

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIGENOTÓXICA DO EXTRATO DE Ginkgo biloba L. PELO INDUTESTE SOS EM CEPAS BACTERIANAS

BORGES, Flávio Fernandes Veloso¹ ; CHEN CHEN, Lee²

PALAVRAS CHAVE: Indução, Ginkgo Biloba, Antigenotoxicidade

1. INTRODUÇÃO:

A planta *Ginkgo biloba* L. é uma árvore nativa da China pertencente à família Ginkgoaceae, cultivada extensivamente na Europa, Austrália, Japão, Coréia e Estados Unidos, que apresenta constituição química rica em terpenos, flavonóides, hidrocarbonetos de cadeia longa, derivados do ácido anacárdico (ou ginkgólícos) e compostos nitrogenados de baixo peso molecular. (Feistel, 1994).

O Ginkgo biloba é utilizado na terapêutica em larga escala e várias propriedades já foram descritas tais como antioxidante, modulador da atividade neuronal, vasodilatador, protetor da barreira hemato-cefálica, anticoagulante, antibacteriano, antiinflamatório, anticlastogênico e agente protetor contra a lise de eritrócitos (Emerit *et al.*, 1999; Batistuzzo *et al.*, 2000; Mazzanti *et al.*, 2000; Diamond *et al.*, 2000; Goh *et al.*, 2003; Wojtaszek *et al.*, 2003).

A detecção de substâncias que possam modular os efeitos genotóxicos de agentes químicos e físicos é de grande importância, pois pode auxiliar pelo menos parcialmente no entendimento dos mecanismos de ação de agentes genotóxicos, bem como contribuem na diminuição das alterações gênicas que podem resultar no aparecimento de doenças (TAKAHASHI *et al.*, 2001).

Assim, o objetivo do presente trabalho é detectar os possíveis efeitos antígenotóxicos do extrato de Ginkgo biloba L., avaliando seu possível efeito atenuante na ação genotóxica da MMC, que é um agente sabidamente mutagênico, utilizando-se o teste de indução do profago λ (Induteste). A justificativa da avaliação da ação genotóxica e antígenotóxica do G. biloba L. é baseada na ampla distribuição dessa planta no mundo e sua larga utilização pela população.

Os resultados positivos dos testes de antigenotoxicidade podem levar a contribuir para uma maior utilização do extrato de Ginkgo biloba L. como fitoterápico, e protetor da ação de agentes genotóxicos .

2. METODOLOGIA:

Materiais:

Foram utilizadas no presente trabalho as seguintes cepas bacterianas, todas derivadas de *Escherichia coli* : cepa lisogênica (WP₂S(λ)) e cepa indicadora (RJF013).O extrato de Ginkgo utilizado foi o extrato Egb 761 Lot. GB001128, original da China e obtido por intermédio da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás. Os Meios de cultura e Tampão

utilizados foram: Meio LB , Meio LB ½ maltose/ampicilina , Meio líquido LB ,TOP Agar e Tampão Sulfato de Magnésio.

Procedimento experimental:

Sobrevivência bacteriana em função da dose de Ginkgo com doses constantes de MMC:

Com o intuito de determinar a ação anticitotóxica do *Ginkgo biloba* L. foi realizada a curva de inativação celular, utilizando-se tratamento simultâneo de diferentes doses de extrato com doses constantes de MMC. O procedimento experimental resume-se da seguinte maneira: A cepa WP₂S(λ), em fase exponencial de crescimento foi centrifugada a 5000 rpm, por 15 minutos e ressuspensa em igual volume de tampão sulfato de magnésio, 1 ml dessa cultura foi adicionada em diferentes doses de extrato de ginkgo e dose contante de MMC e incubadas por 25 minutos a 37° C no shaker. Após,alíquotas dessas culturas foram convenientemente diluídas em tampão sulfato de magnésio e 0,1 mL das culturas diluídas foram espalhadas uniformemente sobre placas de Petri, em duplicatas, contendo meio LB sólido. As placas foram mantidas na estufa a 37° C, por 24 horas, após esse período, as colônias serão contadas com o auxílio de um contador de colônias.

As curvas de sobrevivência foram construídas a partir das frações de sobrevivência celular que são a razão entre o número de células viáveis após uma determinada dose[N] e o número inicial de células [N₀] no eixo das ordenadas, em escala logarítmica, em função da dose de extrato de ginkgo no eixo das abscissas.

Avaliação do efeito antígeno-tóxico do Ginkgo biloba L.

O procedimento experimental resume-se da seguinte maneira: 0,4 mL da cepa lisogênica WP₂S(λ) foram diluída em 40 mL de meio LB, mantendo uma proporção de 1/100. Essa cultura foi levada ao shaker para incubação a 37°C com agitação constante por 2 horas e 30 minutos. Após terem atingido a fase exponencial de crescimento, são centrifugadas a 3800 rpm, por 15 minutos, e ressuspensas em igual volume de tampão sulfato de magnésio.

Amostras de 1 mL dessa cultura são adicionadas a tubos contendo uma dose constante de MMC e diferentes concentrações de extrato de ginkgo Egb 761. Os tubos são incubados a 37°C em shaker por 25 minutos com agitação. Após o período decorrido, as culturas são convenientemente diluídas em tampão sulfato de magnésio e 0,1 mL de cultura da bactéria lisogênica WP₂S(λ) é adicionada a 0,3 mL da cultura da bactéria indicadora (RJF013) e em seguida são misturadas a 2,5 mL de meio gelosado liquefeito (Top-ágar), homogeneizado. O conjunto foi vertido sobre placas, em duplicatas, contendo LB ½ maltose/ampicilina. As placas são incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Decorrido esse período será realizada as contagens dos centros infecciosos, em contador de colônias. Os resultados são computados fazendo-se uma média aritmética entre as duas placas e multiplicando-a pelo fator de diluição.

A curva de indução, representada pelo fator de indução em função da concentração de extrato de ginkgo e é feita em escala semi-logarítmica, de modo que o fator de indução é colocado no eixo das ordenadas em escala logarítmica, e as diferentes concentrações de ginkgo no eixo das abscissas. O fator de indução é expresso pela razão entre o número de centros infecciosos, obtidos a partir da cultura tratada [N] e o número de centros infecciosos a partir da cultura não tratada [NO] (Indução lisogênica espontânea).

O controle positivo da indução lisogênica é realizado com Mitomicina C, em uma concentração de 2 µg. O controle negativo é realizado com água destilada ou diluente específico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Na avaliação da anticitotoxicidade, utilizou-se um tratamento simultâneo de MMC com diferentes doses de extrato. Esta demonstrou que o Ginkgo não apresentou efeito modulador na ação inativadora da MMC. Nas doses mais elevadas (2500 e 5000 µg) o extrato chegou a apresentar um efeito sinérgico com a MMC, aumentando a inativação celular.

Posteriormente, foi realizada a avaliação do efeito antígeno-tóxico do Ginkgo e este apresentou atividade antígeno-tóxica, reduzindo a ação indutora da MMC. Comparando-se os tratamentos (extrato de Ginkgo + MMC) com o controle positivo (MMC) foi observado uma proteção da ordem de 10 vezes para todas as doses ministradas.

4. CONCLUSÃO:

A proposta do presente trabalho foi avaliar os possíveis efeitos antígeno-tóxicos do extrato de *Ginkgo Biloba L.*, utilizando o teste bacteriano de indução do profago λ em cepas de *Escherichia coli*.

Na avaliação de anticitotoxicidade, o resultado mostrou que o extrato não apresentou um efeito modulador na taxa de inativação celular provocada pela MMC e dessa maneira pôde se concluir que o extrato de *Ginkgo biloba L.* não apresenta efeito anticitotóxico .

Na avaliação de antígeno-tóxicidade, o extrato de Ginkgo apresentou ação antígeno-tóxica quando comparada à do controle positivo (MMC).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BATISTUZZO JAO, ITAYA, M. and ETO, Y.(2000). Formulário médico terapêutico. São Paulo, Tecnopress. 421 p.

DIAMOND, B. J., SHIFLETT, S. C., FEIWEL, N., MATHEIS, R. J., NOSKIN, O., RICHARDS, J. A. and SCHOENBERGER, N. E. (2000). Ginkgo biloba Extract: Mechanisms and Clinical Indications. Arch. Phys. Med. Rehabil., 81.

EMERIT, I., ARUTYUNYAN, R., OGANESIAN, N. LEVY, A., CERNJAVSKY, L. SARKISIAN, T., POGOSSIAN, A. and ASRIAN, K.(1995). Radiation-induced clastogenic factors: anticlastogenic effect of Ginkgo biloba extract. Free Radical Biology & Medicine, v. 18, n.6, 985-991.

FEISTEL, B. (1994). Untersuchungen zur analytischen standardisierung von *Ginkgo biloba*-Extrakten und deren galenischer Zuberreitungen. Halle: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg/Alemanha. (Tese doutorado em Ciências Naturais).

GOH, L. M. and BARLOW, P. J. (2002). Antioxidant capacity in Ginkgo biloba. Food Research International, 35: 815-820

MAZZANTI, G., MASCELLINO, M. T., BATTINELLI, L., COLUCCIA, D., MANGANARO, M. and SASO, L.(2000). Antimicrobial investigation of semipurified fractions of Ginkgo biloba leaves. J. of Ethnopharmacology, 71: 83-88.

QUILLARDET, P. *et. Al.* 1989 Detecction of ionizing radiations with the SOS chromotest a bacterial short-term test for genotoxic agents. Research,, v. 216, p. 251-257.

TAKAHASHI,E.; MARCZYLO, T.H.; WATANABE, T.; NAGAI, S.; HAYATSU, H. and NEGISHI, T. Preventive effects of anthraquinone food pigments on the DNA damage induced by carcinogens in *Drosophila*. *Mut. Res.*; 480-481:139-145,2001

WOJTASZEK, M. E., KRUCZYNSKI, Z. and KASPRZAK, J. (2003). Investigation of the free radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* L. leaves. *Fitoterapia*, 74 :1-6.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq / PIVIC

¹ Bolsista de iniciação científica. Instituto de Ciências Biológicas Laboratório de Genética de Microorganismos e Radiobiologia, Flaviofvb1@hotmail.com

² Orientador/Instituto de Ciências Biológicas/UFG, chenlee@icb.ufg.br