



Efeito Modulador do Extrato de *Stryphnodendron adstringens* Mart. (Barbatimão) Contra Danos Induzidos pela Mitomicina C em Camundongos

L. SILVA-DE-ANDRADE,¹ D. BARROS-DE-CASTRO¹ & L. CHEN-CHEN^{2*}

¹Laboratório de Genética/INPA Petrópolis, CEP 69083-000, Manaus, AM

²Laboratório de Radiobiologia de Microrganismos e Mutagênese/Depto. de Biologia Geral/ICB/UFG, Campus-II, CEP 74001-970, Goiânia, GO

RESUMO

Stryphnodendron adstringens (Martius) Coville (Leguminosae), popularmente conhecida como barbatimão, é uma planta medicinal que cresce abundantemente nas Savanas centrais do Brasil. A decocção ou infusão da casca rugosa do tronco tem sido tradicionalmente utilizada pela população brasileira no tratamento de diarreias, leucorréias e como antiinflamatório. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antígeno-tóxico do extrato etanólico de barbatimão (EEB) contra danos induzidos pela mitomicina C (MMC) pelo teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos. Doses do EEB (50 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg) e MMC (4 mg/kg) foram co-administradas via intraperitoneal (i.p.) em grupos de 5 (cinco) animais por tratamento. Para controle positivo, foi administrada uma dose de 4 mg/kg de MMC i.p. e para controle negativo, H₂O destilada estéril. As preparações citológicas foram realizadas de acordo com a metodologia de Heddle (1973). Para todas as doses, a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) foi avaliada 24 h após administração. Os resultados obtidos mostraram que o EEB na dose de 50 mg/kg não provocou diminuição significativa na frequência de EPCMN (média = 28,6; DP = 1,67) quando comparada ao controle positivo (média = 30,6; DP = 2,70) ($p > 0,05$). No entanto, nas doses de 100 mg/kg (média = 19,8; DP = 2,28) e 200 mg/kg (média = 16,8; DP = 2,58) de EEB foi observada inibição significativa da frequência de EPCMN induzidos pela MMC ($p < 0,05$). Desse modo, os resultados indicaram que o EEB exibiu atividade antígeno-tóxica em medula óssea de camundongos.

Palavras-chave: barbatimão, antígeno-toxicidade, mitomicina C, micronúcleo, camundongos.

ABSTRACT

Modulatory effect of extract of *Stryphnodendron adstringens* Mart. (barbatimão) against induced damage by mitomycin C in mice

Stryphnodendron adstringens (Martius) Coville (Leguminosae), popularly known as “barbatimão”, is a medicinal plant that grows in the central Savannas of Brazil. Decoctions or infusions of the stem bark are traditionally used by the native population of Brazil in the treatment of leukorrhoea, diarrhoea and as an anti-inflammatory medicine. The aim of this study was to evaluate the antigenotoxicity effect of ethanolic extract of barbatimão (EEB) against induced damage by mitomycin C (MMC) by the bone marrow micronucleus test in mice. Doses of EEB (50 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg) and MMC (4 mg/kg) were administered simultaneously by intraperitoneal injection (i.p.) in groups of 5 (five) animals for treatment. The positive control received a MMC i.p. (4 mg/kg) and negative control, distilled and sterilized H₂O. Cytological preparations were done according Heddle (1973). For all the doses, micronucleated polychromatic erythrocytes frequency (MNPCE) was evaluated at period of 24 h. The obtained results showed no significantly inhibition of MNPCE

*Corresponding author: Lee Chen Chen, e-mail: chenlee@icb.ufg.br.

frequency (mean = 28.6; SD = 1.67) in the dose of 50 mg/kg of EEB compared to positive control (mean = 30.6; SD = 2.70) ($p > 0.05$). However, the EEB in doses of 100 mg/kg (mean = 19.8; SD = 2.28) and 200 mg/kg (mean = 16.8; SD = 2.58) suppressed significantly the frequency of MNPCE induced by MMC ($p < 0.05$). Thus, the results indicated that the EEB exhibited antigenotoxic activity in bone marrow of mice.

Key words: barbatimão, antigenotoxicity, mitomycin C, micronucleus, mice.

INTRODUÇÃO

Stryphnodendron adstringens (Martius) Coville (Leguminosae), popularmente conhecida como barbatimão, é uma planta medicinal que cresce abundantemente nas Savanas centrais do Brasil. A decocção ou infusão da casca rugosa do tronco tem sido tradicionalmente utilizada pela população nativa no tratamento de diarreias, leucorréias e como antiinflamatório (Santos *et al.*, 1987; Panizza *et al.*, 1988). O *S. adstringens* é constituído quimicamente por flavonóides, taninos e alcalóides (Mello *et al.*, 1996). A planta contém uma grande quantidade de taninos, variando entre 10% e 37%, dependendo do local e da estação do ano em que a amostra é coletada (Teixeira *et al.*, 1990; Mello *et al.*, 1996).

Estudos farmacológicos preliminares dessa planta têm demonstrado significativo efeito curativo da casca do seu tronco (Neves *et al.*, 1992a,b). Os estudos mostraram que o extrato aquoso de barbatimão possui propriedades antiinflamatórias, analgésicas e protetoras da mucosa gástrica (Audi *et al.*, 1999; Bersani-Amado *et al.*, 1996; Lima *et al.*, 1998). Além disso, as atividades moluscicida e fungicida do barbatimão também já foram descritas (Couto *et al.*, 2000; Bezerra *et al.*, 2002). Pesquisas conduzidas recentemente revelaram ainda a ausência de genotoxicidade do fitoterápico da planta em sistemas procariotos e em drosófilas (D'Oliveira, 1998; de Souza *et al.*, 2003). O presente estudo tem por objetivo investigar a atividade antigenotóxica do extrato etanólico liofilizado da casca do tronco da planta *S. adstringens* pelo teste do micronúcleo em camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Stryphnodendron adstringens Mart. (Barbatimão)

O extrato etanólico comercial de *Stryphnodendron adstringens* Mart. foi adquirido da indústria farmacêutica brasileira "As Ervas Curam", Curitiba, Paraná. A liofilização foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais – IQ/UFG.

Animais

Foram utilizados 25 camundongos *Mus musculus* (Swiss Webster) *out bred*, machos, pesando 35 ± 10 g, com idade de 8-12 semanas, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás. Os animais foram trazidos 7 dias antes do

experimento para o laboratório, onde foram mantidos ($24 \pm 2^\circ\text{C}$; $55 \pm 5\%$ de umidade relativa) com um ciclo 12 h claro/escuro, e alimentados com ração comercial (Albina, Ecibra Ltda.) e água, ambas oferecidas "ad libitum".

Drogas e reagentes

Mitomomicina C (Bristol-Myers Squibb), fosfato de sódio dibásico (Merck), fosfato de sódio monobásico (Merck), Giemsa (Doles), metanol (Ecibra) e soro fetal bovino (Nutricell).

Procedimento experimental

Grupos de 5 animais foram tratados via intraperitoneal (i.p.) com extrato etanólico liofilizado de barbatimão nas doses de 50 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg, diluído em água destilada estéril, juntamente com 4 mg/kg (80% da DL_{50}) de mitomicina C (MMC) i.p. Para controle positivo, foi administrada uma dose de 4 mg/kg de MMC e, para controle negativo, água destilada estéril. Para todas as doses utilizadas, a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) foi avaliada no tempo de 24 horas pós-tratamento. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os fêmures retirados. As epífises do fêmur foram cortadas e a medula óssea lavada com soro fetal bovino. Após homogeneização da medula no soro, esta foi centrifugada a 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi parcialmente descartado. O precipitado de células foi homogeneizado e uma gota de suspensão celular foi transferida para a lâmina de vidro, onde foi feito o esfregaço celular. Após secagem das lâminas, estas foram fixadas em metanol absoluto durante 5 minutos e coradas em solução Giemsa tamponada (pH 6,8) por um período de 15 minutos (Heddle, 1973). Decorrido esse período, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar em condições ambientais.

Análise citogenética

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de luz (Olympus BH-2) com a finalidade de detectar possíveis aberrações e/ou perdas cromossômicas (micronúcleos) nos eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. As células foram visualizadas em objetiva de imersão (1000x), avaliando-se 2000 EPC, com duas lâminas para cada animal, conforme Schmid (1975).

Análise estatística

A média e o desvio-padrão dos valores de EPCMN/2000 EPC foram representados. Foi realizada comparação das médias de EPCMN dos tratamentos com o grupo controle positivo (MMC) pelo teste t-Student. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atualmente, a farmacologia e a toxicidade de plantas utilizadas na medicina alternativa têm recebido a atenção da comunidade científica para a verificação de suas propriedades farmacológicas e/ou terapêuticas, e também para a investigação de suas possíveis atividades toxicológicas (Rebecca *et al.*, 2002). No presente trabalho foi avaliado o efeito antimutagênico do extrato etanólico de barbatimão (EEB) contra danos induzidos pela MMC pelo teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos. O referido teste visa a detectar e quantificar a ação mutagênica e/ou antimutagênica de agentes indutores e é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte de uma bateria de testes recomendada para estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram no mercado mundial (Choy, 2001).

Os resultados obtidos da frequência de EPCMN da medula óssea de camundongos tratados com diferentes doses de EEB estão apresentados na Tabela 1.

Os resultados obtidos mostraram que o EEB na dose de 50 mg/kg não provocou diminuição significativa na frequência de EPCMN quando comparada ao controle positivo ($p > 0,05$). No entanto, nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg de EEB foi observada inibição significativa da frequência de EPCMN induzidos pela MMC ($p < 0,05$). Desse modo, os resultados indicaram que o barbatimão exibiu atividade antimutagênica em camundongos.

A identificação precisa dos princípios ativos do *S. adstringens* ainda não é claramente elucidada. Entretanto, os taninos são compostos que possivelmente contribuem significativamente na atuação em diversas atividades biológicas da planta (Rebecca *et al.*, 2003). Na literatura, há descrições que taninos e compostos relacionados exerceram diversas atividades farmacológicas, como ação bactericida, antiviral, moliscidal e antihelmíntica, antihepatotóxica, inibição de xantina oxidase e mono-amino oxidase e inibição de glicosiltransferases. A atividade antimutagênica do barbatimão observada em nossos estudos pode estar relacionada à ação antioxidante e à habilidade dos taninos de formar complexos com outras macromoléculas, como proteínas, polissacarídeos e íons metálicos (Haslam, 1996).

Agradecimentos — O presente trabalho foi financiado pelo CNPq, FUNAPE e UFG. Os autores agradecem ao Dr. Pedro Henrique Ferri e Dra. Suzana da Costa Santos, do Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da UFG, pela liofilização do extrato etanólico da planta.

Tabela 1 — Efeito da administração i.p. de EEB + MMC e controles em medula óssea de camundongos.

Controles	Nº de animais	Dados individuais (EPCMN/2000 EPC)					$\bar{x} \pm s$
		a	b	c	d	e	
H ₂ O _{dest.}	5	12	10	9	8	10	9,80 ± 1,48
MMC	5	29	31	28	35	30	30,60 ± 2,70

Tratamento	Nº de animais	Dados individuais (EPCMN/2000 EPC)					$\bar{x} \pm s$	Atividade antimutagênica
		a	b	c	d	e		
EEB (50 mg/kg) + MMC	5	28	30	29	30	26	28,60 ± 1,67	
EEB (100 mg/kg) + MMC	5	17	23	19	19	21	19,80 ± 2,28	–
EEB (200 mg/kg) + MMC	5	16	20	14	15	19	16,80 ± 2,58	–

CP: ciclofosfamida; MMC: mitomicina C; EEB: extrato de barbatimão; EPC: eritrócitos policromáticos; EPCMN: eritrócitos policromáticos micronucleados. –: atividade antimutagênica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUDI, E. A., TOLEDO, D. P., PERES, P. G., KIMURA, E., PEREIRA, W. K. V., MELLO, J. C. P., NAKAMURA, C. V., ALVES-DO-PRADO, W., CUMAN, R. K. N. & BERSANI-AMADO, C. A., 1999, Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. *Phytother. Res.*, 13: 264-266.
- BERSANI-AMADO, C. A., NAKAMURA, C. V., NAKAMURA, T. U., MARTINEZ, M. & MELLO, J. C. P., 1996, Avaliação das atividades antiinflamatória e antibacteriana do extrato bruto do *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão). In: *Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p.14.
- BEZERRA, J. C. B., SILVA, I. A., FERREIRA, H. D., FERRI, P. H. & SANTOS, S. C., 2002, Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Fitoterapia*, 73: 428-430.
- CHOY, W. N., 2001, Regulatory Genetic toxicology tests. In: W. N. Choy (ed.), *Genetic toxicology and cancer risk assessment*. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- COUTO, L. C., FORTIN, Y., KAMDEM, D. P. & COUTO, L., 2000, The fungicidal potential of hot water extractives of the bark of barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) alone and combined with the Fe⁺⁺⁺ and Al⁺⁺⁺ ions. Green wood bioassays. *Rev. Arvore*, 24: 105-113.
- D'OLIVEIRA, M. I. P., 1998, *Avaliação da atividade genotóxica e mutagênica do barbatimão em cepas bacterianas*. Dissertação de Mestrado em Biologia, Goiânia, UFG.
- DE SOUSA, N. C., DE CARVALHO, S., SPANÓ, M. A. & GRAF, U., 2003, Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 293-299.
- HASLAM, E., 1996, Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug and medicines: possible modes of action. *J. Nat. Prod.*, 59: 205-215.
- HEDDLE, J. A., 1973, A rapid in vitro test for chromosomal damage. *Mutat. Res.*, 18: 187-190.
- LIMA, J. C. S., MARTINS, D. T. O. & DE SOUZA, P. T. JR., 1998, Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. *Phytother. Res.*, 12: 218-220.
- MELLO, J. P., PETEREIT, F. & NAHRSTEDT, A., 1996, Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, 41: 807-813.
- NEVES, M. C. L., JORGE-NETO, J., IFA, D. R., FRACASSO, J. F., LEPERA, E. Z. P. & SILVA, R. F. P., 1992a, Estudo dos feitos farmacológicos produzidos pelos extratos aquosos de hamamelis e barbatimão. In: *Resumos da Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental*. Caxambu, p.7.
- NEVES, M. C. L., JORGE-NETO, J., IFA, D. R., FRACASSO, J. F., LEPERA, E. Z. P., SILVA, R. F. P. & LEPERA, E. Z. P., 1992b, Estudo dos feitos farmacológicos de hamamelis e barbatimão. In: *Resumos do Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Resumos, p.12.
- PANIZZA, S., ROCHA, A. B., GECCHI, R. & SILVA, R. A. P. S., 1988, *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. *Rev. Cienc. Farmacêuticas*, 10: 101-106.
- REBECCA, M. A., ISHII-IWAMOTO, E. L., GRESPAN, R., CUMAN, R. K. N., CAPARROZ-ASSEF, S. M., MELLO, J. C. P. & BERSANI-AMADO, C. A., 2002, Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. *J. Ethnopharmacol.*, 83: 101-104.
- REBECCA, M. A., ISHII-IWAMOTO, E. L., KELMER-BRACHT, A. M., CAPARROZ-ASSEF, S. M., CUMAN, R. K. N., PAGADIGORRIA, C. L. S., MELLO, J. C. P., BRACHT, A. & BERSANI-AMADO, C. A., 2003, Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. *Toxicol. Lett.*, 143: 55-63.
- SANTOS, C. A. M., TORRES, K. R. & LEONART, R., 1987, *Plantas medicinais (Herbarium, Flora et Scientia)*. Scientia et Labor, Curitiba, p. 39.
- SCHIMID, W., 1975, The micronucleus test. *Mutat. Res.*, 31: 9-15.
- TEIXEIRA, M. L., SOARES, A. R. & SCOLFORO, J. R. S., 1990, Variação do teor do tanino da casca de barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Mart, Coville) em 10 locais de Minas Gerais. *Cienc. Prat. Lavras*, 14: 229-232.