar, para as dezenove cepas testadas de bactérias e fungos, não formando halo de inibição nas concentrações testadas deste extrato (72,6 mg/mL e 145,2 mg/mL).

6.2 DETERMINAÇÃO DA CIM E CMM EM BACTÉRIAS E FUNGOS

Os inóculos utilizados para a confecção das CIM e CMM do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* foram, em média, 10^6 UFC/mL, a partir de uma suspensão microbiana, com turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland.

Na concentração dos extratos testados, não foram constatadas, pelo método de diluição em caldo, a capacidade de inibir o crescimento microbiano (CIM) e propriedade microbicida mínima (CMM).

6.3 CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO NO GÊNERO *Herpetomonas samuelpessoai*

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

Os experimentos de crescimento celular de *Herpetomonas samuelpessoai*, em presença de extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*, demonstraram que o número de tripanosomatídeos não foi reduzido conforme se aumentou a concentração do extrato, o que demonstra que este não inibe o crescimento de *Herpetomonas samuelpessoai*, nas concentrações propostas neste trabalho (TAB. 1). Com relação à diferenciação celular, não foram observadas formas diferenciadas (para-opistomastigota) estatisticamente significantes, quando comparadas aos sistemas controles.

TABELA 1

Crescimento e diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpeessoai*, em meio quimicamente definido (ROITMAN *et al.*, 1972), a 28° C, por 48h, na presença e ausência do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*.

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

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos - UNIFENAS, 2007.

6.4 DOSE LETAL MÉDIA (DL 50)

Após tratamento realizado com concentrações de 300mg/kg a 2000mg/kg do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*, conforme descrito no item Materiais e Métodos foi realizada observação detalhada dos camundongos *Swiss* albinos, por um período de 14 dias, não sendo constatado nenhum óbito, indicando que este extrato não apresenta toxicidade relativa para estes animais.

6.5 TESTE DO MICRONÚCLEO (MN)

Os dados das TAB. 2 e TAB. 3 demonstram os resultados do teste do micronúcleo obtidos em camundongos *Swiss* fêmeas e machos, tratados com as três doses do extrato de *Pyrostegia venusta* (1000, 1500 e 2000 mg/Kg) e os controles positivos e negativos, 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. As tabelas referidas também mostram a média da razão entre o número de eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE), em 2.000 células analisadas por animal.

No que diz respeito ao Teste do Micronúcleo, a análise da relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos fornece uma idéia se o extrato está diminuindo a produção de novos eritrócitos (policromáticos). Se isto ocorrer, a droga poderá ser considerada citotóxica (GOLLAPUDI e MCFADDEN, 1995).

Os resultados revelaram diferenças estatísticas significativas do número/índice percentual de PCEs micronucleados entre o grupo de animais do controle positivo (ENU 50mg/Kg) e controle negativo (NaCl 0,9%), bem como controle positivo e tratamentos (1000-2000mg/Kg) com o extrato. 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 *P. venusta* não apresenta potencial clastogênico e/ou aneugênico.

TABELA 2

Número de eritrócitos policromáticos analisados, porcentagem de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) e razão de PCE/NCE observados em células do sangue de medula óssea de camundongos *Swiss* fêmeas (F) e machos (M) tratados com o extrato de *Pyrostegia venusta* e os respectivos controles, no tempo de 24 horas.

Tratamentos 24h	Números de PCEs analisados	PCEMNs		PCE/NCE
		<i>n</i>	%	
NaCl 0.9%	12549	42	0.33	22.77
Etil-nitroso-uréia (50mg/kg)	12091	279	**2.31	**1.10
<i>Pyrostegia venusta</i> (1000 mg/kg)	13126	38	0.29	19.47
<i>Pyrostegia venusta</i> (1500 mg/kg)	12171	49	0.40	15.13
<i>Pyrostegia venusta</i> (2000 mg/kg)	12430	64	0.51	73.12

Fonte: Laboratório de Genética – UNIFENAS, 2008.

* Teste de Tukey-Kramer para médias da relação PCE/NCE

** Significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

TABELA 3

Número de eritrócitos policromáticos analisados, porcentagem de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) e razão de PCE/NCE observados em células do sangue de medula óssea de camundongos *Swiss* fêmeas (F) e machos (M) tratados com o extrato de *Pyrostegia venusta* e os respectivos controles, no tempo de 48 horas.

Tratamentos 48h	Números de PCEs analisados	PCEMNs		PCE/NCE
		<i>n</i>	%	
NaCl 0.9%	12056	55	0.46	8.97
Etil-nitroso-uréia (50mg/kg)	12039	210	**1.74	**1.51
<i>Pyrostegia venusta</i> (1000 mg/kg)	12330	65	0.53	14.17
<i>Pyrostegia venusta</i> (1500 mg/kg)	12197	63	0.52	20.23
<i>Pyrostegia venusta</i> (2000 mg/kg)	12418	67	0.54	68.23

Fonte: Laboratório de Genética – UNIFENAS, 2008.

* Teste de Tukey-Kramer para médias da relação PCE/NCE

** Significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$).

7. DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana de extratos e óleos vegetais deve-se, em sua maioria, a produtos do metabolismo secundário, como terpenóides, e compostos fenólicos, como flavonóides e saponinas, que, também na forma pura, exibem atividade. A diferença entre os achados de atividade antimicrobiana descritos em plantas pode estar relacionada com quantidade de princípios ativos presentes nos extratos, visto que esta quantidade está relacionada com a ação destes (ADAM *et al.*, 1998; DUARTE *et al.*, 2004).

Apesar de constatado por Ferreira Trevisan, Alvares e Houghton (2000), em estudos fitoquímicos da planta *Pyrostegia venusta*, compostos associados à atividade antimicrobiana, como os flavonóides, o extrato desta, neste estudo, não apresentou resultados que afirmassem a ação contra agentes microbianos. Este fato pode estar relacionado à quantidade existente destes princípios na planta em questão.

Os resultados obtidos na determinação da CIM e CMM corroboraram os resultados encontrados na técnica de difusão em ágar, demonstrando que o extrato não possui atividade antimicrobiana para as dezenove cepas testadas, nas condições propostas no presente estudo.

Estudos similares foram realizados com extratos etanólicos de diversas plantas medicinais (alecrim-pimenta, cravo, alecrim, pimenta-da-jamaica, sálvia, calêndula, entre outras). Os resultados obtidos, apesar de modestos, comprovaram o potencial antimicrobiano da sálvia, alecrim e calêndula frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e exibiram o

potencial antimicrobiano do cravo e alecrim-pimenta frente às bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella thyphimurium* demonstrando, desta forma, que extratos etanólicos de plantas apresentam perspectivas para a obtenção de antibióticos naturais (SOUZA, 1997; BARA e VANETTI, 1998; ULUBELEN *et al.*, 2000; VOLPATO *et al.*, 2001).

O estudo realizado por Gonçalves, Alves Filho e Menezes (2005) avaliou as atividades antimicrobianas de extratos hidroalcoólicos, obtidos de 17 espécies de árvores nativas do Brasil. Para os ensaios de antibiose, foi utilizado o método da difusão em ágar, com 10 diferentes microrganismos, isolados de inóculos obtidos de focos de infecções clínicas. Dos 170 testes realizados, 25% mostraram alta atividade antimicrobiana, destacando-se extratos de *Bixa orellana*, *Psidium guajava* e *Anacardium occidentale*. Excepcional atividade antimicrobiana foi observada em *Mimosa tenuiflora* contra *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus spp. coagulase-negativa*, e os extratos de *Stryphnodendron adstringens* e *Eugenia uniflora* contra *Escherichia coli*, *Providencia spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus spp. coagulase-negativa*. Dentre estas, os extratos das plantas *A. colubrina* (*Mimosoideae*), *G. americana* (*Rubiaceae*), *C. sylvestris* (*Flacourtiaceae*) e *T. avellanadae* (*Bignoniaceae*) não apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas testadas.

Cunico *et al.* (2004) avaliaram o efeito antimicrobiano do extrato bruto etanólico dos órgãos totais de *O. martiana* frente às bactérias *Enterococcus faecium* (ATCC 6569), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), utilizando-se os métodos de difusão em ágar e bioautografia. Os resultados obtidos por difusão em ágar mostraram que o extrato de *O. martiana*

apresenta potencial antibacteriano contra *E. faecium*, evidenciado pelo aparecimento de zonas de inibição de crescimento e não demonstraram ação antimicrobiana contra as outras cepas testadas.

Zauli *et al.* (2004) avaliaram o potencial antimicrobiano do extrato etanólico de *Dillenia indica* L, popularmente conhecida como Flor de Abril, nas cepas de *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Streptococcus salivarius* (CDC 262), utilizando a técnica de difusão em ágar e microdiluição seriada em tubo. Constataram atividade antimicrobiana, em halos, com 9,58mg/mL para *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. mutans* e *S. salivarius*, não apresentando halo de inibição, na quantidade testada, nas cepas de *E. coli* e *S. typhimurim*. Na CIM, ocorreu inibição do crescimento bacteriano com 95,8 mg/mL para *E. coli* e *S. typhimurium*, e 47,9mg/mL para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. mutans* e *S. salivarius*. Na CMM, a inibição total do crescimento bacteriano foi verificada na concentração de 71,85 mg/mL para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. mutans* e *S. salivarius*, e maior que 95,8 mg/mL para *E. coli* e *S. typhimurium*, concluindo que o extrato de *Dillenia indica* L. apresentou atividade antimicrobiana “in vitro” bastante significativa, frente aos microrganismos testados.

Lopes *et al.* (2006) realizaram um estudo avaliando, como nesta pesquisa, a atividade antimicrobiana do extrato seco de insulina (*Cissus sicyoides*) e do óleo de copaíba (*Copaífera langsdorfii*), em cepas bacterianas e fúngicas, como: *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterococos faecalis*, *Enterococos aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, verificando

que o óleo de copaíba inibiu o crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* e *E. faecalis*, sendo os demais microrganismos resistentes. A CIM para as bactérias sensíveis variou de 6,05 a 30,25mg/mL, com CMM de 18,15mg/mL para *E. faecalis*. O extrato de insulina não foi efetivo na avaliação antimicrobiana.

Também em 2006, Pereira *et al.* avaliaram a atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em ágar, dos extratos hidroalcoólicos de *Sambucus nigra L.* e *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., conhecidos popularmente como congonha e sabugueiro, respectivamente. Foram utilizados os microrganismos padronizados pela ATCC, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus epidermidis*, constatando-se que o extrato de congonha foi efetivo, nas concentrações de 10 e 12mg/mL, para 92,86% dos microrganismos testados, não inibindo apenas o crescimento de *E. coli*. O extrato de sabugueiro, nas concentrações de 10 e 15mg/mL, inibiu 64,29% das cepas testadas (*S. pyogenes*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *S. typhimurium*, *B. cereus*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *S. salivarius* e *S. epidermidis*).

Na tentativa de aumentar o conhecimento sobre plantas medicinais, Pinto, Pereira e Fiorini (2007), realizaram estudo sobre atividade antimicrobiana do extrato da planta *Cassia angustifolia vahl.* (Sene), executando teste de difusão em ágar e teste de diluição em tubos. Estes foram avaliados em quatro bactérias Gram-positivas (*S.aureus*, *B.subtilis*, *B.cereus* e *S.pyogenes*) e quatro Gram-negativas (*E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella typhimurium*) e dois fungos (*Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*). Os resultados foram

satisfatórios para as bactérias Gram-positivas, formando halos de inibição ao redor de quatro poços, nos quais foram adicionados 150, 200, 250 e 300µL, correspondentes às concentrações de 88,50mg/mL, 118mg/mL, 147,50mg/mL e 177mg/mL, respectivamente. Na técnica de diluição em tubos, houve a variação de concentrações de 610mg/mL a 2,39mg/mL do extrato, o que permitiu avaliar a CMM e CIM nas bactérias citadas anteriormente. Relacionado a esse estudo, foi possível verificar que, para o *S. pyogenes*, o extrato foi bactericida, tendo como CMM a de 76,50mg/mL. Apresentou-se bacteriostático a partir da concentração de 4,77mg/mL, sendo esse o valor de CIM. Já para o *B.subtilis*, o extrato foi somente bacteriostático, tendo a CIM de 76,25mg/mL. As demais bactérias foram resistentes para todas as concentrações testadas.

Em estudos de atividade antimicrobiana de extratos brutos de espécies vegetais, o potencial antimicrobiano muitas vezes não se deve a uma única substância, mas sim a um conjunto dessas substâncias. Um extrato bruto de uma espécie vegetal que possui efeito bactericida satisfatório, poderia não necessitar, portanto, de processos de isolamento de substâncias ativas, reduzindo etapas químicas e conseqüentemente custos financeiros. Isto viabilizaria uma possível utilização como fitoterápico. Por outro lado, geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos (CUNHA, 2006).

Sendo assim, químicos orgânicos têm realizado estudos, separando, purificando e analisando substâncias puras produzidas por esses vegetais, como, por exemplo, o uso da quinina em lugar de extratos de quina e da digoxina ou digitoxina em lugar de extratos de *Diditalis*. Estes foram impostos pelas vantagens relativas à reprodutividade dos efeitos, pela constância da composição, maior

eficácia, segurança e mesmo pela qualidade dos produtos, visto a maior facilidade em se estabelecer especificações para uma substância única em relação a uma mistura complexa de substâncias (SCHENKEL, GOSMANN e PETROVICK, 2000).

Por este motivo, há necessidade de um trabalho com análise de extratos mais ampla, onde se obtêm extratos purificados, frações e, finalmente, os compostos puros. Neste sentido, torna-se indispensável a análise da potência das frações e das substâncias puras em relação à sua concentração (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998), bem como suas atividades bactericida e bacteriostática.

No que se refere ao efeito do extrato de *Pyrostegia venusta* no crescimento e diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpessoai*, o estudo demonstrou que o extrato nas concentrações, que variaram de 36,3 mg/mL a 726 mg/mL, não apresentaram efeito no crescimento e diferenciação celular destes tripanosomatídeos (TAB. 1), indicando que este extrato não apresenta toxicidade.

Alguns estudos semelhantes foram realizados com outras plantas e substâncias de uso medicinal, objetivando verificar a ação sobre *Herpetomonas samuelpessoai*, o que possibilitaria sua aplicação mais segura em seres humanos.

Em um estudo realizado por Holetz (2003), foram avaliados os efeitos dos extratos brutos de quatorze plantas no crescimento e diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpessoai*. As plantas selecionadas através de informações etnobotânicas foram: *Arctium lappa*, *Achillea millefolium*, *Erythrina speciosa*, *Eugenia uniflora*, *Lippia alba*, *Mikania glomerata*, *Piper regnellii*, *Plantago major*, *Psidium guajava*, *Punica granatum*, *Sambucus canadensis*, *Spilanthes acmella*, *Stryphnodendron adstringens*, *Tanacetum vulgare* e o óleo essencial de *Acimum gratissimum*. Um efeito antiprotozoário positivo foi encontrado nos extratos de *L. alba*, *T. vulgare* e *P. regnellii*, na concentração de 1.000 µg/mL, com 90,7%, 97,4 %

e 99,5 % de inibição de crescimento, respectivamente. Os extratos de *A. millefolium*, *E. uniflora*, *M. glomerata*, *P. major*, *P. guajava* e *P. granatum* mostraram fraca atividade inibitória. Por outro lado, *A. lappa*, *E. speciosa*, *S. canadensis* e *S. acmella* demonstraram um estímulo no crescimento de *H. samuelpeessoai*.

Outro estudo realizado de Holetz *et al.* (2005), utilizando o extrato de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), revelou que este apresentou atividade inibitória sobre o crescimento de *Herpetomonas samuelpeessoai*.

Chaves (2002) observou que a bupivacaína, um anestésico local quatro vezes mais potente e tóxico que a lidocaína, inibiu o crescimento celular de *H. samuelpeessoai*, em doses superiores a 0,05%, tendo sua ação potencializada quando associada à epinefrina. Neste mesmo ensaio foi observado também um aumento de células diferenciadas paramastigota, induzidas pelo anestésico.

Em pesquisa realizada por Lopes *et al.* (2006), avaliando a ação do extrato seco de insulina (*Cissus sicyoides*) e do óleo de copaíba (*Copaífera langsdorfii*) na diferenciação, no crescimento e na morfologia do tripanosomatídeo *Herpetomonas samuelpeessoai*, foi constatada a inibição do crescimento pela copaíba na concentração de 0,2178mg/mL, não havendo inibição total em nenhuma concentração analisada. Quanto ao extrato de *Cissus sicyoides*, não foi verificada inibição do crescimento de *Herpetomonas samuelpeessoai*. Não houve diferença significativa nas contagens de pro, para e opistomastigota em relação à diferenciação e morfologia celular nos extratos testados.

Também em 2006, Netto *et al.* avaliaram a ação do extrato hidroalcoólico de *Dillenia indica* L. (flor de abril) no tripanosomatídeo *H. samuelpeessoai*. De acordo com os resultados obtidos após 24 horas de cultivo, utilizando-se o extrato, verificou-se uma queda acentuada do número de células a partir da concentração de 3,44

mg/mL. Já com 48, 72 e 96 horas de cultivo, houve também uma diminuição considerável do número de células, a partir da concentração de 2,58mg/mL. Com 120 horas de cultivo, as contagens em câmara de Neubauer apontaram, desde o controle até a concentração máxima, poucas células quando comparadas com tempos menores de incubação. No que se refere à diferenciação, foi observado que à medida que se aumentou a concentração do extrato, houve aumento da forma promastigota e diminuição da forma paramastigota, quando comparadas ao controle. Portanto, o extrato de *Dillenia indica* L. inibiu a diferenciação celular. Concentrações superiores a 3,44 mg/mL inibiram totalmente o crescimento de *Herpetomonas samuelpeñoi*.

Analisando o efeito do extrato de *Cassia angustifolia* vahl. na diferenciação e crescimento celular em *Herpetomonas*, Pinto, Pereira e Fiorini (2007), constataram que, nas concentrações de 5,9mg/mL a 59mg/mL, o efeito do extrato não provocou aumento significativo no número de células, mas também não foi observada inibição total do crescimento, e este se mostrou capaz de induzir o processo de diferenciação nas concentrações de 24mg/mL, 30mg/mL, 35mg/mL, 41mg/mL e 53mg/mL, porém em menor proporção.

Como nesta pesquisa, outra foi realizada objetivando determinar a DL50 de extratos vegetais antes da realização de um tratamento. Corroborando esta, após a análise da DL50 do extrato de *Rosmarinus officinalis* realizada por Gaiani *et al.* (2005), não foi constatada toxicidade do extrato, pois não houve óbito nas concentrações máximas 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 (BERNARDES, LIMA e MAISTRO, 2007).

Dentre os métodos para investigação de toxicidade genética *in vivo*, o teste de micronúcleo em células da medula óssea de camundongos tem sido amplamente empregado e aceito pelas agências reguladoras e comunidade científica (MATEUCA *et al.*, 2006). Este teste detecta alterações genômicas e/ou dano ao aparato mitótico, sendo os micronúcleos indicativos de perdas irreversíveis de DNA. Embora a toxicidade genética não seja medida de carcinogenicidade, esta é freqüentemente associada ao aparecimento do câncer, visto que existe uma correlação positiva entre o aumento da freqüência de micronúcleos e o aparecimento de tumores em roedores e no homem (AZEVEDO *et al.*, 2003; REZENDE, LIMA e MAISTRO, 2006).

O teste do micronúcleo aplicado neste trabalho revelou não haver diferença 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 *P. venusta* não apresenta potencial clastogênico e/ou aneugênico. Como era esperado, o reagente ENU, administrado por via intraperitoneal, como controle positivo, na concentração de 50mg/Kg, acarretou um aumento significativo no número médio de células com micronúcleos.

O estudo realizado por Almeida Neto *et al.* (2005) veio corroborar esta pesquisa, pois, ao avaliarem o efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) através do teste de micronúcleos em ratos, linhagem *Wistar* "in vivo", observaram que apenas a ciclofosfamida, substância mutagênica, teve seu efeito, com uma freqüência de média = 7,6 MNs/1000 PCEs e, com a palma forrageira, essa freqüência variou entre 1,5 e 3 MNs/1000 PCEs, que é considerada freqüência normal. Portanto, a palma forrageira não apresentou efeito mutagênico como a

Pyrostegia venusta. Também neste estudo foi avaliado o efeito antimutagênico da planta *Opuntia ficus-indica*, associando-a à ciclofosfamida, e neste tratamento houve inibição da ação mutagênica da substância em ratos, ou seja, a planta apresentou efeito antimutagênico.

Estudo semelhante, utilizando o teste do micronúcleo, foi realizado por Ribeiro *et al.* (2005), que verificaram o potencial mutagênico da fração clorofórmica do extrato do caule de *Austroplenckia populnea* conhecida popularmente como mangabarana ou marmelinho do campo (planta com atividade antiespermatogênia), em células da medula óssea de ratos *Wistar*. Os resultados revelaram que a média de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN), observada nos três tratamentos nos quais os animais receberam a fração clorofórmica do extrato (300, 600 e 900 mg/Kg), não foram significativamente diferentes em relação à média de PCEMN observada no controle negativo, indicando que o extrato obtido não possui efeito mutagênico em células da medula óssea de ratos.

Fagundes *et al.* (2005) investigaram a toxicidade genética da *Annona coriacea* (araticum-do-cerrado, marolo) utilizando o teste de micronúcleo de eritrócitos da medula óssea. Os resultados demonstraram que o extrato alcoólico das sementes desta planta, nas diferentes doses utilizadas (50, 100, 200 ou 400mg/kg) induziu um aumento significativo na frequência de micronúcleos nos eritrócitos da medula óssea de camundongos, quando comparado ao controle negativo. Além disso, este aumento foi similar àquele encontrado nos animais expostos ao controle positivo (ciclofosfamida, 250mg/kg). Estes resultados sugerem que o extrato das sementes desta planta, nas condições experimentais avaliadas,

possui um potencial significativo para induzir danos ao DNA, caracterizando-o como um agente potencialmente genotóxico.

Gaiani *et al.* (2005), avaliando o potencial mutagênico do extrato bruto das folhas e caules de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) em células da medula óssea de ratos *Wistar*, nas concentrações de 6,34mg/kg (dose terapêutica), 100 e 200mg/kg, verificaram que este extrato não apresenta efeito clastogênico e nem citotóxico sobre estas células.

Já em outro estudo realizado por Bernardes, Lima e Maistro (2007), utilizando óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), em concentrações de 1000mg/kg, 1500mg/kg e 2000mg/kg, verificou-se que, embora não se tenha evidenciado efeito citotóxico do óleo pela razão PCE/NCE em nenhuma das concentrações testadas, demonstrou-se um aumento significativo de eritrócitos policromáticos micronucleados nos grupos tratados com as duas maiores concentrações do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, indicando que o mesmo, em altas concentrações, apresenta efeitos mutagênicos em células de medula óssea de camundongos.

Souza *et al.* (2006), analisando o potencial mutagênico do extrato de *Tamarindus indica* (tamarindo) em células da medula óssea de ratos *wistar*, observaram que, em comparação com o controle negativo, houve um pequeno aumento na média de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) nas duas menores concentrações testadas do extrato (1000 e 1500mg/kg) e um aumento estatisticamente significativo de PCEMN na concentração de 2.000mg/kg. Tais resultados indicaram que, em altas concentrações, o extrato bruto de *Tamarindus indica* apresenta efeito mutagênico em células da medula óssea de ratos *Wistar*.

Valadares, Castro e Cunha (2007) investigaram o potencial mutagênico “in vivo” do extrato etanólico de *Synadenium umbellatum* (EESU), conhecida popularmente como "cola-nota", "avelós", "milagrosa", "cancerola", sobre células da medula óssea de camundongos, através do teste de micronúcleo, utilizando três concentrações do extrato (10, 25 ou 50 mg/kg/dia) e os resultados obtidos demonstraram que o EESU possui efeito mutagênico, de forma dose-dependente, sobre as células da medula óssea de camundongos.

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

A continuidade de estudos se faz necessária, utilizando talvez outras doses do extrato, para que possa ser investigada precisamente sua ação sobre o crescimento e diferenciação de *H. samuelpessoai* e os efeitos antimicrobianos e mutagênicos, realizando outros testes, como por exemplo, Ensaio Cometa, pois a *Pyrostegia venusta* é, conforme constatado neste estudo, uma planta pouco estudada, devido à falta de experimentos encontrados na vasta literatura consultada que possam ser comparados a esta pesquisa.

8. CONCLUSÃO

- 1- O extrato hidroalcoólico da planta *Pyrostegia venusta*, nas concentrações testadas, não possui atividade antimicrobiana sobre as dezesseis cepas bacterianas e três cepas fúngicas usadas.
- 2- Não foram constatadas Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato em bactérias e fungos.
- 3- O extrato de *Pyrostegia venusta* não apresentou efeito no crescimento e na diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpessoai*.
- 4- O extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* não apresentou DL50 nas concentrações testadas (300 a 2000mg/Kg), o que sugere a ausência de toxicidade desta planta.
- 5- Através do Teste do Micronúcleo, o extrato não apresentou toxicidade à medula óssea de camundongos *Swiss albinos*, nas doses testadas, não sendo considerado aneugênico e/ou clastogênico, quando administrado oralmente aos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, K. *et al.* Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against Human Pathogenic Fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v.46, n.5, p. 1739-1745, 1998.
- AFOLAYAN, A. J.; MEYER, J. J. M. The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, n. 3, p. 177-181, 1997.
- AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drugs resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.74, p. 113-123, 2001.
- AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**, 28, p.13, 1993.
- ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. Traduzido por Amauri Braga. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- ALMEIDA, F. R. **Plantas Medicinais Brasileiras**. São Paulo: Hermus, 1993. p. 341.
- ALMEIDA NETO, J. X. *et al.* Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*) "in vivo". **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v. 5, n. 2, 2005.
- ALVIANO, C. S. *et al.* Effect of concanavalin A on the surface of *Herpetomonas samuelpessoai*. **Journal of Submicroscopy Cytology**, v.13, n. 4, p. 619-626, 1981.
- ANDRADE, P. P; ALMEIDA, D. F. *Herpetomonas samuelpessoai*: Role of subpellicular microtubules in shape transitions of trypanosomatids. **Experimental Parasitology**, v. 50, n. 1, p. 57-66, 1980.
- ANGLUSTER, J.; BUNN, M. M.; SOUZA, W. Effect of 2- deoxy-D- glucose on differentiation of *Hepetomonas samuelpessoai*. **Journal of Parasitology**, n. 63, p. 922-924, 1977.
- AZEVEDO, L. *et al.* Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food Chem. Toxicol.**, v.41, p.1671-1671, 2003.
- BARA, M. T. F.; VANETTI, M. C. D. Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.7/8, n.1/2 , p.21-34, 1998.

BERNARDES, B. M.; LIMA, E. B.; MAISTRO, E. L. Estudo do potencial mutagênico do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) em células da medula óssea de camundongos Swiss albinos: teste do micronúcleo. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6. Alfenas, 2007. Disponível em:

<<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/visemic&iisimposiodepesquisa/anais/index.html>>. Acesso em: 01 Jul. 2008.

BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**. 17 ed. São Paulo: Melhoramentos, 1980. 1.056 p.

BILIA, A. R. *et al.* Analysis of kavalactones from Piper methysticum (kava-kava). **Journal of Chromatography**, v. 812, n. 1-2, p. 203-214, 2004.

BUCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) exposta a benzene. **Acta Amazônica**, Manaus (MN), Brazil, v.36, n. 3, p.357-364, jul/set. 2006.

CACERES, A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. **J. Ethnopharm.**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 55-73, 1990.

CACERES, A. *et al.* Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **J. Ethnopharm.**, Amsterdam, v. 48, n. 2, p. 85-88, 1995.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.33, n.2, p. 179-189, 2000.

CAMARGO, E. P. *et al.* Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids. **Journal of Parasitology**, v.78, p. 40-48, 1992.

CARVALHO, A. A. T. *et al.* Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram negativas. **Acta Farm. Bonaerense**, Buenos Aires, v. 21, n. 4, p. 255, 2002.

CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E. F. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, v. 72, p. 599 – 618, 2001.

CASTELLANOS, G. B.; ANGLUSTER, J. ; SOUZA, W. Induction of differentiation in *Herpetomonas samuelpessoai* by dimetilsulfoxide. **Acta Tropica**, v. 38, p-29-37, 1981.

CASTELLANOS, G. B. *et al.* Effect of methylene blue and illumination on the process of differentiation of the protozoa *Herpetomonas samuelpessoai*. **International Journal of Biology**, v. 47, n.2, p. 191-195, 1985.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n.1, p. 99-105. Jan/Fev. 1998.

CHAVES, E. C. L. **Ação da bupivacaína e epinefrina sobre *Herpetomonas samuelpessoai***. 2002. 85p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – EFOA/Ceufe, Alfenas, 2002.

COELHO, D. A. *et al.* Cultivo axênico de um tripanosomatídeo isolado de tomate (*Lycopersicon lycopersicum*). In: I SEMIC - SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIFENAS, 2002, Alfenas: UNIFENAS, 2002. p. 105.

COLLABORATIVE STUDY GROUP FOR THE MICRONUCLEUS TEST (CSGMT). Sex differences in the micronucleus test. **Mutat. Res.**,v.172, p. 151-163, 1986.

CORDEIRO, C. H. G. *et al.* Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, jul./set. 2006.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical on chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n.1, p. 3-24, Jan. 2002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n.1, p. 52-60, 1997.

CUNHA, L. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos brutos de plantas do cerrado, substâncias isoladas e derivados semi-sintéticos frente a microrganismos bucais**. 2006. 170 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de Franca, Franca, 2006.

CUNICO, M. M. *et al.* Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (*Piperaceae*). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, n. 2, jul./dez. 2004.

CSGMT (Collaborative Study Group for the Micronucleus Test). Sex differences in the micronucleus test. **Mutat. Res.**,v.172, p.151-163, 1986

DAGGET, P. M.; DOLLAHON, N. R.; JANOVY, J. *Herpetomonas megaseliae* sp (Protozoa: Trypanosomatidae) n. from *Megaseliae scalaris* (Loewy, 1866) Schmitz (Diptera: Phoridae). **Journal of Parasitology**, n. 58, p. 946- 949, 1972.

DAWID, J. B.; BROWN, D. D. Differentiation and gene regulation. Differentiation from bacteria to humans. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, n.6, p.523-525, 1996.

DELMANTO, R. D *et al.* Avaliação do efeito protetor de chás de cogumelo *Agaricus blazei* Murill contra a genotoxicidade da ciclofosfamida e do n-etil-n-nitrosuréia. **Genetics and Molecular Biology**, Uberlândia (MG), v.23, p.697, fev. 2000. Supplement.

DE SOUZA, W. Structural organization of cell surface of pathogenic protozoa. **Micron.**, v.26, n.5, p. 405-430, 1995.

DUARTE, M.C.T. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, supl.01, p.06-08, 2004.

EBI, G.C.; IFEANACHO, C. J.; KAMALU T. N. Antimicrobial properties of *Uvaria chamae* stem bark. **Fitoterapia**, v. 70, n. 6, p. 621-624, 1999.

ESTEVEZ, M. J. G. *et al.* Effect of UV radiation on the cell membrane of *Herpetomonas samuelpessoai*: binding of concanavalin A. **Acta Tropicalia**, v. 33, n.2, p.191-194, 1979.

FAGUNDES, F. A.; *et al.* *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiás, v. 2, n.1, p. 24-29, Jul. 2005.

FARIA e SILVA, P; SOARES, M. J.; DE SOUZA, W. Proliferative opisthomastigote forms in *Herpetomonas roitmani* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Parasitol Res.**, v. 82, p.125-129, 1996.

FARNSWORTH, N. R.; MORRIS, R. W. **Am. J. Pharm. Sci. Support.**, v.148, p.46-52, 1976.

FERRARO, M.V.M. *et al.* Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration test. **Genetics and Molecular Biology**, Brazil, v.27, n.1, p.103-107, set. 2003.

FERREIRA TREVISAN, D. ; ALVARES, P. S. M. ; HOUGHTON, P. J. Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre sua importância medicinal. **Química Nova**, Brasil, v. 23, n. 1, p. 42-46, 2000.

FERREIRA, L.; CARVALHO, J. C. T.; MAISTRO, E. L. Standardized *Solanum melongena* extract presents protective effects against chromosomal aberrations induced by doxorubicin in wistar rat bone marrow cells. **Cytologia**, Japan, v.68, n.2, p.177-181, 2003.

FINLAND, M. Emergence of antibiotic resistance in hospitals. **Reviews at Infectious Disease**, v.1, n. 4, p. 1935-1975, 1979.

FIORINI, J. E. *et al.* Effect of lipopolysaccharide (LPS) on the metabolism and cell surface of the trypanosomatid *Herpetomonas megaseliae*. **Biochemistry Physiology**, v. 80b, n.3, p. 537-542, 1985.

FIORINI, J.E. *et al.* Três novas espécies de tripanosomatídeos de insetos em Afenas, Minas Gerais, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n.84, p.69-74, 1989.

FIORINI, J. E. *et al.* Cell surface anionogenic groups of the protozoan *Herpetomonas megaseliae*: Effect of lipopolysaccharide. **Parasitology Research**, v. 77, n. 1, p. 102-108, 1991.

FREITAS, A. G. S. **Infecção hospitalar e resistência bacteriana uma atitude ética e multidisciplinar**. 2002. Disponível em: <http://www.ccih.med.br/sua_pagina-7.html>. Acesso em: 3 Set. 2006.

GAIANI, T. F. *et al.* Avaliação do potencial mutagênico do extrato bruto de *Rosmarinus officinalis* em células da medula óssea de ratos Wistar. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 4. Alfenas, 2005. Disponível em: <<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/ivsemic/Anais/index.html>>. Acesso em: 30 abr. 2008.

GALVÃO, A. B. *et al.* *Leptomonas pessoai* sp n (Trypanosomatidae, Kinetoplastida, Protozoa). **Revista Goiana de Medicina**, n.16, p.229-236, 1970.

GOLLAPUDI, B. B.; MCFADDEN, L. G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, v.347, n.2, p.97-99, jul. 1995.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES. H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, jul./set. 2005.

GOTTSBERGER, G.; SCHRAUWEN J.; LINSKENS H. F. Amino acids and sugars in nectar, and their putative evolutionary significance. **Plant systematics and evolution**, v. 145, n. 1, p. 55-77, 1984.

GUARRERA, P.M. Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). **Fitoterapia**, v. 76, p. 1 – 25, 2005.

GULL, K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Stanford, v.53, p. 629-655,1999.

HARBORNE, J. B. Comparative biochemistry of the flavonóides-VI: Flavonoid patterns in the Bignoniaceae and Gesneriaceae. **Phytochemistry**, v. 6, p.1646 - 1651, 1967.

HARRISON, P.F.; LEDERBERG, J. **Antimicrobial Resistance: Issues and Options**. Whashington: National Academie Press, 1998. 128p.

HAYASHI M. *et al.* The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C- and cyclophosphamide-treated rats. **Mutation Research**, v. 278, p. 209-213, 1992.

HEDDLE, J. A. A rapid *in vivo* test for chromosome damage. **Mutation Research**, v.18. p.187-190, 1973.

HEDDLE, J. A.; CARRANO, A. V. The DNA content of micronuclei induced in bone-marrow by gamma-radiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosome fragments. **Mutation Research**, v. 44, p. 63-69, 1997.

HOARE, C. A. **The Trypanosomes of mammals: a zoological monograph**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972. 749 p.

HOARE, C. H.; WALLACE, I. G. Developmental stage of Trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**, London, v. 212, p. 1385, 1966.

HOLETZ, F. B. **Efeito de extratos de plantas medicinais no crescimento, diferenciação e ultraestrutura de *Herpetomonas samuelpessoai***. 2003. 81 f.. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.

HOLETZ, F. B. *et al.* Effect of plant extracts used in folk medicine on cell growth and differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) cultivated in defined medium. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 3, p. 657-662, 2002.

HOLETZ, F. B. *et al.* Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.4, p. 397-401, Jun. 2005.

JARAMILLO, E. L. Resistência bacteriana a los antibióticos en la Unidad de Cuidados Intensivos, Hospital de Caldas (1992-1994). **Colombia Médica**, v.27, n. 2, 1996.

JORGE, M. R.; DIAZ, L. H. Actividad antimicrobiana de plantas que crecen em Cuba. **Revista Cubana Plantas Medicinai**, p.44- 47, 2001.

KNIGHT, S. A. Differentiation of *Herpetomonas megaseliae*: effects of hydroxyurea on morphology and growth. **Journal of Parasitology**, v. 10, n.8, p. 515-522, 1976.

LAPA, A. J. *et al.* Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed., Porto Alegre: UFRS, 2000. Cap. 11, p. 181-196.

LOI, M. C. *et al.* Ethnopharmacology of Ogliastra (Villagrande Strisaili, Sardinia, Italy). **Fitoterapia**, v. 75, p. 277–295, 2004.

LOPES, A. H. *et al.* Changes in cell surface anionic groups induced by propranolol in *Herpetomonas muscarum muscarum*. **Journal Eukariotic Microbiology**, Cincinnati, v.44, p. 321-325, 1989.

LOPES, A. H. C.S. *et al.* The effect of propranolol on metabolism and on membrane-associated polysaccharide components of *Herpetomonas muscarum muscarum*. **Research Commite of Chemical Pathology and Pharmacology**, v.42, n.5, p. 245-253, 1983.

LOPES, K. C. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana e ação de *Cissus sicyoides* e *Copaífera langsdorffii* na diferenciação celular de sistemas eucarióticos unicelulares. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5. Alfenas, 2006.

Disponível em:

<<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/vsemic&isimposiodespesquisa/anais/index.html>> Acesso em: 25 Mai. 2008.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1991.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas Ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1999.

LOZOYA, X. Fármacos de origen vegetal de ayer y de hoy. **Investigación y Ciência**, v. 254, p. 4-10, 1997.

MACIA, M. J.; GARCÍA E.; VIDAURRE, P. J. An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 337–350, 2005.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J.C.T.; CASCON, V. *In vivo* evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaífera duckei* Dwyer. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto (SP) Brazil, v.28, n.4, p.833–838, oct./dec. 2005.

MARGOLIN, B. H. AND RISKO, K. J. The statistical analysis of in vivo genotoxicity data. Case studies of the rat hepatocyte UDS and mouse bone marrow micronucleus assay. In: **Evaluation of Short-term Tests for Carcinogens Report of the International Programme on Chemical Safety's Collaborative Study on In Vivo assay** (editado por: ASHBY, J., DESERRES, F.J., SHELBY, M.D., MARGOLIN, B.H., ISHIDATE, JR. M., BECKING, C.). Oxford: Oxford University Press, p. 29-44, 1998.

MATEUCA, R. *et al.* Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v.88, p.515-1531, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos**. Brasília: Secretaria de Políticas de Saúde, Ministério da Saúde, 2001.

NAKAMURA, C. V.; PINTO, A. S. Biological effects of lithium chloride on the insect trypanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai*. **Parasitology**, v. 99, n.6, p. 193-197, 1989.

NCCLS, Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínicos. **Padrões de Desempenho para teste de susceptibilidade antimicrobiana**: padrão M2-A6 aprovado, 6 ed., PA: NCCLAS, Wayne, 2002.

NETTO, A. A. *et al.* Ação do extrato hidroalcoólico de *Dillenia indica* L. no crescimento e diferenciação de *Herpetomonas samuelpeessoai*. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5. Alfenas, 2006. Disponível em: <<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/vsemic&isimposiodepesquisa/anais/index.html>> Acesso em: 25 Mai. 2008.

NORRBY, S. R.; NORD, C. E. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. **Lancet Infect Dis.**, Solna, v. 5, p. 115-119, Feb. 2005.

NOVAIS, T.S. *et al.* Atividade antimicrobiana de alguns extratos de vegetais de semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 13, p. 5-7, 2003.

PANDEY, R. C. Prospecting for potentially new pharmaceuticals from natural sources. **Med. Res. Rev.**, v.18, p.333, 1998.

PEREIRA, M. A. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *Sambucus nigra* L. e *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5. Alfenas, 2006. Disponível em: <<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/vsemic&isimposiodepesquisa/anais/index.html>> Acesso em: 01 jul. 2008.

PERRY G. *et al.* Activation of neuronal extracellular receptor kinase (ERK) in Alzheimer disease links oxidative stress to abnormal phosphorylation. **Neuroreport**. v.10, p.2411-2415, Aug. 1999.

PESSINI, G. L. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 21-24, 2003.

PICHARA, N. L. *et al.* Avaliação do efeito do MNNG na proliferação do *Herpetomonas samuelpeessoai*. In: SEMIC - Seminário de Iniciação Científica da UNIFENAS, 2002, Alfenas. **Resumo...** . Alfenas: UNIFENAS, 2002. p. 81.

PINTO, P. C. M.; PEREIRA, M. A.; FIORINI, J. E. Ação antimicrobiana de *Cassia angustifolia* vahl. (sene) e seus efeitos no crescimento e diferenciação. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6. Alfenas, 2007. Disponível em: <http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/visemic&iisimposiodepesquisa/anais/index.html>>. Acesso em: 01 Jul. 2008.

RABELLO-GAY, M.N. *et al.* The effects of age, sex and diet on the clastogenic action of cyclophosphamide in mouse bone marrow. **Mutation Research**, v.158, p. 181-188, 1991.

RAMPAZO, L. G. L.; JORDÃO, B. Q.; VICENTINI, V. E.; M.S. Mantovani. Chlorophyllin antimutagenesis mechanisms under different treatment conditions in the micronucleous assay in V79 cells. **Cytologia**, Tokyo (Japan), v.67, n.3, p.323-327, jul. 2002.

RANQUE, P.; QUILICI, M.; CAMERLYNCK, P. Recherches systematiques sur les trypanosomides Les stades evolutifs chez les *trypanosomides*. **Bull Soc. Path. Exot.** Paris, v.67, p.377-387. 1974.

RECIO, M. C.; RIOS, J. L.; VILLAR, A. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. **Phytother. Res.** p.169, 1989.

REPORT OF THE AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION PANEL ON EUTHANASIA . **JAVMA**, v.218, n.5, p.669-696, 2000.

REPORT OF THE INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY'S COLLABORATIVE STUDY ON IN VIVO ASSAY (editado por: ASHBY, J., DESERRES, F.J., SHELBY, M.D., MARGOLIN, B.H, ISHIDATE, JR. M., BECKING, C.). Oxford: Oxford University Press, 1998. p. 29-44.

REY, L. **Parasitologia** : parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3.ed. Rio de Janeiro :Guanabara Koogan, 2001.

REZENDE, O.S.J.; LIMA, E. B.; MAISTRO, L.C. **Intoxicações por plantas tóxicas notificadas no CIT - Centro de Informação Toxicológica de Goiás no período de 2001 a 2005**. 2006. 72f. Monografia (Especialização) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2006.

RIBEIRO, J. C. *et al.* Investigação do potencial clastogênico da fração clorofórmica do extrato do caule de *Austroplenckia populnea* em células da medula óssea de ratos Wistar: teste do micronúcleo. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 4. Alfenas, 2005. Disponível em: <<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/ivsemic/Anais/index.html>>. Acesso em: 30 abr. 2008.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. Cap. 7.

ROBERTS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997.

ROITMAM, C.; ROITMAM, J.; AZEVEDO, H. P. Growth of an insect trypanosomatid at 37°C in defined medium. **Journal of Protozoology**, n.19, p. 346-349, 1972.

ROITMAM, I. *et al.* Demonstration that *Leptomonas pessoai* Galvão, Oliveira, Carvalho e Veiga, 1970, is a *Herpetomonas*. **Journal Protozool.**, New York, v.23, p. 291,1976.

SANTOS, A. L. S. *et al.* Secreted phosphatase activity induced by dimethyl sulfoxide in *Herpetomonas samuelpessoai*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 405, n. 2, p. 191-198, 2002.

SANTOS, M. D.; BLATT, C. T. T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers, de mata e de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 2, 1998.

SARAIVA, E. M. *et al.* Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: Validation by morphological features and specific markers. **Experimental Parasitology**, v. 110, n.1, p. 39-47, 2005.

SBMCTA, SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTAL. Teste do micronúcleo de medula óssea de camundongo. 2005. Disponível em: <http://www.sbmcta.org.br/index.php?arq=doc01>. Acesso em 12 jul. 2007.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento em farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 2 ed. Porto Alegre: UFRGS, 2000.

SCHER, R. *et al.* Avaliação do potencial genotóxico do Saião (*Kalanchoe brasiliensis*) em eritrócitos policromáticos de camundongos. **Genetics and Molecular Biology**, Supplement, Ribeirão Preto (SP), Sociedade Brasileira de Genética, v.23, p.696–697, 2000.

SCHERRER, A. M.; MOTTI, R.; WECKERLE, C. S. Traditional plant use in the areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p.129–143, 2005.

SCHIMD, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p.9-15, 1974.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: HOLLAENDER, A. (Ed.). **Chemical mutagens: principles and methods for their detection**. New York, Plenum Press, v.4, p.31–53, 1976.

SCHNAIDER, T.B.; SOUZA, C. Aspectos éticos da experimentação animal. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Belo Horizonte (MG), v.53, n.2, p.278–285, mar./abr. 2003.

SHARMA, P. K.; CHAUHAN, N. S.; LAL, B. Observations on the traditional phytotherapy among the inhabitants of Parvati valley in western Himalaya, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p.167–176, 2004.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1999.

SOARES, R. M. A. *et al.* Changes in cell surface anigenic groups during differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai* mediated by dimethylsulfoxide. **Cell Biophysics**, v. 13, p. 29-41, 1988.

SOUZA, D. S. *et al.* Estudo do potencial mutagênico do extrato de *Tamarindus indica* em células da medula óssea de ratos wistar. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5. Alfenas, 2006. Disponível em: <<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/vsemic&isimposiodespesquisa/anais/index.html>> Acesso em: 01 jul. 2008.

SOUZA, E. T. *et al.* Concanavalin-A induced cell differentiation in the protozoan *Herpetomonas samuelpessoai*. **Journal of Parasitology**, n.66, p. 985-988, 1980.

SOUZA, G. H. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de plantas utilizadas na medicina popular brasileira. In: JORNADA FARMACÊUTICA DA UNESP, 44, 1997, Araraquara. **Anais...** Araraquara, FCF/UNESP, 1997. p. 63.

SOUZA, M. A.; CAMARGO, A. C.; COSTA, K. C. F. Differentiation to opisthontomastigote in trypanosomatids allocated in the genus *Crithidia*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, 204 p., 1994. Suplemento I.

SOUZA, M. C. M.; ROITMAN, J. Protective effect of *Leptomonas pessoai* against the infection of mice by *Trypanosoma cruzi*. **Reviews of microbiology**, n.2, p. 187-189, 1971.

TAKAEDA, I. J. M; FARAGO, P.V. **Vegetação do Parque Estadual de Vila Velha:** guia de campo. Curitiba: Serzegrat, 2001. v.1.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Atheneu, 1984.

THOMAS, E. M. *et al.* A. Changes in cell shape and induction of cell differentiation in the protozoan *Hepetomonas samuelpessoai* by colinergic drugs. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 34, n.1, p. 81-87, 1981b.

THOMAS, E. M. *et al.* *Herpetomonas samuelpessoai*: Changes in Cell Shape and Induction of Differentiation by local Anesthetic. **Experimental Parasitology**, v. 51, p. 366-372, 1981a.

TORAS, E. F. ***Herpetomonas samuelpessoai*: efeito de anticorpos específicos no metabolismo (crescimento e diferenciação) e nas estruturas superficiais (composição de proteínas, receptoras de lectinas e complemento)**. Tese (Doutorado)- Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1991.

TURNER, D. M. Natural product source material use in the pharmaceutical industry: the Glaxo experience. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, p.39-44, 1996.

ULUBELEN, A. *et al.* Antibacterial Diterpenes from the Roots of *Salvia viridis*. **Planta Medica**, v.66, n.5, p.458-462, 2000.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 631-638, out./dez. 2007.

VIEGI, L. *et al.* A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 221–244, 2003.

VOLPATO, A. M. M. *et al.* Investigação da atividade antibacteriana de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista Visão Acadêmica**, v.2, n.1, p.7- 10, 2001.

WALLACE, F.G. The Trypanosomatid parasites of insects and arachids. **Exp. Parasitol.**, United Kingdon, v. 18, p. 124, 1966.

WALLACE, F.G. Development stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology revisited. **Protozoology**, v.111, p.51-56. 1977.

WALLACE, F.G. *et al.* Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. **Journal of Protozoology**, New York, v.30, p. 308-313, 1983.

WATTENBERG, L. Chalcones, myo-inositol and other novel inhibitors of pulmonary carcinogenesis. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.59, p. 162-168, 1995. Supplement 22.

WENYON, C.M. Observations on *Herpetomonas muscae* domesticate and some allied flagellates. **Arch. Protistenkd**, New York, v.31, p.1-36, 1913.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

ZAMBRANO, M.A.; TARGA, H..J.; RABELLO–GAY, M.N. Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleus and metaphase slide preparations. **Stain Technology**, v.57, n.1, p.48–49, jan. 1982.

ZANONI, F.D. *et al.* Clastogenicity of the Austroplenckia populnea (Celastraceae) bark wood extract in wistar rat bone marrow cells. **Cytologia**. Japan, v.70, n.3, p.303–308, 2005.

ZAULI, R. C. *et al.* Atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de *Dillenia indica* L. (flor de abril). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 3. Alfenas, 2004. Disponível em: <<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/iiisemic/anais/index.html>>. Acesso em: 30 abr. 2008.

ZHOU P., LIU, B.; LU, Y. DNA damaging effects of carbofuran and its main metabolites on mice by micronucleus test and single cell gel electrophoresis. **Science in China Ser C Life Sciences**, Japan, v. 48, n.1, p.40-47, may, 2005

ANEXO

PARECER DO COMITE DE ÉTICA E PESQUISA



PARECER N.º14A/2007

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP, da UNIFENAS, Setor de Experimentação Animal, tendo analisado, nesta data, o protocolo do projeto de pesquisa intitulado **AÇÃO ANTIMICROBIANA E MUTAGÊNICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PYROSTEGIA VENUSTA E SEUS EFEITOS NO CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM SISTEMAS EUCARIÓTICOS “ IN VITRO”**, de autoria do Prof. Dr. João Evangelista Fiorini, resolveu enquadrá-lo na categoria de aprovado para fins de início da pesquisa.

Alfenas, 24 de agosto de 2007


Prof.ª Helena Engel Velano
Coordenadora do CEP

O parecer de **aprovação final** será emitido após conclusão do projeto.

Data para apresentação do relatório final: 01/12/2007

Modelo do Relatório Final e Parcial: <http://www.unifenas.br/pesquisa/>

APENDICE

ARTIGO

Ação mutagênica “in vivo” e antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* e seus efeitos no crescimento e diferenciação celular em um sistema eucariótico “in vitro”.

FERNANDES, Adriana Ponciano¹, PEREIRA, Maria Aparecida², Lucimara, Maria da Silva³, BORIOLO, Marcelo Fabiano Gomes³, FIORINI, João Evangelista¹

Resumo

Este estudo teve por objetivos analisar os efeitos do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*, conhecida popularmente como cipó-de-são-joão, sobre diversos tipos de bactérias e leveduras, além de analisar seu efeito no crescimento e diferenciação celular em *Herpetomonas samuelpessoai* “in vitro” e ação mutagênica “in vivo”, através do teste do micronúcleo. A atividade antimicrobiana do extrato foi verificada por dois métodos: teste de difusão em ágar e teste de diluição em tubo. Tanto o crescimento como a diferenciação celular de *H. samuelpessoai* foram realizados em meio quimicamente definido, após incubação, sendo o crescimento estimado pela contagem das células em câmara de Neubauer e a diferenciação pela observação das células coradas pelo método panótico, em microscopia óptica, estimando-se os percentuais de formas pró, para e opistomastigota. Para a avaliação mutagênica foi realizado o teste do micronúcleo em eritrócitos da medula óssea de camundongos, divididos em cinco grupos de animais, cada grupo constituído por 3 machos e 3 fêmeas, sendo assim tratados: controle negativo (NaCl 0,9%); controle positivo (50 mg/kg ENU); tratamento 1, 2 e 3 (1000, 1500 e 2000mg/Kg do extrato, respectivamente), nos tempos de 24 e 48 horas após o tratamento, e os eritrócitos policromáticos foram observados em microscopia óptica e contados com o auxílio de um contador de células digital. Os resultados evidenciaram que o extrato hidroalcoólico da folha de *Pyrostegia venusta*, nas concentrações testadas (72,6 mg/mL e 145,2 mg/mL), não apresentaram atividade antimicrobiana para as dezenove cepas testadas, e não foi verificado efeito no crescimento e na diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpessoai*. Ao teste de micronúcleo, os resultados revelaram diferenças estatísticas significativas do número/índice percentual de PCEs micronucleados entre o grupo de animais do controle positivo (ENU 50mg/Kg) e controle negativo (NaCl 0,9%), bem como controle positivo e tratamentos com o extrato. 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 *P. venusta* não apresenta potencial clastogênico e/ou aneugênico.

PALAVRAS-CHAVES: Ação Antimicrobiana; Mutagênese; *Pyrostegia venusta*; Diferenciação Celular.

¹ Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos – UNIFENAS

² Acadêmico de Farmácia – UNIFENAS

³ Laboratório de Genética – UNIFENAS

“In vivo” mutagenic and antimicrobial action of the *Pyrostegia venusta* hydroalcoholic extract and its effects on the growth and cell differentiation in an “in vitro” eukaryotic system.

Abstract

This study analyzed the effects of the hydroalcoholic extract of *Pyrostegia venusta*, popularly known as “cipó-de-são-joão”, on various types of Gram negative and Gram positive bacteria, and on yeasts. It also evaluated the effects of the extract on the growth and cell differentiation in *Herpetomonas samuelpessoai*, and the “in vivo” mutagenic effect by the micronucleus test. The antimicrobial activity of the extract was evaluated by two methods: agar diffusion test, and tube dilution test. The growth and cell differentiation of *H. samuelpessoai* occurred in chemically defined medium after incubation at 28°C, for 48 hours. Growth was calculated by cell count in a Neubauer chamber, and differentiation was measured by observing cells stained by the panoptic method to calculate the percentages of the pro-, para- and opistomastigote forms. To determine the LD 50, groups of female albino Swiss mice received a single oral dose of different extract concentrations (300 mg/kg and 2000 mg/kg). For mutagenic evaluation, Swiss albino mice, aged approximately 12 weeks, were used. Each trial was carried out in five groups of animals, each group consisting of 3 males and 3 females: negative control (0.9% NaCl); positive control (50 mg/kg of NEU) treatments 1, 2 and 3 (1000, 1500 and 2000 mg/kg of extract, respectively). The micronucleus test in mouse bone marrow erythrocytes was done 24 and 28 hours after treatment. The polychromatic erythrocytes (PCEs) were observed through an optical microscope and counted with the help of a digital cell counter. The results showed that the hydroalcoholic extract of *Pyrostegia venusta* leaves at the concentrations of 72.6 mg/mL and 145.2 mg/mL had no antimicrobial activity on the 19 strains of bacteria and yeasts tested. With regard to LD50, the extract did not show median lethal dose at the concentrations of 300 mg/kg and 2000 mg/kg. The micronucleus test showed statistically significant differences in the number/percentage index of micronucleated PCEs between the positive control group (NEU 50mg/kg) and negative control (0.9% NaCl), and positive control and extract treatments. But these differences were not observed either between the negative controls and the extract-treated group, or between the sexes and times of treatment (24 hr-48hr), thus suggesting that the hydroalcoholic extract of *P. venusta* leaves does not exhibit either clastogenic or aneugenic potentials.

KEY WORDS: Antimicrobial action; Mutagenesis; *Pyrostegia venusta*; Cell differentiation.

1. INTRODUÇÃO

Em razão dos crescentes problemas associados à terapêutica de diversas infecções, como o uso indiscriminado de antimicrobianos, resistência microbiana, entre outros, os estudos de substâncias oriundas de vegetais adquiriram novas perspectivas, sendo que várias pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de plantas têm sido realizadas (YUNES e CALIXTO, 2001; EBI *et al.*, 1999).

A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico é uma tendência generalizada na medicina popular brasileira. Os conhecimentos acumulados ao longo do tempo mostram que tais produtos podem causar efeitos nocivos. A fitoterapia é um recurso terapêutico muito utilizado na automedicação e, devido à facilidade do acesso, pode agravar seus riscos potenciais (SIMÕES *et al.*, 1999).

A diferenciação celular é um processo que está relacionado com a patogenia e patologia de muitos microrganismos, e com o resultado de uma expressão gênica seletiva, levando à biossíntese de proteínas específicas. Assim, tais processos podem estar envolvidos com o aparecimento de neoplasias benignas ou malignas, entre outras patologias (HENRIQUE-FILHO *et al.*, 2004).

Estudos sobre a diferenciação celular em tripanosomatídeos têm revelado que vários fatores são capazes de influenciar, induzindo ou reprimindo, este processo (WALLACE *et al.*, 1983; FIORINI *et al.*, 1985; COELHO *et al.*, 2002; SARAIVA *et al.*, 2005).

Os tripanosomatídeos do gênero *Herpetomonas* têm sido amplamente empregados como modelos experimentais em estudos da biologia e fisiologia dos protozoários. As vantagens em se trabalhar com tais organismos incluem a facilidade de manuseio, ausência de riscos de contaminação, e a relativa simplicidade com que esses se desenvolvem em meios artificiais (PICHARA *et al.*, 2002).

Apesar da utilização de tripanosomatídeos como modelos para o estudo de ação de drogas sintéticas ser bastante investigada no meio científico, ainda é pouco explorada a utilização destes em testes com extratos vegetais e, conseqüentemente, quais efeitos exercem ao nível celular “in vitro” (LOPES *et al.*, 1989; FIORINI *et al.*, 1991; THOMAS *et al.*, 1981).

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 (BERNARDES *et al.*, 2007).

O teste de micronúcleo de roedores “in vivo” é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte da bateria de testes recomendadas para estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial e que possam apresentar atividade mutagênica. É o ensaio “in vivo” mais amplamente utilizado para detectar agentes clastogênicos e agentes aneugênicos (RIBEIRO, SALVADORI e MARQUES, 2003).

Pyrostegia venusta é uma planta da família Bignoniaceae vulgarmente conhecida como cipó-de-são-joão, encontrada com muita frequência dispersa em campos, margens de estradas e cercas de pastagens (TAKAEDA e FARAGO, 2001). As suas flores são utilizadas na medicina popular para tratamento de manchas brancas no corpo (leucoderma, vitiligo) e como tônico antidiarreico (LORENZI, 1991).

Estudos foram realizados, analisando quantitativamente os flavonóides, fenóis solúveis e taninos de folhas de *Pyrostegia venusta*, coletadas na mata e no cerrado, com o objetivo de verificar a influência desses biócoros na sua produção. Tanto os resultados de flavonóides como os de fenóis, não mostraram diferenças significativas entre as plantas de mata e cerrado, sugerindo que a espécie não apresenta plasticidade fenotípica baseada nesses caracteres, considerando-se as diferenças de solo dos locais de coleta. Não foram detectados taninos nas folhas desta espécie (SANTOS e BLATT, 1998).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de ética em Pesquisa da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Campus de Alfenas/MG, sob parecer n° 14A/2007.

As folhas de *Pyrostegia venusta* foram coletadas em Alfenas – MG, à beira da Rodovia BR 179, Km zero, no mês de junho de 2006. A exsicata foi identificada pela equipe do Laboratório de Botânica da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL, sendo posteriormente armazenada no Herbário da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas-MG, sob o n° 270.

O extrato das folhas frescas de *Pyrostegia venusta* foi obtido através de extração com álcool etílico a 70° GL conforme técnica descrita por Caceres *et al.*(1990,1995). Foram pesados 600g das folhas da planta e colocadas em 3000 mL de álcool etílico a 70° GL. Esta mistura foi macerada em balão volumétrico (5000mL) e armazenada à temperatura ambiente por 15 dias, ao abrigo da luz. Após 15 dias, os extratos foram filtrados em papel de filtro tipo xarope e mantidos sob refrigeração. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório e filtrados em filtro Millipore® (0,22µm). Posteriormente, o extrato obtido foi colocado em frasco âmbar estéril e mantido sob refrigeração a 4°C.

No estudo de diferenciação celular, foi utilizado *Herpetomonas samuelpessoai* (ATCC 30252). Para os experimentos de ação antimicrobiana, foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas e leveduras: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 7953), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Streptococcus salivarius* (IAL 1863), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 20509) e *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601).

Os testes de atividade antimicrobiana do extrato vegetal de *Pyrostegia venusta* foram realizados por dois métodos, de acordo com padrões do *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002): teste de difusão em ágar e teste de diluição em tubo. Foram utilizadas as concentrações de 72,6 mg/mL e 145,2 mg/mL de extrato. As leituras dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano foram medidas em milímetros, com auxílio de um paquímetro.

O crescimento da *Herpetomonas samuelpessoai* incubada juntamente com concentrações crescentes do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* foi estimado pela contagem em câmara de Neubauer. A diferenciação celular foi realizada em meio de cultivo quimicamente definido (ROITMAN *et al.*, 1972). Cerca de 10⁶ células foram incubadas juntamente com doses crescentes do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*, a 28°C por 48 horas. Os percentuais de formas paramastigota, promastigota e opistomastigota foram determinados através de

microscopia óptica, após coloração pelo método panótico. Pelo menos 200 células foram examinadas em cada preparação.

A determinação da DL 50 foi realizada conforme as normas preconizadas pela OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*). Foram utilizados camundongos *Swiss* albinos, fêmeas, com peso corporal entre 30 a 40 gramas. Estes foram mantidos em caixas de polietileno em ambiente climatizado a $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar igual a $50\% \pm 20\%$, e em ciclos de luminosidade de 12 horas (12 horas claro/12 horas escuro), tratados com ração comercial Labina Purina[®] (*Nestlé Purina Petcare Company*) e água *ad libitum*. Os animais foram selecionados aleatoriamente e agrupados em caixas, marcados de modo a permitirem sua identificação individual, e mantidos nestas caixas por cinco dias a fim de se aclimatarem às condições do laboratório. Os animais jejuaram por 4 horas (o alimento foi negado, mas não a água) antes do início do tratamento. Em seguida ao período de jejum, os animais foram pesados e o extrato administrado em dose única por gavagem, usando-se um tubo gástrico. Após, o alimento ainda foi negado por mais 1-2 horas. Três animais foram usados em cada passo. A dose inicial testada foi de 300 mg/Kg de peso corporal e, posteriormente, de 2000 mg/Kg. Estes foram observados individualmente após a administração da dose, pelo menos uma vez durante os primeiros 30 minutos, periodicamente durante as primeiras 24 horas, com especial atenção durante as primeiras 4 horas, e, após, diariamente, num total de 14 dias. No término do teste, os animais sobreviventes foram pesados e sacrificados humanitariamente.

Para o teste do micronúcleo (MN), a técnica utilizada para a obtenção das células de medula óssea, para o estudo da frequência de micronúcleos, foi a descrita por Schimid (1976) e modificada por Zambrano *et al.* (1982). O tratamento foi administrado por gavagem uma única vez, empregando-se cinco grupos de animais (3 machos e 3 fêmeas por grupo), em duplicata, para posteriores análises nos tempos de 24h e 48h (tratamentos de 1000, 1500 e 2000mg/Kg). Controles negativo (NaCl 0,9%) e positivo (50mg/Kg de N-Nitroso-N-etilurea) foram incluídos. Após os tempos de tratamento, os animais foram sacrificados por inalação de CO₂ em câmaras de acrílico adaptadas. Os fêmures foram retirados e, rapidamente, células da medula óssea foram coletadas (1mL de NaCl 0,9%), homogeneizadas e centrifugadas (1000rpm/5min). Sedimentos celulares foram ressuspensos (500µL de formol 4% em NaCl 0,9%). As lâminas foram preparadas por esfregaço, mantidas a temperatura ambiente e submetidas à coloração (Leishman eosina-azul). Eritrócitos policromáticos (PCEs) foram analisados quanto à presença de micronúcleos (aumento de 1000×).

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Com referência à atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da folha de *Pyrostegia venusta*, pela técnica de difusão em ágar, não foi constatada ação deste para as dezenove cepas testadas de bactérias e fungos, não formando halo de inibição nas concentrações testadas (72,6 mg/mL e 145,2 mg/mL).

Os inóculos utilizados para a confecção das CIM e CMM do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* foram em média 10^6 UFC/mL, a partir de uma suspensão microbiana correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland.

Na concentração dos extratos testados, não foram constatadas, pelo método de diluição em caldo, a capacidade em inibir o crescimento microbiano (CIM) e propriedade microbicida mínima (CMM).

A atividade antimicrobiana de extratos e óleos vegetais deve-se, em sua maioria, a produtos do metabolismo secundário, como terpenóides e compostos fenólicos, como flavonóides e saponinas, que também, na forma pura, exibem atividade. A diferença entre achados de atividade antimicrobiana descritos em plantas pode estar relacionada com a quantidade de princípios ativos presentes nos extratos, visto que esta quantidade está relacionada com a ação destes (ADAM *et al.*, 1998; DUARTE, 2004).

Apesar de constatado por Ferreira Trevisan, Alvares e Houghton (2000), em estudos fitoquímicos da planta *Pyrostegia venusta*, compostos associados à atividade antimicrobiana, como os flavonóides, o extrato deste vegetal, no presente estudo, não apresentou resultados que afirmassem a ação contra agentes microbianos. Este fato pode estar relacionado à quantidade existente destes princípios na planta em questão.

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

Estudos similares foram realizados com extratos etanólicos de diversas plantas medicinais (alecrim-pimenta, cravo, alecrim, pimenta-da-jamaica, sálvia, calêndula, entre outras). Os resultados obtidos, apesar de modestos, comprovaram o potencial antimicrobiano da sálvia, alecrim e calêndula frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e exibiram o potencial antimicrobiano do cravo e alecrim-pimenta frente às bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella thyphimurium*, demonstrando, desta forma, que extratos etanólicos de plantas apresentam perspectivas para a obtenção de antibióticos naturais (SOUZA, 1997; BARA; VANETTI, 1998; ULUBELEN *et al.*, 2000; VOLPATO *et al.*, 2001).

O estudo realizado por Gonçalves, Alves Filho e Menezes (2005) avaliou as atividades antimicrobianas de extratos hidroalcoólicos obtidos de 17 espécies de árvores nativas do Brasil. Para os ensaios de antibiose, foi utilizado o método da difusão em ágar, com 10 diferentes microrganismos, isolados de inóculos obtidos de focos de infecções clínicas. Dos 170 testes realizados, 25% mostraram alta atividade antimicrobiana, destacando-se extratos de *Bixa orellana*, *Psidium guajava* e *Anacardium occidentale*. Excepcional atividade antimicrobiana foi observada em *Mimosa tenuiflora* contra *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus spp. coagulase-negativa*, e os extratos de *Stryphnodendron adstringens* e *Eugenia uniflora* contra *Escherichia coli*, *Providencia spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus spp. coagulase-negativa*. Dentre estas, os extratos das plantas *A. colubrina* (Mimosoideae), *G. americana* (Rubiaceae), *C. sylvestris*

(*Flacourtiaceae*) e *T. avellaneda* (*Bignoniaceae*) não apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas testadas.

Cunico *et al.* (2004) também avaliaram o efeito antimicrobiano do extrato bruto etanólico dos órgãos totais de *O. martiana* frente às bactérias *Enterococcus faecium*, *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando os métodos de difusão em ágar e bioautografia. Os resultados obtidos por difusão em ágar mostraram que o extrato de *O. martiana* apresenta potencial antibacteriano contra *E. faecium* e não demonstraram ação antimicrobiana contra as outras cepas testadas.

Zauli *et al.* (2004) avaliaram o potencial antimicrobiano do extrato etanólico de *Dillenia indica* L, popularmente conhecida como flor-de-abril, nas cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus salivarius*, utilizando a técnica de difusão em ágar e microdiluição seriada em tubo. Constataram atividade antimicrobiana para *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. mutans* e *S. salivarius*, não apresentando halo de inibição, na quantidade testada, nas cepas de *E. coli* e *S. typhimurium*, concluindo que o extrato de *Dillenia indica* L. apresentou atividade antimicrobiana “in vitro” bastante significativa frente a alguns microrganismos testados.

Lopes *et al.* (2006) avaliaram, como nesta pesquisa, a atividade antimicrobiana do extrato seco de insulina (*Cissus sicyoides*) e do óleo de copaíba (*Copaífera langsdorfii*) em cepas bacterianas e fúngicas, como *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, verificando que o óleo de copaíba inibiu o crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* e *E. faecalis*, sendo os demais microrganismos resistentes. A CIM para as bactérias sensíveis variou de 6,05 a 30,25mg/mL, com CMM de 18,15mg/mL para *E. faecalis*. O extrato de insulina não foi efetivo na avaliação antimicrobiana.

Também em 2006, Pereira *et al.* avaliaram a atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em ágar, dos extratos hidroalcoólicos de *Sambucus nigra* L. e *Rudgea viburnoides* (*Cham.*) Benth., conhecidos popularmente como congonha e sabugueiro, respectivamente, utilizando quatorze microrganismos padronizados pela ATCC. Constataram que o extrato de congonha foi efetivo, nas concentrações de 10 e 12mg/mL, para 92,86% dos microrganismos testados, não inibindo apenas o crescimento de *E. coli*. O extrato de sabugueiro, nas concentrações de 10 e 15 mg/mL, inibiu 64,29% das cepas testadas.

Na tentativa de aumentar o conhecimento sobre plantas medicinais, Pinto, Pereira e Fiorini (2007) realizaram estudo sobre atividade antimicrobiana do extrato da planta *Cassia angustifolia* vahl. Estes foram avaliados em quatro bactérias Gram positivas e quatro Gram-negativas e dois fungos. Os resultados foram satisfatórios para as bactérias Gram-positivas.

Em estudos de atividade antimicrobiana de extratos brutos de espécies vegetais, o potencial antimicrobiano muitas vezes não se deve a uma única substância, mas sim, a um conjunto dessas substâncias. Um extrato bruto de uma espécie vegetal que possui efeito bactericida satisfatório poderia não necessitar, portanto, de processos de isolamento de substâncias ativas, reduzindo etapas químicas e conseqüentemente custos financeiros. Isto viabilizaria uma possível utilização como fitoterápico. Por outro lado, geralmente os compostos presentes em

menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos (CUNHA, 2006).

Por este motivo, há necessidade de um trabalho com análise de extratos mais ampla, onde se obtêm extratos purificados, frações e, finalmente, os compostos puros. Neste sentido, toma-se indispensável a análise da potência das frações e das substâncias puras em relação à sua concentração (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998) bem como suas atividades bactericida e bacteriostática.

TABELA 1 - Crescimento e diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpessoai* em meio quimicamente definido (ROITMAN *et al.*, 1972), a 28° C, por 48h, na presença e ausência do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*.

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

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos - UNIFENAS, 2007.

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

Conforme demonstrado na TAB. 1, o experimento de crescimento celular de *Herpetomonas samuelpessoai*, em presença de extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*, demonstrou que o número de tripanosomatídeos não foi reduzido conforme se aumentou a concentração do extrato, o que demonstra que este não inibe o crescimento de *Herpetomonas samuelpessoai*, nestas concentrações. Também com relação à diferenciação celular, não foram observadas formas diferenciadas (para-opistomastigota) estatisticamente significantes, nas concentrações que variaram de 36,3 mg/mL a 726 mg/mL, quando comparados aos sistemas controles.

Alguns estudos semelhantes foram realizados com outras plantas e substâncias de uso medicinal, objetivando verificar a ação sobre *Herpetomonas samuelpessoai*, o que possibilitaria sua aplicação mais segura em seres humanos.

Em um estudo realizado por Holetz (2003), foram avaliados os efeitos dos extratos brutos de plantas no crescimento e diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpessoai*. Um efeito antiprotozoário positivo foi encontrado nos extratos de *L. alba*, *T. vulgare* e *P. regnellii*, na concentração de 1.000 µg/mL, com 90,7%, 97,4 % e 99,5 % de inibição de crescimento, respectivamente. Os extratos de *A. millefolium*, *E. uniflora*, *M. glomerata*, *P. major*, *P. guajava* e *P. granatum* mostraram fraca atividade inibitória. Por outro lado, *A. lappa*, *E. speciosa*, *S. canadensis* e *S. acmella* demonstraram um estímulo no crescimento de *H. samuelpessoai*.

Outro estudo realizado de Holetz *et al.* (2005), utilizando o extrato de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), revelou que este apresenta atividade inibitória sobre o crescimento de *Herpetomonas samuelpessoai*.

Chaves (2002) observou que a bupivacaína, um anestésico local quatro vezes mais potente e tóxico que a lidocaína, inibiu o crescimento celular de *H. samuelpessoai*, em doses superiores a 0,05%, tendo sua ação potencializada quando associada à epinefrina, sendo também observado um aumento de células diferenciadas paramastigota, induzidas pelo anestésico.

Em pesquisa realizada por Lopes *et al.* (2006), avaliando a ação do extrato seco de insulina (*Cissus sicyoides*) e do óleo de copaíba (*Copaífera langsdorfii*) na diferenciação, no crescimento e na morfologia do tripanosomatídeo *Herpetomonas samuelpessoai*, foi constatada a inibição do crescimento pela copaíba na concentração de 0,2178mg/mL. Quanto ao extrato de *Cissus sicyoides* não foi verificada inibição do crescimento de *Herpetomonas samuelpessoai* e nem diferença significativa nas contagens de pro, para e opistomastigota em relação à diferenciação e morfologia celular.

Também em 2006, Netto *et al.* avaliaram a ação do extrato hidroalcoólico de *Dillenia indica* L. (flor de abril) no tripanosomatídeo *H. samuelpessoai*. De acordo com os resultados obtidos sobre o crescimento, pode-se observar que, à medida que aumentou o tempo de cultivo (24, 48, 72, 96 e 120h), utilizando-se o extrato, verificou-se uma queda acentuada do número de células, e, no que se refere à diferenciação, foi observado que, conforme aumentou a concentração do extrato, houve aumento da forma promastigota e diminuição da forma paramastigota, quando comparadas ao controle. Portanto, o extrato de *Dillenia indica* L. inibiu a diferenciação celular. Concentrações superiores a 3,44 mg/mL inibiram totalmente o crescimento de *Herpetomonas samuelpessoai*.

Analisando o efeito do extrato de *Cassia angustifolia vahl.* na diferenciação e crescimento celular em *Herpetomonas*, Pinto, Pereira e Fiorini (2007) constataram que, nas concentrações de 5,9mg/mL a 59mg/mL, o efeito do extrato não provocou aumento significativo no número de células, mas também não foi observada inibição total do crescimento, e este se mostrou capaz de induzir o processo de diferenciação nas concentrações de 24mg/mL, 30mg/mL, 35mg/mL, 41mg/mL e 53mg/mL, porém em menor proporção.

No que tange à determinação da DL50, após tratamento dos camundongos *Swiss* albinos, com concentrações de 300mg/kg e 2000mg/kg do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*, e observação detalhada por um período de 14 dias, não foi constatado nenhum óbito, indicando que este extrato não apresenta toxicidade relativa para estes animais.

O método do micronúcleo baseia-se na análise da frequência de danos ocorridos ao DNA, os quais são resultantes de mitoses ou meioses celulares que, em contato com agentes clastogênicos e aneugênicos, podem gerar a perda de fragmentos ou de cromossomos inteiros, formando assim os micronúcleos (BERNARDES, LIMA e MAISTRO, 2007).

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

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

Fonte: Laboratório de Genética - UNIFENAS, 2008.

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

Os dados da TAB. 2 demonstram os resultados do teste do micronúcleo obtidos em camundongos *Swiss* fêmeas e machos, tratados com as três doses do extrato de *Pyrostegia venusta* (1000, 1500 e 2000 mg/Kg) e os controles positivos e negativos, 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. Estas tabelas também mostram a média da razão entre o número de eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE), em 2.000 células analisadas por animal.

No que diz respeito ao teste do micronúcleo, a análise da relação entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos fornece uma idéia se o extrato está diminuindo a produção de novos eritrócitos (policromáticos). Se isto ocorrer, a droga poderá ser considerada citotóxica (GOLLAPUDI e MCFADDEN, 1995).

Os resultados revelaram diferenças estatísticas significativas do número/índice percentual de PCEs micronucleados entre o grupo de animais do controle positivo (ENU 50mg/Kg) e controle negativo (NaCl 0,9%), bem como controle positivo e tratamentos (1000-2000mg/Kg) com o extrato. 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 *P. venusta* não apresenta potencial clastogênico e/ou aneugênico.

O estudo realizado por Almeida Neto *et al.* (2005) veio corroborar esta pesquisa, pois, ao avaliarem o efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) através do teste de micronúcleos em ratos, linhagem *Wistar* "in vivo", observaram que apenas a ciclofosfamida, substância mutagênica, teve seu efeito mutagênico com uma frequência de média = 7,6 MNs/1000 PCEs. Com a palma forrageira, essa frequência variou entre 1,5 e 3 MNs/1000 PCEs, que é considerado frequência normal. Portanto, a palma forrageira não apresentou efeito mutagênico como a *Pyrostegia venusta*. Também no estudo foi avaliado o efeito antimutagênico, da planta *Opuntia ficus-indica* associando-a à ciclofosfamida, e neste tratamento

houve inibição da ação mutagênica da substância em ratos, ou seja, a planta apresentou efeito antimutagênico.

Estudo semelhante, utilizando o teste do micronúcleo, foi realizado por Ribeiro *et al.* (2005), que verificaram o potencial mutagênico da fração clorofórmica do extrato do caule de *Austroplenckia populnea*, conhecida popularmente como mangabarana ou marmelinho do campo (planta com atividade antiespermatogênia) em células da medula óssea de ratos *Wistar*. Os resultados revelaram que a média de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN), observada nos três tratamentos nos quais os animais receberam a fração clorofórmica do extrato (300, 600 e 900 mg/Kg), não foram significativamente diferentes em relação à média de PCEMN observada no controle negativo, indicando que o extrato obtido não possui efeito mutagênico em células da medula óssea de ratos.

Fagundes *et al.* (2005) investigaram a toxicidade genética da *Annona coriacea* (araticum-do-cerrado, marolo) utilizando o teste de micronúcleo de eritrócitos da medula óssea. Os resultados demonstraram que o extrato alcoólico das sementes desta planta, nas diferentes doses utilizadas (50, 100, 200 ou 400mg/kg) induziu um aumento significativo na frequência de micronúcleos nos eritrócitos da medula óssea de camundongos, quando comparado ao controle negativo. Além disso, este aumento foi similar ao encontrado nos animais expostos ao controle positivo (ciclofosfamida, 250mg/kg). Estes resultados sugerem que o extrato das sementes desta planta possui um potencial significativo para induzir danos ao DNA, caracterizando-o como um agente potencialmente genotóxico.

Gaiani *et al.* (2005), avaliando o potencial mutagênico do extrato bruto das folhas e caules de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) em células da medula óssea de ratos *Wistar*, nas concentrações de 6,34mg/kg (dose terapêutica), 100 e 200mg/kg, verificaram que este extrato não apresenta efeito clastogênico e nem citotóxico sobre estas células.

Já em outro estudo realizado por Bernardes, Lima e Maistro (2007), utilizando óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) em concentrações de 1000mg/kg, 1500mg/kg e 2000mg/kg, verificou-se que, embora não se tenha evidenciado efeito citotóxico do óleo pela razão PCE/NCE em nenhuma das concentrações testadas, demonstrou-se um aumento significativo de eritrócitos policromáticos micronucleados nos grupos tratados com as duas maiores concentrações do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, indicando que o mesmo, em altas concentrações, apresentou efeitos mutagênicos em células de medula óssea de camundongos.

Souza *et al.* (2006), analisando o potencial mutagênico do extrato de *Tamarindus indica* (tamarindo) em células da medula óssea de ratos *Wistar*, observaram que, em comparação com o controle negativo, houve um pequeno aumento na média de PCEMN nas duas menores concentrações testadas do extrato (1000 e 1500mg/kg) e um aumento estatisticamente significativo de PCEMN na concentração de 2.000mg/kg, indicando que, em altas concentrações, o extrato bruto de *Tamarindus indica* apresenta efeito mutagênico em células da medula óssea de ratos *Wistar*.

Valadares, Castro e Cunha (2007) investigaram o potencial mutagênico "in vivo" do extrato etanólico de *Synadenium umbellatum* (EESU), conhecida popularmente como "cola-nota", "avelós", "milagrosa", "cancerola", sobre células da medula óssea de camundongos, através do teste de micronúcleo, utilizando três concentrações do extrato (10, 25 ou 50 mg/kg/dia) e os resultados obtidos

demonstraram que o EESU possui efeito mutagênico, de forma dose-dependente, sobre as células da medula óssea de camundongos.

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

A continuidade de estudos se faz necessária para que possam ser investigados precisamente os efeitos antimicrobianos e mutagênicos, realizando outros testes, como por exemplo, ensaio cometa, pois a *Pyrostegia venusta* é, conforme constatado neste estudo, uma planta pouco estudada, devido à falta de experimentos encontrados na vasta literatura consultada que possam ser comparados a esta pesquisa.

4. CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico da planta *Pyrostegia venusta*, nas concentrações testadas, não possui atividade antimicrobiana sobre as dezesseis cepas bacterianas e três cepas fúngicas usadas, não sendo constatada concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) do extrato em bactérias e fungos.

Não houve alteração de crescimento celular de *Herpetomonas samuelpessoai* em presença de extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta*, e quanto à diferenciação celular, não foram observadas formas diferenciadas, estatisticamente significantes, quando comparados aos sistemas controles.

O extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* não apresentou DL50 nas concentrações testadas (300 a 2000mg/Kg), o que sugere a ausência de toxicidade desta planta.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, K. *et al.* Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against Human Pathogenic Fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington, v.46, n.5, p. 1739-1745, 1998.

ALMEIDA NETO, J. X. *et al.* Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*) “in vivo”. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v. 5, n. 2, 2005.

BARA, M. T. F.; VANETTI, M. C. D. Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.7/8, n.1/2 , p.21-34, 1998.

BERNARDES, B. M.; LIMA, E. B.; MAISTRO, E. L. Estudo do potencial mutagênico do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) em células da medula óssea de camundongos Swiss albinos: teste do micronúcleo. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6. Alfenas, 2007. Disponível em: <<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/visemic&iisimposiodepesquisa/anais/index.html>>. Acesso em: 01 Jul. 2008.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n.1, p. 99-105. Jan/Fev. 1998.

CHAVES, E. C. L. **Ação da bupivacaína e epinefrina sobre *Herpetomonas samuelpeñoi***. 2002. 85p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – EFOA/Ceufe, Alfenas, 2002.

COELHO, D. A. *et al.* Cultivo axênico de um tripanosomatídeo isolado de tomate (*Lycopersicon lycopersicum*). In: I SEMIC - SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIFENAS, 2002, Alfenas: UNIFENAS, 2002. p. 105.

CUNHA, L. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos brutos de plantas do cerrado, substâncias isoladas e derivados semi-sintéticos frente a microrganismos bucais**. 2006. 170 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de Franca, Franca, 2006.

CUNICO, M. M. *et al.* Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (*Piperaceae*). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, n. 2, jul./dez. 2004.

DUARTE, M.C.T. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolícos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, supl.01, p.06-8, 2004.

EBI, G.C.; IFEANACHO, C. J.; KAMALU T. N. Antimicrobial properties of *Uvaria chamae* stem bark. **Fitoterapia**, v. 70, n. 6, p. 621-624, 1999.

FAGUNDES, F. A.; *et al.* *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiás, v. 2, n.1, p. 24-29, Jul. 2005.

FERREIRA TREVISAN, D. ; ALVARES, P. S. M. ; HOUGHTON, P. J. Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre sua importância medicinal. **Química Nova**, Brasil, v. 23, n. 1, p. 42-46, 2000.

FIORINI, J. E. *et al.* Effect of lipopolysaccharide (LPS) on the metabolism and cell surface of the trypanosomatid *Herpetomonas megaseliae*. **Biochemistry Physiology**, v. 80b, n.3, p. 537-542, 1985.

FIORINI, J. E. *et al.* Cell surface anionogenic groups of the protozoan *Herpetomonas megaseliae*: Effect of lipopolysaccharide. **Parasitology Research**, v. 77, n. 1, p. 102-108, 1991.

GAIANI, T. F. *et al.* Avaliação do potencial mutagênico do extrato bruto de *Rosmarinus officinalis* em células da medula óssea de ratos Wistar. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 4. Alfenas, 2005. Disponível em: <<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/ivsemic/Anais/index.html>>. Acesso em: 30 abr. 2008.

GOLLAPUDI, B. B.; MCFADDEN, L. G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, v.347, n.2, p.97-99, jul. 1995.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, jul./set. 2005.

HENRIQUE-FILHO, C. *et al.* Valor prognóstico do grau de diferenciação celular, da presença de muco e do padrão de crescimento da margem invasiva em adenocarcinomas colorretais Dukes B. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.41, n.3, p.185-89, São Paulo, jul/set 2004.

HOLETZ, F. B. **Efeito de extratos de plantas medicinais no crescimento, diferenciação e ultraestrutura de *Herpetomonas samuelpessoai***. 2003. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003

HOLETZ, F. B. *et al.* Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.4, p. 397-401, Jun. 2005.

KHAN, M. R.; TIMI, D. **Fitoterapia**. p.194, 1999.

LOPES, A. H. *et al.* Changes in cell surface anionic groups induced by propranolol in *Herpetomonas muscarum muscarum*. **Journal Eukariotic Microbiology**, Cincinnati, v.44, p. 321-325, 1989.

LOPES, K. C. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana e ação de *Cissus sicyoides* e *Copaifera langsdorffii* na diferenciação celular de sistemas eucarióticos unicelulares. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5. Alfenas, 2006. Disponível em: <<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/vsemic&isimposiodespesquisa/anais/index.html>> Acesso em: 25 Mai. 2008.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1991.

NCCLS, Comitê Nacional para Padrões de Laboratório Clínicos. **Padrões de Desempenho para teste de susceptibilidade antimicrobiana**: padrão M2-A6 aprovado, 6 ed., PA: NCCLAS, Wayne, 2002.

NETTO, A. A. *et al.* Ação do extrato hidroalcoólico de *Dillenia indica* L. no crescimento e diferenciação de *Herpetomonas samuelpessoai*. In: SEMINÁRIO DE

INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5. Alfenas, 2006. Disponível em:
<<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/vsemic&isimposiodepesquisa/anais/index.html>> Acesso em: 25 Mai. 2008.

PEREIRA, M. A. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *Sambucus nigra L.* e *Rudgea viburnoides (Cham.) Benth.* In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5. Alfenas, 2006. Disponível em:
<<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/vsemic&isimposiodepesquisa/anais/index.html>> Acesso em: 01 jul. 2008.

PICHARA, N. L. *et al.* Avaliação do efeito do MNNG na proliferação do *Herpetomonas samuelpessoai*. In: SEMIC - Seminário de Iniciação Científica da UNIFENAS, 2002, Alfenas. **Resumos**. Alfenas: UNIFENAS, 2002. p. 81.

PINTO, P. C. M.; PEREIRA, M. A.; FIORINI, J. E. Ação antimicrobiana de *Cassia angustifolia vahl.* (sene) e seus efeitos no crescimento e diferenciação. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6. Alfenas, 2007. Disponível em:
<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/visemic&iisimposiodepesquisa/anais/index.html>>. Acesso em: 01 Jul. 2008.

RIBEIRO, J. C. *et al.* Investigação do potencial clastogênico da fração clorofórmica do extrato do caule de *Austroplenckia populnea* em células da medula óssea de ratos Wistar: teste do micronúcleo. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 4. Alfenas, 2005. Disponível em:
<<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/ivsemic/Anais/index.html>>. Acesso em: 30 abr. 2008.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. Cap. 7.

ROITMAM, C.; ROITMAM, J.; AZEVEDO, H. P. Growth of an insect trypanosomatid at 37°C in defined medium. **Journal of Protozoology**, n.19, p. 346-349, 1972.

SANTOS, A. L. S. *et al.* Secreted phosphatase activity induced by dimethyl sulfoxide in *Herpetomonas samuelpessoai*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 405, n. 2, p. 191-198, 2002.

SANTOS, M. D.; BLATT, C. T. T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers, de mata e de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 2, 1998.

SARAIVA, E. M. *et al.* Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: Validation by morphological features and specific markers. **Experimental Parasitology**, v. 110, n.1, p. 39-47, 2005.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento em farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 2 ed. Porto Alegre: UFRGS, 2000.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: HOLLAENDER, A. (Ed.). **Chemical mutagens: principles and methods for their detection**. 1. ed. New York: Plenum Press, v.4, p.31–53, 1976.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1999.

SOUZA, D. S. *et al.* Estudo do potencial mutagênico do extrato de *Tamarindus indica* em células da medula óssea de ratos wistar. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5. Alfenas, 2006. Disponível em: <<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/vsemic&isimposiodespesquisa/anais/index.html>> Acesso em: 01 jul. 2008.

SOUZA, G. H. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de plantas utilizadas na medicina popular brasileira. In: JORNADA FARMACÊUTICA DA UNESP, 44, 1997, Araraquara. **Anais**. Araraquara, FCF/UNESP, 1997. p. 63.

TAKAEDA, I. J. M; FARAGO, P.V. **Vegetação do Parque Estadual de Vila Velha: guia de campo**. v.1. Curitiba: Serzgraf, 2001.

THOMAS, E. M. *et al.* *Herpetomonas samuelpessoai*: Changes in Cell Shape and Induction of Differentiation by local Anesthetic. **Experimental Parasitology**, v. 51, p. 366-372, 1981a.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 631-638, out./dez. 2007.

VOLPATO, A. M. M. *et al.* Investigação da atividade antibacteriana de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista Visão Acadêmica**, v.2, n.1, p.7- 10, 2001.

WALLACE, F.G. *et al.* Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. **Journal of Protozoology**, New York, v.30, p. 308-313, 1983.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

ZAMBRANO, M.A.; TARGA, H..J.; RABELLO–GAY, M.N. Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleus and metaphase slide preparations. **Stain Technology**, v.57, n.1, p.48–49, jan. 1982.

ZAULI, R. C. *et al.* Atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de *Dillenia indica* L. (flor de abril). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 3. Alfenas, 2004. Disponível em: <<http://www.unifenas.br/pesquisa/semic/iiisemic/anais/index.html>>. Acesso em: 30 abr. 2008.