

**JULICE MEDEIROS COELHO**

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA, BIOQUÍMICA E DA REPARAÇÃO  
TECIDUAL EM MODELO EXPERIMENTAL SUBMETIDO A  
TRATAMENTOS COM EXTRATOS DE *Handroanthus impetiginosus*  
(*MART. EX DC*) MATTOS (IPÊ-ROXO) E DE *Stryphnodendron*  
*adstringens* (*MART.*) COVILLE (BARBATIMÃO)**

**CAMPO GRANDE**

**2015**

JULICE MEDEIROS COELHO

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA, BIOQUÍMICA E DA REPARAÇÃO  
TECIDUAL EM MODELO EXPERIMENTAL SUBMETIDO A  
TRATAMENTOS COM EXTRATOS DE *Handroanthus impetiginosus*  
(*MART. EX DC*) MATTOS (IPÊ-ROXO) E DE *Stryphnodendron*  
*adstringens* (*MART.*) *COVILLE* (BARBATIMÃO)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreia Conceição  
Milán Brochado Antoniolli Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano  
Oliveira

CAMPO GRANDE

2015

**FOLHA DE APROVAÇÃO**  
JULICE MEDEIROS COELHO

**AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA, BIOQUÍMICA E DA REPARAÇÃO TECIDUAL  
EM MODELO EXPERIMENTAL SUBMETIDO A TRATAMENTOS COM  
EXTRATOS DE *Handroanthus impetiginosus* (MART. EX DC) MATTOS (IPÊ-  
ROXO) E DE *Stryphnodendron adstringens* (MART.) COVILLE (BARBATIMÃO)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Doutor.

Resultado \_\_\_\_\_

Campo Grande (MS), \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS/ FAMED

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iandara Schettert Silva  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS/ FAMED

---

Prof. Dr. Filipe Abdalla dos Reis  
Universidade Anhanguera –Uniderp

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilene Rodrigues Chang  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS/ CCBS

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS/ CCBS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Débora Marchetti Chaves Thomaz  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS/ FAMED

## DEDICATÓRIA

Aos **meus pais**, Anísio e Sueli, por vocês serem esses pais maravilhosos que sempre foram, sempre me incentivando, dando força e coragem para superar os obstáculos e alcançar todos os meus objetivos. Vocês são meu porto seguro, sem o apoio e o amor de vocês eu jamais teria conseguido chegar até aqui. Muito obrigada, muito obrigada, muito obrigada!!! Amo muito vocês.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

**À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva,** professora do programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, minha orientadora, por toda dedicação e paciência durante essa nossa caminhada. Sinto-me privilegiada por ter você como orientadora, mas principalmente por ter conhecido a pessoa que você é, pois além de transmitir seus ensinamentos sempre de forma tão delicada e gentil ainda esteve sempre ao meu lado, compartilhando comigo todas as angústias e ansiedades. Minha gratidão, sempre.

**Ao Prof Dr. Rodrigo Juliano Oliveira,** professor do programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, meu coorientador, por todo conhecimento transmitido e ajuda na realização deste trabalho. Muito obrigada.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por tua constante presença ao meu lado, protegendo e guiando, sempre me dando força para vencer todos os desafios desta vida.

Ao **Programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste**, que por meio de toda dedicação de seus professores e funcionários possibilitou tornar este sonho realidade.

À **Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)**, por nos acolher e tornar possível a realização deste trabalho.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro concedido durante todo o meu estudo.

À **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Iandara Schettert Silva** e ao **Prof Dr. Ricardo Dutra Aydos**, coordenadora e ex-coordenador do programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste e professores da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelos ensinamentos, dedicação e organização do curso.

Ao **Renato Nascimento Gomes**, meu amor e companheiro, por toda paciência e principalmente pelo incentivo e apoio durante esta jornada. Obrigada pelo seu carinho e confiança em mim depositada. Te amo muito, muito, muito...

À **Izabela Pereira Coelho**, minha prima querida, por todo esforço e ajuda na realização desse trabalho. Saiba que sua contribuição foi fundamental para eu pudesse concluir mais essa etapa. Agradeço de coração e desejo muito sucesso e realizações na sua vida.

À **Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Patrícia de Oliveira Figueiredo** e **Prof Dr. Carlos Alexandre Carollo** da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela ajuda na caracterização dos extratos deste trabalho.

À **Thaylisi Ramos Dias** e **Stephanie Dynczuki Navarro** pela dedicação e ajuda na execução do meu trabalho.

Aos **funcionários do Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen) e do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**, em especial a Roseana Silveira Leite, por toda ajuda e dedicação, durante toda a minha pesquisa.

À **Vera Nascimento da Silva e Áurea Gobi**, secretárias do programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, por nos atender de forma tão atenciosa e sempre disposta a nos ajudar.

Aos **funcionários** do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste e funcionários da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul por toda dedicação e paciência com os alunos.

A toda **minha família** (tias, tios, primos e primas) que eu amo de paixão, pois sempre estiveram ao meu lado me dando força e apoio em todos os momentos da minha vida. Muito obrigada!

Aos **meus irmãos, Stéfano e Bruno**, e meu irmão de coração **Renan**, vocês são muito mais do que irmãos, são meus amigos e companheiros, pois sempre me apoiaram e acreditaram em mim. **João Pedro (meu afilhado querido), Paulinha e Naty**, agradeço por fazerem parte das nossas vidas. Amo muito vocês!

Ao **Altino Coelho e Izenir Coelho**, por toda dedicação e preocupação, sempre me ajudando de forma irrestrita. Meus pais postiços, muito obrigada sempre!

Às **minhas tias Madalena, Célia e Marinez**, vocês são especiais na minha vida, não tenho palavras para agradecer todo esforço e carinho que sempre tiveram por mim. Muito obrigada, muito obrigada, muito obrigada! Amo vocês.

À **Naila de Campos Soares**, minha amiga e parceira, por toda força durante essa jornada, mas principalmente pela sua amizade. Muito obrigada.

Aos **meus amigos** e pessoas que ajudaram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho, pelo apoio e pelas angústias compartilhadas, pois sem vocês seria impossível alcançar essa meta.

## Prece de Cáritas

Deus nosso pai, vós que sois todo poder e bondade  
Dai a força àquele que passa pela provação  
Dai a luz àquele que procura à verdade  
Ponde no coração do homem a compaixão e a caridade

Deus, dai ao viajor a estrela guia  
Ao aflito a consolação  
Ao doente o repouso

Pai, dai ao culpado o arrependimento  
Ao espírito a verdade  
A criança o guia  
Ao órfão o pai

Senhor, que a vossa bondade se estenda sobre tudo que criastes  
Piedade senhor para aqueles que não vos conhecem  
Esperança para aqueles que sofrem  
Que a vossa bondade permita aos espíritos consoladores  
Derramarem por toda parte a paz, a esperança e a fé

Deus, um raio, uma faísca do vosso amor pode abrasar a terra  
Deixai-nos beber nas fontes esta bondade fecunda e infinita  
E todas as lágrimas secarão, todas as dores se acalmarão  
Um só coração, um só pensamento subirá até vós  
Como um grito de reconhecimento e de amor

Como Moisés sobre a montanha  
Nós vos esperamos com os braços abertos  
Oh bondade !  
Oh beleza !  
Oh perfeição !  
E queremos de alguma forma alcançar vossa misericórdia

Deus, Dai-nos a força de ajudar o progresso a fim de subirmos até vós  
Dai-nos a caridade pura  
Dai-nos a fé e a razão  
Dai-nos a simplicidade, que fará de nossas almas  
O espelho onde há de se refletir a vossa santa e misericordiosa imagem.



## RESUMO

COELHO, Julice Medeiros. AVALIAÇÃO TOXICOGENÉTICA, BIOQUÍMICA E DA REPARAÇÃO TECIDUAL EM MODELO EXPERIMENTAL SUBMETIDO A TRATAMENTOS COM EXTRATOS DE *Handroanthus impetiginosus* (MART. EX DC) MATTOS (IPÊ-ROXO) E DE *Stryphnodendron adstringens* (MART.) COVILLE (BARBATIMÃO), 2015. Tese [Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste] – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

**Objetivo:** Avaliar as atividades genotóxicas, mutagênicas, bioquímicas, fitoquímicas e da reparação tecidual em modelo experimental submetidos a tratamentos com pomadas de extratos de *Handroanthus impetiginosus* (HIWE-O) e *Stryphnodendron adstringens* (SAWE-O). **Materiais e métodos:** Utilizou-se 60 ratos Wistar, distribuídos aleatoriamente em seis grupos. Foi confeccionada uma lesão cutânea padronizada utilizando-se um punch metálico de 1,5 cm de diâmetro. Após a confecção da lesão cutânea, os animais dos Grupos 1 e 4 receberam aplicação tópica base de pomada (vaselina sólida) diariamente, por um período de 7 e 14 dias, respectivamente. Os Grupos 2 e 5 receberam aplicação tópica de HIWE-O a 10% diariamente, por um período de 7 e 14 dias, respectivamente, e os animais dos grupos 3 e 6 receberam aplicação tópica de SAWE-O a 10% diariamente, por um período de 7 e 14 dias, respectivamente. **Resultados:** O perfil químico de SAWE revelou a presença de substâncias identificadas como pertencentes às classes das proantocianidinas, prodelfinidinas e prorobinetinidinas, e o perfil químico de *Handroanthus impetiginosus* revelou a presença de substâncias pertencentes à classe dos iridoides e fenilpropanoides glicosilados. Os achados histológicos mostraram epitelização completa aos 14 dias em todos os animais dos grupos tratados com HIWE-O e SAWE-O, enquanto neste período, apenas 2 animais do grupo controle apresentaram a lesão totalmente epitelizada (teste Qui-quadrado ( $p < 0,05$ )). Os ensaios biológicos não revelaram efeito genotóxico e mutagênico de HIWE-O e SAWE-O e na análise bioquímica os grupos HIWE-O e SAWE-O apresentaram diferenças significantes de TGO e TGP quando comparados com os valores de referência ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Tukey). **Conclusões:** Os extratos de *Handroanthus impetiginosus* e de *Stryphnodendron adstringens* apresentaram substâncias com ação adstringente, antiinflamatória e antioxidante, favoreceram a reparação tecidual de lesões cutâneas, não apresentaram efeitos genotóxicos e mutagênicos, e não alteraram a maioria dos parâmetros bioquímicos estudados.

**Palavras – Chave:** Ipê-roxo; Barbatimão; genotoxicidade; cicatrização; plantas medicinais.

## ABSTRACT

**COELHO, Julice Medeiros. EVALUATION TOXICOGENETICS, BIOCHEMISTRY AND TISSUE REPAIR IN EXPERIMENTAL MODEL SUBMITTED TO TREATMENT WITH EXTRACTS OF *Handroanthus impetiginosus* (MART .EX DC) MATTOS (PURPLE “IPÊ) AND *Stryphnodendron adstringens* (MART.) COVILLE (“BARBATIMÃO”), 2015.** Thesis [Doctorate in Health and Development in the Central West Region ] - Federal University of Mato Grosso do Sul, MS .

**Aim of the study:** To evaluate the genotoxic, mutagenic, biochemical, and tissue repair effects in experimental model treated with ointments formulated from *Handroanthus impetiginosus* (HIWE-O) and *Stryphnodendron adstringens* (SAWE-O) extract. **Materials and methods:** Sixty Wistar rats were randomized in six groups. A standardized skin lesion was performed in the rats using a metal punch. After the performed skin lesion, groups 1 and 4 received a topical ointment base (solid Vaseline) daily for a period of 7 and 14 days, respectively, groups 2 and 5 received a topical application of HIWE-O at a concentration of 10% daily, for a period of 7 and 14 days, respectively, and t groups 3 and 6 received a topic application of SAWE-O at a concentration of 10% daily for a period of 7 and 14 days, respectively. **Results:** The chemical analysis of the SAWE profile revealed the presence of substances belonging to proanthocyanidins, prodelphinidins, and prorobinetinidins, and the chemical profile of *Handroanthus impetiginosus* revealed the presence of substances belonging to iridoid, glycoside, and phenylpropanoid glycoside classes. Histological findings revealed complete epithelialization by day 14 in all the animals treated topically with HIWE-O and SAWE-O, while only two animals in the control group had a completely epithelialized lesion during this period (Test: Chi-square ( $p < 0.05$ )). The biological assays revealed no genotoxic and mutagenic effects of HIWE-O and SAWE-O. The biochemical analysis of HIWE-O and SAWE-O groups showed significant differences in GOT and TGP compared to the reference values ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Tukey). **Conclusions:** The extracts of *Handroanthus impetiginosus* and *Stryphnodendron adstringens* substances presented with astringent action, anti-inflammatory and antioxidant, favored tissue repair of skin lesions, did not exhibit genotoxic and mutagenic effects and did not affect the evaluated biochemical parameters.

**Keywords:** *Tabebuia*; *Stryphnodendron adstringens*; genotoxic; healing; medicinal plants.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1. <i>PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA</i> .....	20
2.2. <i>Handroanthus impetiginosus (MART. EX DC.) MATTOS (IPÊ-ROXO)</i> ...22	
2.3. <i>Stryphnodendron adstringens (BARBATIMÃO)</i> .....23	
2.4. <i>ENSAIOS BIOLÓGICOS</i> .....	25
2.4.1. <i>Ensaio do Cometa</i> .....	26
2.4.2. <i>Ensaio do Micronúcleo em sangue periférico</i> .....	27
2.4.3. <i>Ensaio de Fagocitose Esplênica</i> .....	28
2.4.4. <i>Ensaio de Apoptose</i> .....	29
2.4.5. <i>Contagem diferencial de células do sangue</i> .....	29
2.4.6. <i>Análise Bioquímica</i> .....	30
2.4.7. <i>Análise Histológica</i> .....	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. OBJETIVO GERAL.....	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1. <i>Materiais vegetais e preparo dos extratos aquosos de <u>Handroanthus impetiginosus (HIWE)</u> e <u>Stryphnodendron adstringens (SAWE)</u></i> .....	34
4.2. <i>Preparo das pomadas dos extratos de <u>Handroanthus impetiginosus (HIWE-O)</u> e de <u>Stryphnodendron adstringens (SAWE-O)</u></i> .....	36
4.3. <i>Perfil químico dos extratos aquosos das cascas de <u>Handroanthus impetiginosus (HIWE)</u> e <u>Stryphnodendron adstringens (SAWE)</u></i> .....	36
4.4. <i>Ato Operatório e ensaio pré-clínico</i> .....	37
4.5. <i>Ensaio Biológicos</i> .....	40
4.5.1. <i>Análise histológica</i> .....	40
4.5.2. <i>Ensaio do Cometa</i> .....	41
4.5.3. <i>Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico</i> .....	42
4.5.4. <i>Contagem Diferencial de Células do Sangue</i> .....	42
4.5.5. <i>Ensaio de Fagocitose Esplênica</i> .....	42

<b>4.5.6. Ensaio de Apoptose.....</b>	<b>43</b>
<b>4.5.7. Análise Bioquímica.....</b>	<b>43</b>
<b>4.6. Análise Estatística.....</b>	<b>43</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>5.1. Perfil químico de <u>S. adstringens</u> (SAWE) e <u>H. impetiginosus</u> (HIWE)...</b>	<b>44</b>
<b>5.2. Análise macroscópica e histológica.....</b>	<b>47</b>
<b>5.3. Estudos toxicogenéticos.....</b>	<b>48</b>
<b>5.4. Estudos bioquímicos.....</b>	<b>52</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela1 – Dados cromatográficos e UV, MS e MS / MS de compostos no extrato aquoso de *S. adstringens*.....45
- Tabela 2 – Dados cromatográficos e UV,MS e MS / MS de compostos no extrato aquoso de *H. Impetiginosus*.....46 e 47
- Tabela 3 - Valores médios  $\pm$  erro padrão da média da frequência de células lesionadas, distribuição entre as classes de danos e escore referentes aos testes de genotoxicidade das pomadas com as pomadas a base de *Handroanthus impetiginosus* e *Stryphnodendron adstringens* no ensaio do cometa em sangue periférico de ratos.....49
- Tabela 4 – Valores de referência e média  $\pm$  erro padrão da média relativas à contagem diferencial de células do sangue periférico em ratos.....51
- Tabela 5 – Valores médios  $\pm$  erro padrão da média dos parâmetros bioquímicos no período de 7 dias de animais tratados com as pomadas a base de *Handroanthus impetiginosus* e *Stryphnodendron adstringens*.....52
- Tabela 6 – Valores médios  $\pm$  erro padrão da média dos parâmetros bioquímicos no período de 14 dias de animais tratados com as pomadas a base de *Handroanthus impetiginosus* e *Stryphnodendron adstringens*.....53

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fotografia da árvore, flores, tronco e extrato de *Handroanthus impetiginosus*.....22
- Figura 2 - Fotografia da árvore, folhas, tronco e extrato de *Stryphnodendron adstringens*.....24
- Figura 3 - Escala de danos apresentada no ensaio do cometa.....26
- Figura 4 – Figura mostrando a identificação dos leucócitos na contagem diferencial de células .....29
- Figura 5 – Fotografia da montagem das exsiccatas de *Handroanthus impetiginosus* e de *Stryphnodendron adstringens*.....34
- Figura 6 – Ficha das exsiccatas de *Handroanthus impetiginosus* e de *Stryphnodendron adstringens* depositas no herbário CGMS-UFMS.....35
- Figura 7 - Fotografia do *punch* metálico utilizado para excisão do fragmento cutâneo.....38
- Figura 8 - Fotografia da lesão cutânea confeccionada com *punch* metálico.....39
- Figura 9 – Delineamento experimental .....40
- Figura 10 - Cromatograma BPC dos extratos de *S. adstringens* e *H. impetiginosus* no modo negativo.....44
- Figura 11 - Fotomicrografia no 14º dia de avaliação do processo de reparação tecidual, mostrando epitelização incompleta (entre as setas) no animal do grupo controle 14 (A), epitelização completa no animal do grupo HIWE-O 14(B) e grupo

SAWE-O	14	(C).	Aumento	10x,	M.O,	coração	
H.E.....							48

Figura 12 – Porcentagem de animais com ausência de epitelização, epitelização parcial ou completa segundo o tratamento tópico com as pomadas a base de *Handroanthus impetiginosus* e *Stryphnodendron adstringens*. Teste: Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ).....48

Figura 13 – Ensaio do micronúcleo em animais submetidos ao tratamento tópico com as pomadas a base de *Handroanthus impetiginosus* e *Stryphnodendron adstringens*. Frequência média de células micronucleadas em sangue periférico. A comparação foi realizada entre os períodos 7 e 14 dias de utilização das pomadas (†). Teste: ANOVA, Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).....49

Figura 14 – Fagocitose esplênica em animais submetidos ao tratamento tópico com as pomadas a base de *Handroanthus impetiginosus* e *Stryphnodendron adstringens*. Frequência média de células com evidência de fagocitose esplênica. A comparação foi realizada entre os períodos 7 e 14 dias de utilização das pomadas (†). Teste: ANOVA, Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).....50

Figura 15 – Frequência média de células em apoptose em rim, fígado e baço de animais submetidos ao tratamento tópico com as pomadas a base de *Handroanthus impetiginosus* e *Stryphnodendron adstringens*. A comparação foi realizada entre os períodos 7 e 14 dias de utilização das pomadas. Teste: ANOVA ( $p < 0,05$ ).....51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST–Aspartato transaminase

DL50 – Dose Letal 50%

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

HIWE – Extrato aquoso de *Handroanthus impetiginosus*

HPLC–Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

OMS - Organização Mundial da Saúde

PNPMF - Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

RNA – Ácido Ribonucleico

SAWE – Extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens*

TGO–Transaminase Glutâmica Oxalacética

TGP - Transaminase Glutâmica Pirúvica

UFLC – Cromatografo Líquido Ultra Rápido

UV- Ultra Violeta

VLDL – Lípoproteína de Baixa densidade

VRmas – Valores de Referência Máxima

VRmin– Valores de Referência mínimo



## LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetro
cm <sup>2</sup>	centímetro quadrado
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
°C	graus Celsius
g	grama
m	metro
MeOH	metanol
mg	miligrama
mg/ Kg	miligrama por quilograma de peso
mm	milímetro
ml	mililitro
N <sub>2</sub>	nitrogênio
PVDF	fluoretopolivinidileno
UFLC	Ultra Fast Liquid Chromatograph
%	porcentagem

## 1. INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos que o uso de produtos medicinais a base de plantas é prática comum para o tratamento de doenças. O uso de plantas medicinais decaiu com o desenvolvimento dos medicamentos sintéticos no século XX, porém, nas últimas décadas apresentou crescimento marcante, como tratamento alternativo aos medicamentos da medicina convencional (CARVALHO et al., 2007) e a retomada por tratamentos de origem vegetal recebem apoio dos programas de políticas nacionais e internacionais quanto ao cultivo, incentivo à pesquisa e uso racional dos recursos naturais para cuidados primários em saúde (LIMA, 2014).

A medicina popular caseira é uma tradição passada de geração para geração, e no Brasil, por possuir uma miscigenação cultural envolvendo europeus, africanos e indígenas, essa tradição é muito diversificada e para muitas das comunidades brasileiras é o único recurso terapêutico disponível (MELO et al., 2007; CARVALHO; SILVEIRA, 2010).

Dentre as plantas medicinais brasileiras, *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex DC) Mattos, uma espécie arbórea pertencente à família Bignoniaceae e também conhecida pelos nomes de ipê-roxo e pau d'arco é nativa da América Latina com ocorrência em todo Brasil, principalmente nos biomas do Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Amazônia (GROSE; OLMSTEAD, 2007; DA SILVA, 2009; MAIA-SILVA et al., 2012) e é empregada na medicina popular caseira devido à diversidade de constituintes químicos, como as naftoquinonas e seus derivados, além de iridóides e antraquinonas, utilizadas para o tratamento de inflamações, doenças parasitárias, neoplasias e na cicatrização de feridas (PANIZZA, 1997; DA SILVA et al., 2013).

*Stryphnodendron adstringens*, conhecida popularmente como barbatimão, é outra planta medicinal brasileira bastante utilizada na medicina caseira. Tem ampla distribuição geográfica, de ocorrência, principalmente, no cerrado típico, campo-sujo e cerradão, nos estados do Pará, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e também no Distrito Federal (FELFILI et al., 1999). Desta espécie registra-se o uso terapêutico da casca da árvore principalmente para o tratamento de feridas cutâneas, distúrbios gastrointestinais e inflamações vaginais. Destaca-se ainda sua ação adstringente, antiinflamatória, antimicrobiana, antiedematogênica e

antioxidante (EURIDES et al., 1996; COUTINHO, 2004; SOUZA et al., 2007; FERREIRA et al., 2010; LIMA, 2010; COSTA et al., 2011).

Os relatos anteriores demonstram que o uso dos extratos de ipê-roxo e barbatimão pela população é comum e tendem a aumentar ao longo dos anos seja em função da sabedoria popular e/ou devido a estudos que comprovam as aplicações indicadas pelas etnofarmacologia. Soma-se a isso a comprovação de outras atividades biológicas por meio de estudos científicos (GUARIM NETO, 1987; MARTINS; ALVES, 2003; SILVA, 2006; GARCEZ et al., 2007; MELO et al., 2007; SOUZA, 2007; SOARES, 2008; COELHO, 2010).

No entanto, apesar desses fatos, a literatura apresenta poucos estudos sobre possíveis efeitos tóxicos dessa utilização, o que tem chamado atenção de estudiosos visto que a maioria da população faz o uso das plantas medicinais e fitoterápicos por automedicação, muitas vezes sem indicação médica e sem que esses tenham o perfil tóxico bem estabelecido (VEIGA-JUNIOR, 2008). Logo, estudos multidisciplinares se tornam cada vez mais importante para a definição dos potenciais terapêuticos e/ou dos efeitos tóxicos de extratos vegetais, para que os mesmos possam ser usados com segurança e efetividade pela população.

Diante do exposto verificou-se a necessidade de novos estudos com o *Handroanthus impetiginosus* e *Stryphnodendron adstringens* observada a escassez de dados, em especial, na área de genética toxicológica e devido ao grupo de pesquisa já possuir trabalhos realizados e publicados com esses extratos, onde, Coelho et al. (2010) demonstraram melhorias no processo de reparação cutânea sob hipertensão venosa. O interesse é ainda maior quando se considera que 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas tradicionais nos cuidados básicos de saúde (OMS, 2000). Diante dessa realidade, avaliou-se os efeitos toxicogenéticos, bioquímicos e na reparação tecidual com utilização dos extratos de *Handroanthus impetiginosus* e *Stryphnodendron adstringens*, em modelo experimental, além da caracterização fitoquímica dos extratos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA**

O desenvolvimento de políticas públicas para facilitar a integração da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa nos sistemas nacionais de atenção à saúde foi recomendado aos estados-membros no final da década de 70 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) com a criação do Programa de Medicina Tradicional. Desde então, a OMS recomenda e reforça a importante contribuição da medicina tradicional caseira na prestação de assistência social, especialmente às populações que tem pouco acesso aos sistemas de saúde (BRASIL, 2006).

No Brasil, a Política aprovada por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, tem o objetivo de garantir o acesso seguro e o uso correto de plantas medicinais e fitoterápicos pela população, assim como, promover a utilização sustentável da biodiversidade brasileira e desenvolver a indústria nacional dos fitoterápicos (BRASIL, 2006).

Antonio et. al (2014) ressaltam que no Brasil, o país com a maior biodiversidade do mundo, grande riqueza cultural e de conhecimentos sobre plantas medicinais, a atenção primária à saúde e o Sistema Único de Saúde tenham tão poucas experiências registradas de ações com plantas medicinais disponíveis na literatura científica ao final da primeira década do século XXI. Para os autores, existe a hipótese de que o tema das plantas medicinais tenha sido subvalorizado no Brasil, fazendo com que o uso das plantas medicinais pareça um resquício de tempos subdesenvolvidos, primitivos e arcaicos de cuidado, e não como um futuro possível de tecnologias novas sustentáveis, aberto a modelos mais complexos de entendimento da ação das plantas sobre o ser humano.

Para Badke et al. (2012) a aproximação entre o saber popular e o saber científico sobre a eficácia farmacológica das plantas medicinais é importante, pois, em seu estudo, a grande maioria dos vegetais utilizados para fins medicinais citados pelos entrevistados apresenta suas indicações terapêuticas confirmadas em estudos científicos. Acredita-se ainda, que seu poder curativo não deve ser apenas considerado como uma tradição passada de pais para filhos, mas sim, uma área da

ciência, que deve ser estudada e aperfeiçoada para ser aplicada de forma segura e eficaz por profissionais da saúde.

No estudo realizado por Lima et al. (2014) sobre o uso de plantas medicinais por mulheres agricultoras no cuidado familiar, os autores relataram que para muitas comunidades, as plantas medicinais além de se constituírem no primeiro recurso procurado, também são consideradas tão ou mais eficazes que a medicação alopática, sendo utilizadas com o intuito de reduzir o uso da medicação industrializada. Porém, o uso de plantas medicinais não deve ser indiscriminado e requer atenção e cuidados principalmente pelo uso feito por automedicação, sem prescrição médica.

Nesse sentido, em 2009, foi realizado o Seminário Complexo Industrial da Saúde e Fitoterápicos, com a finalidade de integrar diversos setores afins à questão, como o setor industrial, os serviços de saúde, a academia e o Ministério da Saúde, para identificar e desenvolver as potencialidades para produção de fitoterápicos (BRASIL, 2012). Logo, a criação de uma política para a Fitoterapia abre perspectivas de desenvolvimento de estudos com as plantas medicinais, que além de estabelecer critérios quanto ao uso, também pode dar ao Brasil papel de destaque no cenário mundial na produção de medicamentos fitoterápicos (CARVALHO, 2007).

Dessa forma, a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 14/2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que trata do registro de medicamentos fitoterápicos, estabelece três critérios pelos quais devem ser comprovados a eficácia e a segurança dos medicamentos fitoterápicos: estudos pré-clínicos e clínicos, sustentação na literatura enumerada na Instrução Normativa 05/2010 da ANVISA e tradicionalidade de uso, isto é o uso popular por um período não inferior a 20 anos (BRASIL, 2010; FIGUEREDO et al., 2011).

Por considerar a importância das plantas medicinais nos cuidados básicos de saúde, o Ministério da Saúde elaborou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) a lista conta com 71 plantas medicinais com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse ao SUS (BRASIL, 2009; BRASIL, 2012).

Dentre as plantas citadas na lista do RENISUS estão o *Handroanthus impetiginosus* (= *Tabebuia avellanedae*) e *Stryphnodendron adstringens*.

## 2.2. *Handroanthus impetiginosus* (IPÊ-ROXO)

*Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, pertence à família Bignoniaceae. Essa possui cerca de 120 gêneros e 800 espécies; dentre elas, 100 são conhecidas popularmente como ipês, incluídas nos gêneros *Handroanthus* e *Tabebuia* (SOUZA; LORENZI, 2005; OLMSTEAD; GROSE, 2007). A espécie é nativa das Américas com ocorrência em todo Brasil, principalmente nos biomas do Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Amazônia (MAIA-SILVA et al., 2012).

O ipê-roxo é uma árvore de porte médio, até 35 m de altura e 90 cm de diâmetro (Figura 1). A flor, roxo-violácea, é pouco pilosa e muito abundante. As folhas, de coloração verde-escura, são opostas e compostas por 5 a 7 folíolos, glabros, com ápice agudo (LORENZI, 1992; PANIZZA, 1997; LORENZI; MATOS, 2002).

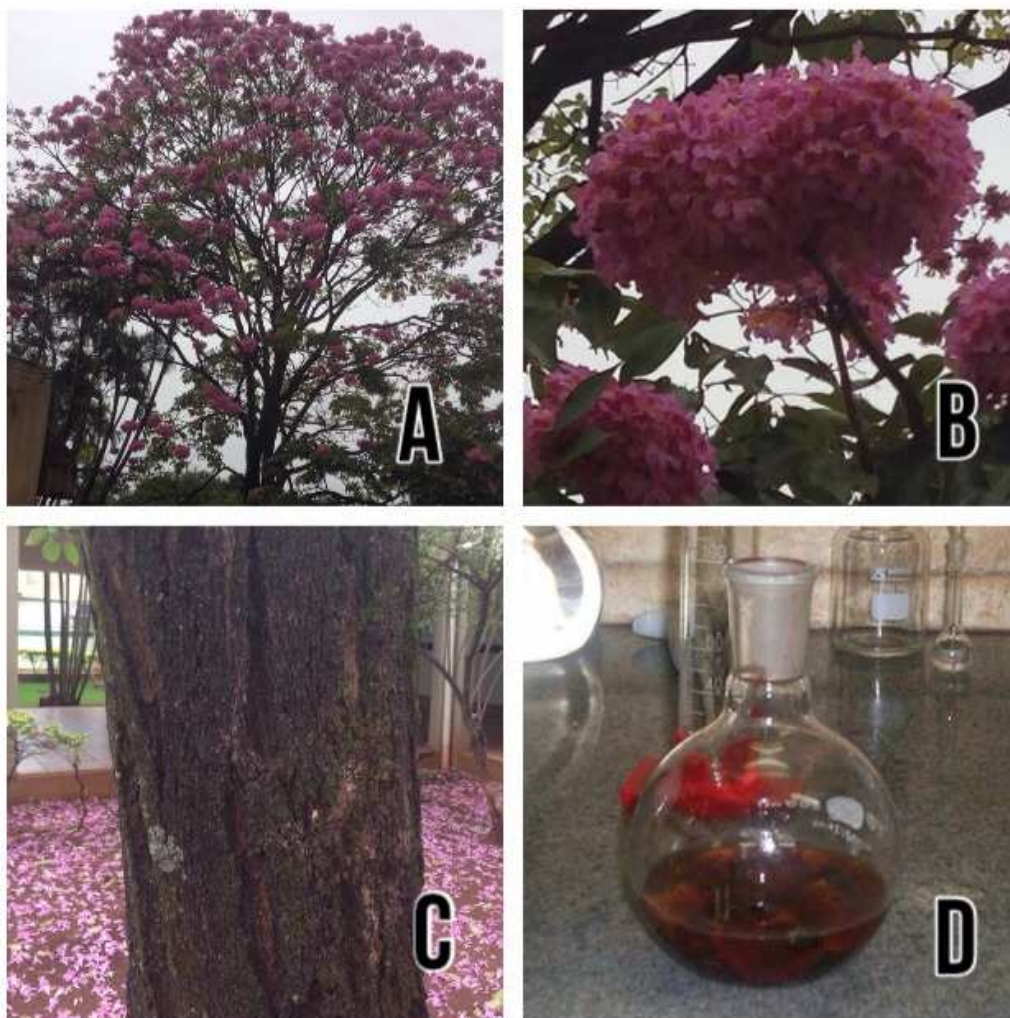


Figura 1- Fotografia da árvore (A), Flores(B), tronco (C) e extrato(D) de *Handroanthus impetiginosus*.

Fonte: Arquivos do autor

O ipê-roxo é bastante utilizado para fins paisagístico devido às suas flores roxo-violácea. A madeira é utilizada para obras externas em função de sua resistência e durabilidade e as cascas empregadas nas formas de infusão, cozimento e decocções na medicina caseira para o tratamento de local de impetigo, eczemas e cicatrização de feridas. Destaca-se ainda o seu uso oral no tratamento de inflamações, dores de dente, dores articulares, como antimicrobiano, antiviral (como no tratamento do herpes) e antitumoral (PANIZZA, 1997; LÜBECK, 2001; LORENZI; MATOS, 2002; ALMEIDA, 2003; GARCEZ et al., 2007).

O histórico do potencial terapêutico do ipê-roxo é bem documentado na literatura, pois é descrito seu uso pela população indígena desde a época dos Incas (PANIZZA 1997). Nos trabalhos científicos, a atividade antibiótica foi inicialmente estudada por Lima e D'albuquerque (1962), a atividade antiinflamatória já foi descrita por Wanick et al. (1970) e Lopes et al. (1978) e a ação cicatrizante por Silva (2006) e Coelho et al. (2010).

Dentre os constituintes químicos presentes na casca e madeira de ipê-roxo estão as naftoquinonas, principalmente o lapachol, a lapachona e alguns de seus derivados; furanonaftoquinona; antraquinona; iridóides; flavonoide (quercetina); ácido hidroxibenzóico e taninos (PANIZZA 1997; LORENZI; MATOS 2002).

Uma vez conhecida a caracterização fitoquímica do ipê-roxo, estudos com compostos isolados, como é o caso do lapachol demonstrou importante potencial antiinflamatório, bactericida, fungicida, tripanocida e antineoplásico segundo registros de Almeida et al.(1988), Guiraud et al. (1994), Sester (1996) e Silva et al. (2003). Em trabalhos mais recentes destacam-se também os estudos sobre o potencial antineoplásico das naftoquinonas, em especial a  $\beta$ -lapachona (MONTANARI; BOLZANI, 2001; HIGA, 2011; CAVALCANTI et al., 2013).

### **2.3. *Stryphnodendron adstringens* (BARBATIMÃO)**

*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae), é espécie nativa do Cerrado brasileiro, encontrado em áreas do Brasil Central, desde os estados do Pará, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e no Distrito Federal. Árvore de porte médio, de 4 a 6 m de altura quando adulta e o diâmetro do tronco varia entre 20 a 30 cm. É uma planta hermafrodita, que floresce de outubro a fevereiro sendo

suas flores de coloração avermelhada. Os frutos correspondem a vagens sésseis e grossas, com tamanho médio de 10 cm e as folhas são bipinadas, com seis a oito folíolos compostos e foliólulos de tamanho entre 30 a 60 mm (Figura 2) (EURIDES et al., 2010).

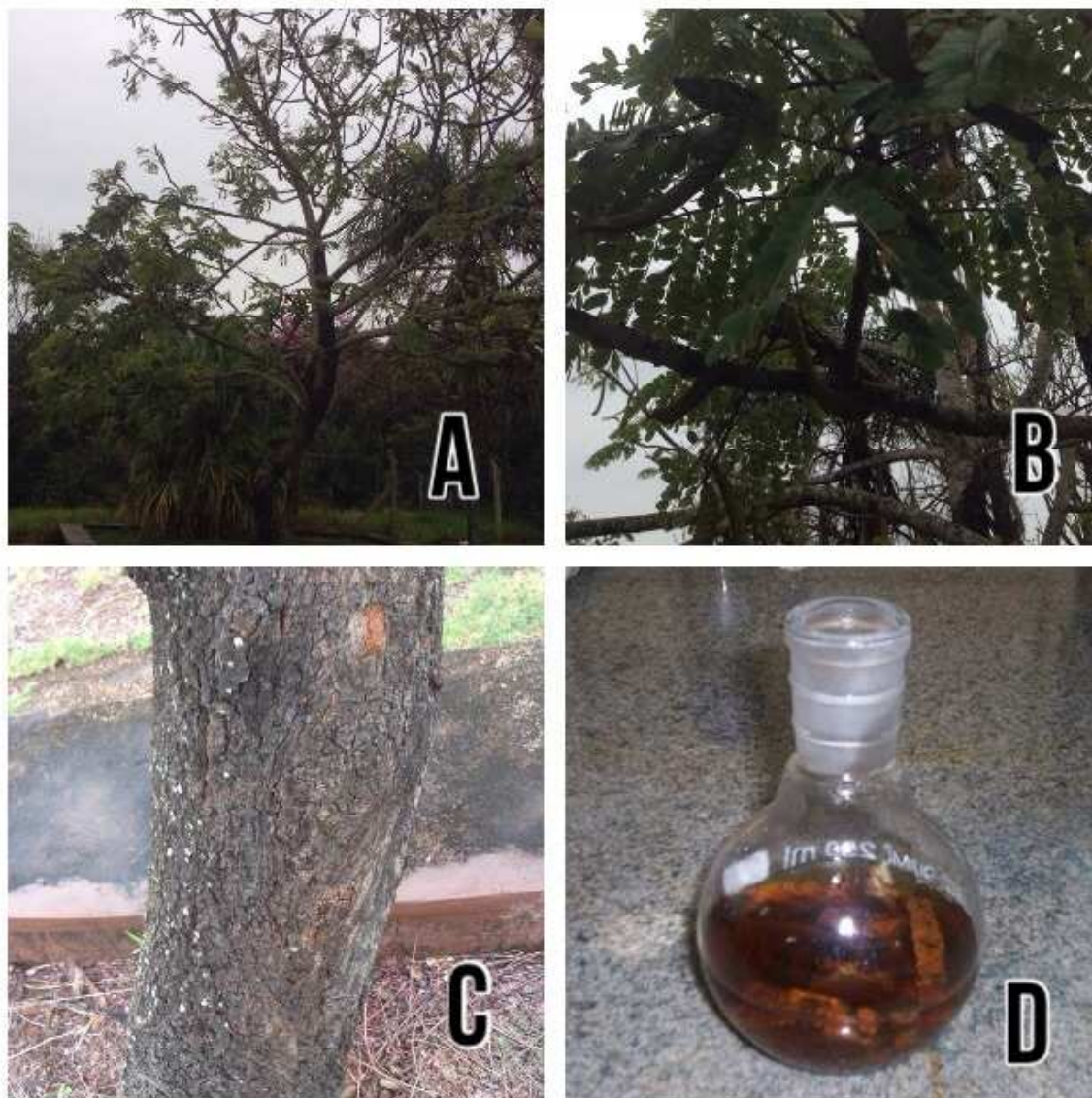


Figura 2 - Fotografia da árvore (A), folhas (B), tronco (C) e extrato de *Stryphnodendron adstringens*.

Fonte: Arquivos do autor.

Em um trabalho realizado pelo Ministério da Saúde onde reúne dados técnicos e informações quanto ao uso popular do *Stryphnodendron adstringens*, é relatado que as principais formas de uso do barbatimão pela população são feitas a partir das cascas dos caules e entrecascas na forma de decoctos, infusões e tinturas e que por via tópica é utilizado para o tratamento de lesões cutâneas, feridas ulcerosas, inflamações e infecções vaginais, problemas de circulação e pele



excessivamente oleosa, enquanto, a administração oral de preparações obtidas a partir de cascas é descrita para o tratamento de diarreia, inflamações da garganta, gastrites, hemorragias, escorbuto, complicações pulmonares e infecções respiratórias (BRASIL, 2014).

Dentre os estudos científicos realizados com o barbatimão pode-se destacar os trabalhos de Souza et al. (2007) e Costa et al. (2011) que avaliaram a ação antisséptica e antimicrobiana, Lucena et al. (2009) e De Paula et al. (2010) estudaram a ação antiofídica, Souza et al. (2007) o efeito antioxidante e Hernandez (2010), Lima (2010) e Coelho (2010) confirmaram a ação cicatrizante do barbatimão sobre feridas cutâneas.

Segundo Panizza et al. (1988) as propriedades medicinais do barbatimão se devem em grande parte às altas concentrações de taninos encontrados na casca. Os taninos são compostos fenólicos encontrados na maioria das plantas, possuem solubilidade em água e alto peso molecular, de forma a possibilitar a formação de complexos estáveis com proteínas e outras macromoléculas (JORGE *et al.*, 2001; MONTEIRO *et al.* 2005). Os taninos podem ser classificados em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis incluem os galitaninos e os elagitaninos, polímeros derivados dos ácidos gálico e elágico, já os taninos condensados são polifenóis, consistindo de unidades flavonóidicas com vários graus de condensação, e estão associados aos seus precursores naturais, flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (MUELLER-HARVEY, 2001; MONTEIRO *et. al*, 2005).

De acordo com Monteiro et al. (2005) nos tratamentos de feridas cutâneas, queimaduras e inflamações os taninos formam uma camada protetora sobre a mucosa ou tecido lesado através do complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeos, permitindo assim que compostos ricos em taninos favoreçam o processo de cicatrização da pele e mucosas.

## **2.4 – ENSAIOS BIOLÓGICOS**

A retomada por terapias alternativas à base de plantas medicinais são práticas que devem ser incentivadas e estimuladas (BRASIL, 2006). Porém, muitas plantas medicinais não tiveram as suas atividades bem estabelecidas, podendo

apresentar substâncias com potencial tóxico em sua composição (FENNELL et al., 2004; PASTORI et al. 2015).

A avaliação do potencial genotóxico/mutagênico é recomendada para as plantas medicinais, pois o conceito errado de que os produtos naturais estão livres de efeitos tóxicos, representa preocupação por parte da comunidade científica sobre o uso prolongado de plantas medicinais de forma empírica (VIEIRA et al., 2009).

Na presente pesquisa, os ensaios eleitos para a avaliação toxicogenética foram os ensaios do cometa e micronúcleo em associação com os ensaios complementares de fagocitose esplênica, apoptose e contagem diferencial de células do sangue.

Também foram eleitos ensaios bioquímicos no intuito de prever a correlação desses com danos toxicogênicos e com a reparação tecidual que teve sua avaliação realizada por histopatologia.

#### **2.4.1. Ensaio do Cometa**

O ensaio do cometa, também chamado eletroforese em gel de célula isolada, é capaz de detectar os níveis de danos oxidativos ao DNA em uma célula isolada (SINGH et al. 1988), detectando lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação (TICE, 1995).

Segundo Brianezi et al. (2009) a técnica consiste na lise de membranas celulares, seguida pela indução da migração eletroforética do DNA liberado em matriz de agarose. A partir do nucleóide, fragmentos de DNA migram no sentido do ânodo e quando visualizados em microscópio a célula adquire forma semelhante ao de um cometa (Figura 3).

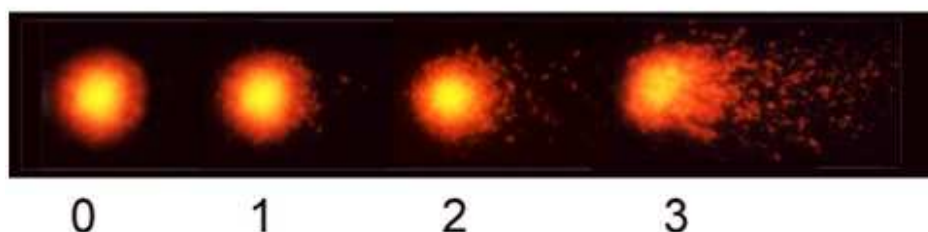


Figura 3 - Escala de danos apresentada no ensaio do cometa.

Fonte - Gentox – Laboratório de Genética Toxicológica. Disponível em: [gentox.bio.br](http://gentox.bio.br)

De acordo com os níveis de danos no DNA, os nucleóides podem ser classificados em classe 0 – quando não apresentam cauda; classe 1 – quando o nucleóide apresenta cauda menor que o seu diâmetro; classe 2 – quando a cauda tem o tamanho entre 1 e 2 vezes o diâmetro do nucleóide; classe 3 – quando a cauda possui o tamanho maior que 2 vezes o diâmetro do nucleóide (KOBAYASHI *et al.*, 1995).

#### **2.4.2. Ensaio do micronúcleo em sangue periférico**

A avaliação de danos cromossômicos em células expostas a agentes mutagênicos pode ser feita pelo teste de micronúcleo (FENECH; MORLEY, 1985; FENECH *et al.*, 1999; HOLLANDA, 2008; RODRIGUES; 2013), sendo os linfócitos periféricos e eritrócitos os tipos celulares mais utilizados no teste do micronúcleo *in vivo* (TUCKER e PRESTON, 1996).

Segundo Rocha (2011) os micronúcleos são o resultado de uma mutação em nível cromossômico e são formados durante o período de divisão celular em consequência de quebras cromossômicas ou de cromossomos inteiros não incorporados ao núcleo e que apresentam relação com agentes mutagênicos. São, portanto, estruturas bem menores que o núcleo principal, podendo medir de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo principal, apresentando material cromatínico contido por envoltório nuclear (SCHMID, 1975; ROCHA, 2011).

No estudo, optou-se pela técnica de micronúcleo em sangue periférico utilizando a coloração de Laranja de Acridina, pois essa apresenta a vantagem de um mesmo animal poder fornecer várias amostras de material, sem a necessidade de sacrifício do mesmo (CSGMT, 1992; OLIVEIRA, 2010). Nessa técnica, o corante se intercala com moléculas de DNA e ao sofrer exposição à radiação ultravioleta emite uma fluorescência de cor amarela. Porém, quando o mesmo se liga ao RNA, sem a capacidade de se intercalar, a fluorescência emitida é vermelha. Essas propriedades permitem a identificação dos reticulócitos, eritrócitos jovens ricos em RNA em nível citoplasmático, que se coram em vermelho pela presença desse ácido nucléico. Já os micronúcleos que possuem DNA em sua constituição coram-se em amarelo e podem ser localizados no meio ou nas bordas das regiões coradas em vermelho (HAYASHI *et al.*, 1990; OLIVEIRA, 2010).

### **2.4.3. Ensaio de Fagocitose Esplênica**

O baço é um órgão linforeticular, dividido em pequenos compartimentos por trabéculas de tecido conjuntivo. Apresenta cor vermelha escura, consistência mole e forma alongada. A arquitetura esplênica e a microcirculação estão intimamente relacionadas com a sua função, pois, o órgão pode ser dividido em duas porções, uma porção denominada polpa vermelha, rica em eritrócitos e outra denominada polpa branca onde se encontram nódulos de tecido linfóide, sendo que na polpa vermelha o sangue é filtrado, enquanto a polpa branca é responsável pela defesa imunológica. Na periferia da polpa branca existe a zona marginal, que possui artérias marginais (DE LIMA PEREIRA et al., 1999; CHADBURN, 2000; MENEZES, 2009).

O baço é o maior órgão linfóide do corpo humano, agindo primordialmente na liberação de linfócitos e monócitos, na fagocitose de partículas estranhas, bactérias, vírus e leucócitos, principalmente em casos de agressão aguda, como nas infecções. Também é considerado um dos principais órgãos do sistema imunológico, visto que células esplênicas capturam antígenos e os apresentam aos linfócitos T e B, que interagem estimulando a geração de plasmócitos secretores de anticorpos (SABA, 1970; MARQUES et al., 2002; MEBIUS; KRAAL, 2005).

Visto a importância do baço nos processos de imunomodulação, o ensaio de fagocitose esplênica proposto por Hayashi et al. (1990) foi realizado para caracterizar os efeitos imunomodulatórios dos compostos em testes.

### **2.4.4 – Ensaio de apoptose**

As características morfológicas e bioquímicas dos processos de morte celular os diferenciam quanto à classificação em: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência (GRIVICICH et al., 2007).

A apoptose é o processo de morte celular programada, autodigestão controlada dos constituintes celulares, devida à ativação de proteases endógenas. Parolin e Reason (2001) descrevem esse processo como um verdadeiro colapso provocado na estrutura celular pela ativação das proteases que comprometem o citoesqueleto celular.

Segundo Grivicich et al. (2007) a apoptose é um processo utilizado por um organismo para remover as células indesejadas ou danificadas. Durante o processo, a célula sofre alterações morfológicas que incluem: a retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos, sendo esses corpos apoptóticos fagocitados por macrófagos e removidos sem causar processo inflamatório.

A identificação e quantificação da apoptose por métodos confiáveis e também reprodutíveis é uma condição essencial na diferenciação da apoptose em grupos sinalizados (MAURO, 2011). No presente estudo, a técnica proposta por Navarro et al. (2014) foi utilizada para identificar células apoptóticas por meio de análise do padrão de fragmentação do DNA nuclear, a partir de coloração com Alaranjado de Acridina.

#### **2.4.5 – Contagem diferencial de células do sangue**

Os principais componentes do sistema imunológico são os leucócitos que podem ser classificados em dois grupos funcionais: os fagócitos (mastócitos, monócitos/ macrófagos, neutrófilos e basófilos) e os linfócitos (células T e B), demonstrados na Figura 4.

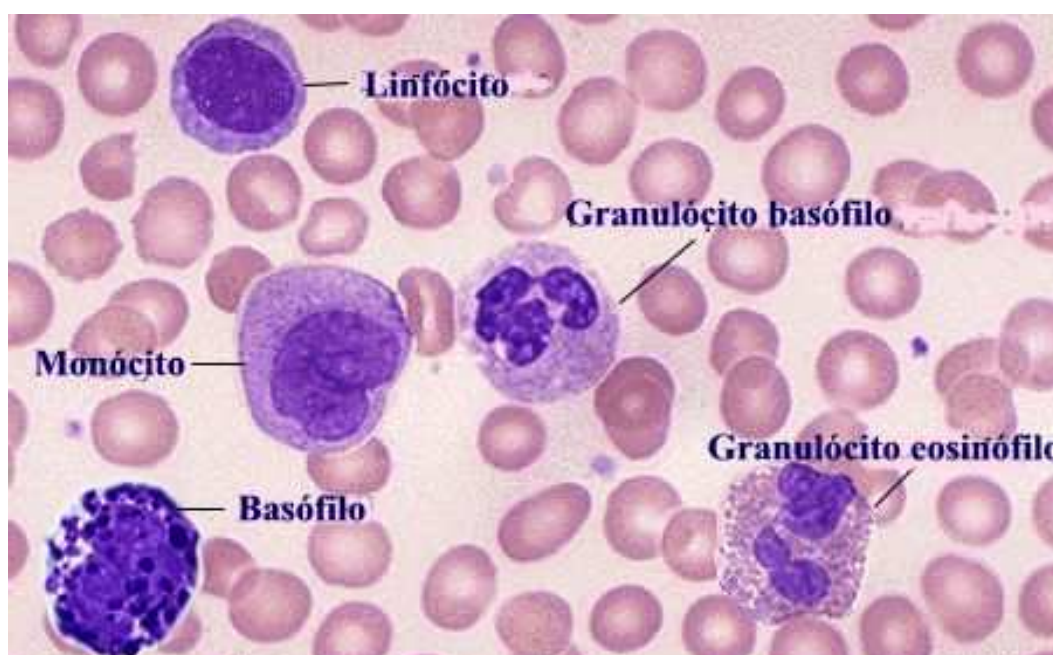


Figura 4 – Figura mostrando a identificação dos leucócitos na contagem diferencial de células. Fonte: Gentox – Laboratório de Genética Toxicológica. Disponível em: gentox.bio.br

Os neutrófilos são as células de defesa mais numerosas e as primeiras a chegar ao local de destino, por exemplo, após uma lesão. Têm a função de realizar a fagocitose, e encontram-se aumentados (neutrofilia) geralmente nos processos infecciosos e inflamatórios, e valores diminuídos indicam neutropenia. Os neutrófilos, em condições normais, são eliminados da corrente sanguínea e do organismo por apoptose (LORENZI et al., 2003; CRUVINEL et al., 2010).

Os eosinófilos são células importantes em doenças imunológicas, processos infecciosos por parasitas como também em reações alérgicas ou de hipersensibilidade. Correspondem a cerca de 2 a 4% dos leucócitos dos esfregaços (HOGAN et al., 2008; CRUVINEL et al., 2010).

Os basófilos são células raras, correspondem menos de 1% do sangue periférico e seu aumento ocorre principalmente em processos infecciosos e imunológicos (KALESNIKOFF; GALLI, 2008), já os linfócitos estão presentes de 20 a 30% na circulação, são produzidos na medula óssea a partir de células-tronco e são diferenciados em linfócitos T e B. Tem como função reconhecer invasores, combater vírus, tumores e produzir anticorpos. Quando aumentados, podem indicar uma infecção viral (KALESNIKOFF; GALLI, 2008).

Os monócitos têm como principal função a defesa do organismo e a fagocitose. Estão presentes em grande número nos processos infecciosos crônicos ou em fase final das infecções visto que se encontram circulantes e posteriormente sofrem diapedese, se tornam macrófagos e fixam-se nos tecidos (LORENZI et al., 2003; CRUVINEL et al., 2010).

#### **2.4.6 – Análise Bioquímica**

A avaliação bioquímica do sangue permite determinar a ocorrência de doenças, avaliar toxicidade, validar drogas e monitorar tratamentos, pois os parâmetros bioquímicos são amplamente utilizados como indicadores do comportamento fisiológico do animal em resposta a alterações endógenas e também como biomarcadores de diagnósticos (MAJEROWICZ, 2005; ARAÚJO, 2012).

Os valores de referência de ensaios bioquímicos em ratos não-tratados são dados de grande valor como ponto de partida para diversos estudos, tais como as avaliações de efeitos farmacológicos e toxicológicos sobre estes parâmetros, pois são capazes de fornecer importantes informações a respeito do estado clínico do

animal, balanço nutricional e situações deficitárias (GONZALEZ et al., 2001; MELO et al., 2012).

Os ensaios bioquímicos avaliam as funções renal, hepática, pancreática e cardíaca, evidenciam alterações no equilíbrio hídrico, eletrolítico e de minerais e também determinam alterações no metabolismo endócrino e da atividade muscular (BERGONSO, 2007; ARAÚJO, 2012). No estudo, os parâmetros analisados foram: Colesterol, Triglicerídeos, Glicemia, Uréia, Creatinina, Sódio, Potássio, Cálcio, Transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e Transaminase glutâmica pirúvica (TGP), Fosfatase alcalina e Gama glutamiltranspeptidase (Gama GT).

#### **2.4.6 – Análise Histológica**

A capacidade de reparação tecidual é fenômeno observado nos seres vivos e de grande importância para sua sobrevivência quando ocorrem lesões acidentais ou cirúrgicas. Logo, a cicatrização dos tecidos constitui-se em um processo biológico complexo essencial para manter a integridade do organismo e apresenta três fases que se sobrepõem, num processo contínuo: fase inflamatória (inicia-se no exato momento da lesão e perdura cerca de três dias), fase proliferativa (inicia-se por volta do terceiro dia após a lesão, perdura por três a quatro semanas) e fase de remodelação (tem início por volta da terceira semana e a remodelação e maturação do colágeno a cerca de um ano). Em um determinado período de tempo as fases coincidem e acontecem simultaneamente, permitindo assim o sucesso da cicatrização (AMORIM, 2006; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Segundo Canesso (2014) o processo de cicatrização por meio da reparação tecidual pode ser descrito resumidamente pelo estágio inicial inflamatório, caracterizado pela ativação de células residentes e pela infiltração de leucócitos, após, segue-se à formação de um tecido fibroproliferativo rico em colágeno e vasos sanguíneos neoformados, assim como a ocorrência de epitelização da região da lesão e por último, a fase de maturação que envolve o remodelamento da derme.

Durante a fase proliferativa, a epitelização tem por objetivo a restituição da pele como uma barreira funcional, onde fatores de crescimento epidérmicos estimulam a proliferação de células do epitélio e os queratinócitos respondem, inicialmente, migrando a partir das bordas livres da ferida e dos folículos pilosos próximos 24 a 36 horas após a lesão, induzindo a contração e a neoepitelização da

ferida, reduzindo a sua superfície até o fechamento do defeito tecidual (ZAGUE et al., 2005; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

No presente estudo valeu-se da análise histológica do retalho cutâneo constituído de cicatriz ou lesão cutânea para avaliação da epitelização em modelo pré-clínico tratados com extratos de *Handroanthus impetiginosus* e *Stryphnodendron adstringens*.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos toxicogenéticos, bioquímicos e na reparação tecidual, bem como analisar o perfil fitoquímico dos extratos de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex. Dc) Mattos (ipê-roxo) e de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão) em modelo pré-clínico.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as atividades genotóxica e mutagênica dos extratos de *Handroanthus impetiginosus* e de *Stryphnodendron adstringens*;
- Avaliar a atividade fagocitária e apoptótica dos extratos de *Handroanthus impetiginosus* e de *Stryphnodendron adstringens* por meio dos ensaios de fagocitose esplênica e de apoptose;
- Analisar a presença de leucócitos de animais tratados com extratos de *Handroanthus impetiginosus* e de *Stryphnodendron adstringens* por meio do ensaio de contagem diferencial de células do sangue;
- Avaliar o perfil bioquímico do sangue de animais tratados com extratos de *Handroanthus impetiginosus* e de *Stryphnodendron adstringens*;
- Avaliar histologicamente os efeitos dos extratos de *Handroanthus impetiginosus* e de *Stryphnodendron adstringens* sobre o processo de reparação tecidual;
- Analisar o perfil químico dos extratos aquosos de *Handroanthus impetiginosus* e de *Stryphnodendron adstringens*.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

##### 4.1. *Materiais vegetais e preparo dos extratos aquosos de Handroanthus impetiginosus (HIWE) e Stryphnodendron adstringens (SAWE)*

As cascas de *Handroanthus impetiginosus* e de *Stryphnodendron adstringens* foram coletadas no Campus da UFMS, município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil (latitude 20° 30'04.46" S e longitude 54°36' 55.80" W). Os espécimes foram identificados pelo Prof. Dr. Flávio Macedo Alves do Laboratório de Botânica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da UFMS, com as exsicatas depositadas no Herbário CGMS da UFMS sob os números 50232 e 50233, respectivamente (Figura 5 e 6).



Figura 5 - Fotografia da montagem das exsicatas de *Handroanthus impetiginosus* e de *Stryphnodendron adstringens*.

Fonte: Arquivos do autor.



 <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL</b> CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE <b>HERBÁRIO CGMS</b> Registro CGMS <b>50232</b>	 <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL</b> CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE <b>HERBÁRIO CGMS</b> Registro CGMS <b>50233</b>
<b>Família:</b> Bignoniaceae <b>Nome científico:</b> <i>Handroanthus impetiginosus</i> Mart. Ex DC <b>Det.:</b> F. Macedo Alves <b>Data det.:</b> 30/VII/2015 <b>Descrição:</b> Árvore. 8,00 m de altura. Flor purpura. Fruto ausente. <b>Obs.:</b> Nome Comum: Ipê-roxo. Imp. Econômica: Medicinal. <b>Formação:</b> Cerrado. <b>Local:</b> Brasil, Mato Grosso do Sul, Campo Grande. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Próxima da Biblioteca. Coordenadas: 20°38'04.48" S; 54°38'55.80" W. Alt.: 433m. <b>Coletores:</b> J.M. Coelho; I.P. Coelho nº. 1. <b>Data col.:</b> 30/VII/2015 <b>Finalidade:</b> Tese de Doutorado - Estudo da Toxicidade dos Extratos de <i>Handroanthus impetiginosus</i> e de <i>Stryphnodendron adstringens</i> em Modelo Experimental.	<b>Família:</b> Leguminosae - Subfamília: Mimosoideae <b>Nome científico:</b> <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville <b>Det.:</b> F. Macedo Alves <b>Data det.:</b> 30/VII/2015 <b>Descrição:</b> Árvore. 2,00 m de altura. Flor ausente. Fruto verde, imaturo. <b>Obs.:</b> Nome Comum: Barbatimão. Imp. Econômica: Medicinal. <b>Formação:</b> Cerrado. <b>Local:</b> Brasil, Mato Grosso do Sul, Campo Grande. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Próxima da Piscina. Coordenadas: 20°38'04.48" S; 54°38'55.80" W. Alt.: 433m. <b>Coletores:</b> J.M. Coelho; I.P. Coelho nº. 2. <b>Data col.:</b> 30/VII/2015 <b>Finalidade:</b> Tese de Doutorado - Estudo da Toxicidade dos Extratos de <i>Handroanthus impetiginosus</i> e de <i>Stryphnodendron adstringens</i> em Modelo Experimental.

Figura 6 - Ficha das exsicatas de *Handroanthus impetiginosus* e de *Stryphnodendron adstringens* depositas no herbário CGMS-UFMS.

Fonte: Arquivos do autor.

Os fragmentos de cascas coletados foram em número de dois, por exemplar vegetal, com 10x30cm cada e com profundidade suficiente para atingir o lenho. Todo o processo para obtenção dos extratos foi realizado no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Mato Grosso do Sul (LACEN) da cidade de Campo Grande, divisão de Bromatologia e Química, setor de Toxicologia. No processo, as plantas foram submetidas, separadamente, à secagem em estufa com circulação forçada de ar, com temperatura de 40°C. Após esse procedimento, foram trituradas e pesadas (COELHO et al., 2010).

Para o preparo dos extratos aquosos de *Handroanthus impetiginosus* (HIWE) e de *Stryphnodendron adstringens* (SAWE), 50g das cascas já trituradas, de cada planta foram, separadamente, extraídos com 500ml de água fervente (LORENE, 2007).

Após a obtenção dos extratos, parte foi utilizado para confeccionar uma pomada de cada um dos extratos (HIWE-O e SAWE-O) e a base para pomada (vaselina sólida) foi utilizada para o grupo controle.

#### **4.2. Preparo das pomadas dos extratos de Handroanthus impetiginosus (HIWE-O) e de Stryphnodendron adstringens (SAWE-O)**

A HIWE-O a 10% foi preparada pela mistura de 60g de pomada base (vaselina sólida) e 6 ml de HIWE e a SAWE-O a 10% foi preparada pela mistura de 60g de pomada base (vaselina sólida) e 6 mL de extrato de SAWE (COELHO et al., 2010). Depois foram conservadas à temperatura ambiente.

#### **4.3. Perfil químico dos extratos aquosos das cascas de Handroanthus impetiginosus(HIWE)e Stryphnodendron adstringens (SAWE) – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

Foram utilizados água tipo I (Milli-Q Synthesis, Millipore, Bedford, MA, USA), acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) grau HPLC da Tedia® (Rio de Janeiro, Brazil).

Cinco miligramas do HIWE e SAWE foram, separadamente, solubilizados em 0,5 mL de solução hidrometanólica (MeOH-H<sub>2</sub>O), aplicados em um cartucho de extração em fase sólida (SPE - Waters, Sep-Pak Classic, C18) e eluídos com 2,0 ml de solução MeOH-H<sub>2</sub>O (85:15 v/v) para a remoção de componentes lipofílicos da amostra (*clean up*). O cartucho SPE foi previamente condicionado [eluição de 5mL de MeOH e depois de 5 mL de MeOH-H<sub>2</sub>O (85:15 v/v)]. As soluções hidrometanólicas resultantes foram, separadamente, filtradas em membrana de PVDF (Fluoreto Polivinidileno) de 0,22µm (Allcrom, São Paulo, Brazil).

Os perfis químicos de HIWE e SAWE foram realizados por meio de separação em coluna de fase reversa em um sistema de UFLC (Shimadzu, Kyoto, Japan), injetor automático Shimadzu Prominence (SIL-20A) e bombas Shimadzu LC-20AT acoplado a um detector SPD-M20A DAD e a um espectrômetro de massas de alta resolução por tempo de voo micrOTOF-Q II (BrukerDaltonics, Germany) com uma fonte de ionização por electrospray (ESI).

As amostras foram detectadas *in line* no detector DAD e então direcionadas para o espectrômetro de massas. O micrOTOF-Q II foi operado nos modos positivo e negativo. Parâmetros do modo positivo: voltagem no spray de 4,5kV, pressão de nebulização, 4 Bar (N<sub>2</sub>); gás secante, N<sub>2</sub> (9,0 l.min<sup>-1</sup>); temperatura do gás secante, 200°C; energia na célula de colisão, 10eV; gás de colisão, N<sub>2</sub>, 45%. Parâmetros do modo negativo: voltagem no spray de 3,5kV; pressão de nebulização, 4 Bar (N<sub>2</sub>); gás

secante, N<sub>2</sub> (9,0 l.min<sup>-1</sup>); temperatura do gás secante, 200°C; energia na célula de colisão, -10eV; gás de colisão, N<sub>2</sub>, 45%.

A razão massa/carga foi calibrada utilizando-se adutos de TFA tanto no modo positivo quanto no negativo. Os espectros de massas foram adquiridos no intervalo de razão massa/carga (m/z) de 120-1300.

As análises foram realizadas pelas injeções, separadamente, de alíquotas de 1 µL dos extratos previamente submetidos ao *clean up* numa coluna RP-18 (Kinetex, 2.6µm, 150x2.1mm, Phenomenex, USA) acoplada a um cartucho Security Guard™ ULTRA para C18 UHPLC, sub-2µm e coluna core-shell com 2.1mm de diâmetro interno (Phenomenex, USA). A temperatura da coluna foi controlada em 50°C e as amostras foram eluídas num fluxo de 0.3 mL.min<sup>-1</sup>. A fase móvel foi preparada com dois solventes: A [1% (v/v) de ácido acético em água Milli-Q] e B [1% (v/v) de ácido acético em acetonitrila]. Para a separação dos analitos foi utilizada uma eluição isocrática de 3% B (0-2 min) seguida por um gradiente linear de 3% para 25% B (2–25 min) e de 25% para 80% B (25-40 min) e mais 8 minutos para lavagem e re-estabilização da coluna.

#### **4.4. Ato Operatório e ensaio pré-clínico**

Foram utilizados 60 ratos Wistar, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). O experimento foi conduzido segundo as normas das diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais e com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMS (Protocolo#273). Esses animais passaram por um período de adaptação de sete dias no Laboratório de Cirurgia Experimental da UFMS. Em seguida os animais foram distribuídos em duplas, em gaiolas de polipropileno recobertas por sepilho, alimentados com ração comercial (Nuvital®) e água filtrada *ad libitum*. Permanecendo à luz natural com temperatura de 22±2°C e umidade de 55%±10 em estante ventilada (ALESCO®).

Os animais foram anestesiados com quetamina na dose de 50mg/Kg de peso corpóreo (p.c.) e xilazina, na dose de 50mg/Kg (p.c.), via intramuscular.

Após a anestesia os animais foram submetidos à coleta de 1ml de sangue por punção do plexo retro-orbital. O sangue sem anticoagulante foi centrifugado a 3.500 rpm durante 10 minutos. O soro separado não heparinizado foi encaminhado para o Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do Hospital Universitário Maria

Aparecida Pedrossian (HUMAP) para dosagem de Colesterol, Triglicerídeos, Glicemia, Uréia, Creatinina, Sódio, Potássio, Cálcio, Transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e Transaminase glutâmica pirúvica (TGP), Fosfatase alcalina.

Em seguida, realizou-se a preparação dos animais para o ato operatório, onde, foram submetidos à epilação da face medial do membro posterior direito e a anti-sepsia da região com solução de álcool iodado a 2%.

Para a confecção da lesão cutânea padronizada, utilizou-se um *punch* metálico de 1,5 cm de diâmetro. Com este instrumento, foi excisado o fragmento cutâneo situado sobre o terço médio e inferior dos músculos sartório e vasto medial, na face medial do membro pélvico direito até a exposição da fáscia muscular (Figura 7 e 8). A hemostasia foi realizada por compressão digital, por dois minutos, utilizando gaze esterilizada.



Figura 7 - Fotografia do *punch* metálico utilizado para excisão do fragmento cutâneo.  
Fonte: Arquivos do autor.



Figura 8 - Fotografia da lesão cutânea confeccionada com punch metálico.  
Fonte: Arquivos do autor.

Os animais receberam tratamento de acordo ao grupo que pertenciam, como descrito a seguir (Figura 9):

Grupo Controle 7 e Grupo Controle 14 – os animais receberam aplicação tópica de 1 g de base de pomada (vaselina sólida), a partir da confecção da ferida, diariamente, por um período de 7 dias (C7) e 14 dias (C14), apenas com contenção manual do animal. A pomada foi aplicada com espátula demarcada e a quantidade suficiente para cobrir totalmente a lesão cutânea.

Grupo HIWE-O 7 e Grupo HIWE-O 14 – os animais receberam aplicação tópica de 1 g da pomada de Ipê-roxo à 10%, a partir da confecção da ferida, diariamente, por um período de 7 dias (HIWE-O 7) e 14 dias (HIWE-O 14), apenas com contenção manual do animal. A pomada foi aplicada com espátula demarcada e a quantidade suficiente para cobrir totalmente a lesão cutânea.

Grupo SAWE-O 7 e Grupo SAWE-O 14 – os animais receberam aplicação tópica de 1g da pomada de Barbatimão, a partir da confecção da ferida, diariamente, por um período de 7 dias (SAWE-O 7) e 14 dias (SAWE-O 14), apenas com contenção manual do animal. A pomada foi aplicada com uma espátula demarcada e a quantidade suficiente para cobrir totalmente a lesão cutânea.

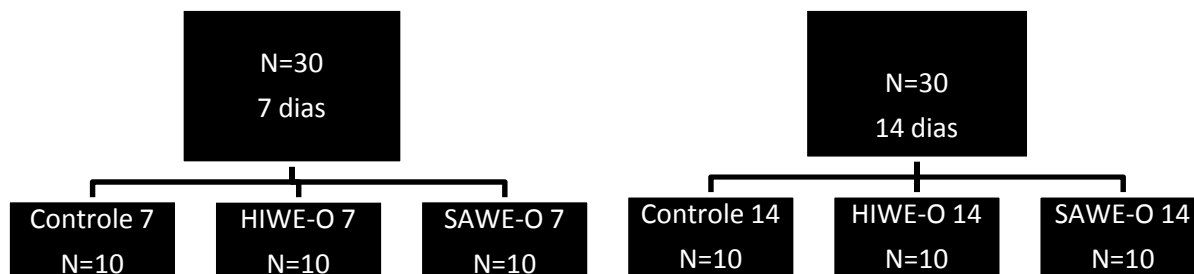


Figura 9 – Delineamento experimental.

A coleta de sangue periférico para os ensaios de toxicogenética foi realizada por meio de punção da veia caudal antes do ato anestésico ao final do período experimental visto que esse pode influenciar em tais ensaios. Imediatamente antes da eutanásia, após anestesia, foi realizado novamente a coleta de 1 ml de sangue por punção do plexo retro-orbital para as análises bioquímica e uma gota foi deslizada do capilar diretamente para uma lâmina de vidro onde fez-se a extensão sanguínea destinada à contagem diferencial de células do sangue (DA SILVA, 2006).

Ainda sob anestesia os animais sofram submetidos à eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>. Em seguida procedeu-se a laparotomia para a coleta dos rins, fígado e baço para os ensaios de fagocitose esplênica e apoptose. Após a coleta os animais foram descartados seguindo as normas e diretrizes do Biotério da UFMS.

#### **4.5. Ensaios Biológicos**

##### **4.5.1. Análise histológica**

Após a eutanásia, a peça cirúrgica constituída de cicatriz ou lesão cutânea, com margem de 1 cm de pele em torno da lesão, com profundidade até a musculatura do animal foi retirada utilizando bisturi com lâmina nº 15 e encaminhada



para processamento histológico. Cada peça foi identificada, fixada em etanol e colocada em solução de formalina a 10%. Foram incluídas em parafina, submetidas a cortes transversais e coradas pelo método de hematoxilina-eosina (H.E).

Na observação de microscopia óptica, foi avaliado a epitelização. Para tal foram atribuídas três graduações pelo método de cruzes: 0 ausente, + parcial e ++ completa, seguindo as instruções de SANTOS et al. (2002), SILVA (2006) e COELHO et al.(2010) e depois representados por escore 0, 1, 2, respectivamente.As lâminas foram analisadas em teste duplo-cego. As fotomicrografias foram feitas em câmera digital Evolution LC (Media Cybernetics, USA) acoplada em microscópio (Olympus<sup>â</sup> BX51, Japan).

#### **4.5.2. Ensaio do Cometa**

Para a realização do ensaio do cometa, seguiu-se o protocolo de Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000), com modificações propostas por Oliveira et al. (2009). Para a montagem das lâminas, depositou 20 $\mu$ L de sangue periférico, com 120 $\mu$ L de agarose LMP (1,5%), a 37°C, em lâmina pré-coberta com agarose normal (5%). A lâmina foi recoberta com lamínula e resfriada a 4°C, por 20 minutos. Após a retirada da lamínula, as lâminas foram imersas em solução de lise por 1 hora. Em seguida, as lâminas foram transferidas para o tampão de eletroforese por 20 minutos, para desnaturação, e procedeu a eletroforese com tampão pH>13,0 à 4°C, por 20 minutos.Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas, secas ao ar livre e fixadas em álcool etílico absoluto por 10 minutos. As lâminas foram coradas com 100 $\mu$ L de Brometo de Etídeo (20 $\mu$ g/mL). O material foi avaliado em microscópio de fluorescência (Bioval®, Modelo L 2000A), no aumento de 40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm.

Foram analisadas visualmente 100 células por animal, classificando-se os cometas em classe 0 – quando não apresentam cauda; classe 1 – quando o nucleóide apresenta cauda menor que o seu diâmetro; classe 2 – quando a cauda tem o tamanho entre 1 e 2 vezes o diâmetro do nucleóide; classe 3 – quando a cauda possui o tamanho maior que 2 vezes o diâmetro do nucleóide (KOBAYASHI et al., 1995). A análise foi realizada em teste duplo-cego

#### **4.5.3. Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico**

Para a avaliação da mutagenicidade, utilizou-se a técnica de micronúcleo em sangue periférico, descrita por Hayashi et al. (1990), com modificações (OLIVEIRA et al., 2009). Para tanto, 20µL de sangue periférico foi depositada em uma lâmina previamente preparada com uma camada de Laranja de Acridina (1,0mg/mL). Cobriu a mesma com uma lamínula e estas permaneceram em freezer (-20°C) por um período mínimo de duas semanas. Foram analisadas 2000 células/animal, em microscópio de fluorescência (Bioval®, Modelo L 2000A), no aumento de 40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm em teste duplo-cego.

#### **4.5.4. Contagem Diferencial de Células do Sangue**

O sangue periférico coletado foi colocado em lâminas limpas e espalhadas com o auxílio de outra lâmina pela técnica de extensão sanguínea. Após este procedimento foram secas ao ar livre e submetidas à coloração rápida pelo *Kit* Panótico desenvolvido pelo laboratório Laborclin® (GURR, 1965, GURR, 1971).

A análise das lâminas foi realizada em microscopia de luz (Bioval®, Modelo L 2000A) em aumento de 100x. Foram analisadas 100 células por animal, em teste duplo-cego e diferenciadas em linfócito, neutrófilo, monócito, eosinófilo e basófilo.

#### **4.5.5. Ensaio de Fagocitose Esplênica**

Um fragmento de aproximadamente 1/3 do tamanho do baço foi macerado em 0,5 mL de solução fisiológica. Cem microlitros da suspensão celular foram colocadas em uma lâmina previamente corada com 20µL de Alaranjado de Acridina (1,0 mg/mL) e recoberta por uma lamínula. As lâminas foram estocadas em freezer (-20° C) até o momento da análise. A análise foi feita em microscópio de fluorescência (Bioval®, Modelo L 2000A) em um aumento de 400x com filtro de 420-490nm e filtro de barreira de 520nm (ISHII et. al., 2011). Foram analisadas 200 células por animal. A ausência ou presença de fagocitose foi baseada na descrição de Hayashi et. al. (1990), em teste duplo-cego.

#### **4.5.6. Ensaio de apoptose**

Para a confecção de um esfregaço, 100µL de uma solução de macerado de fígado ou rim foram utilizados. A lâmina foi fixada em *Carnoy* por 5 minutos. Em seguida a mesma foi submetida a uma bateria de concentrações decrescentes de etanol (95% - 75% - 50% - 25%), seguida de lavagem com Tampão *McIlvaine* por 5 min., coloração com alaranjado de acridina (0,01%, 5 min.) e nova lavagem com o tampão. Foram analisadas 100 células por animal. A identificação das células em apoptose se deu por meio da análise de padrões de fragmentação do DNA, segundo Navarro et. al. (2014).

#### **4.5.7. Análise Bioquímica**

Após a coleta e sedimentação do sangue em geladeira (4°C), o soro foi separado e congelado em *freezer* (-10°C) até a análise. A leitura dos parâmetros bioquímicos foi realizada em analisador automático Roche/Hitache – Cobas 600 (Roche Diagnostics®), com kits específicos segundo recomendações do fabricante.

#### **4.6. Análise Estatística**

Os valores foram expressos em média ± EPM e os dados foram analisados por ANOVA/Tukey por meio do software *GraphPad Prism* (version 3.02; Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). O teste Qui-quadrado foi utilizado para análise histológica (epitelização). O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Perfil químico de *S. adstringens* (SAWE) e *H. Impetiginosus* (HIWE)

O perfil químico de HIWE e SAWE foi obtido pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência por UHPLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS/MS (modos positivo e negativo), os compostos de ambos os extratos apresentaram melhor ionização no modo negativo, sendo este escolhido para caracterização dos extratos. As amostras foram analisadas baseando-se nos seus tempos de retenção, dados espectrais de massas de alta resolução (MS e MS/MS) no modo negativo, dados de UV e comparação dos mesmos com dados da literatura.

A análise do perfil químico de SAWE revelou a presença de oito substâncias principais (**1-8**) as quais foram majoritariamente identificadas como pertencentes às classes das proantocianidinas, prodelfinidinas e prorobinetinidinas. Já o perfil químico de HIWE revelou a presença de quatorze substâncias principais (**1, 9-21**), as quais foram identificadas como pertencentes à classe dos iridoides e fenilpropanoides glicosilados (Figura 10, Tabelas 1 e 2).

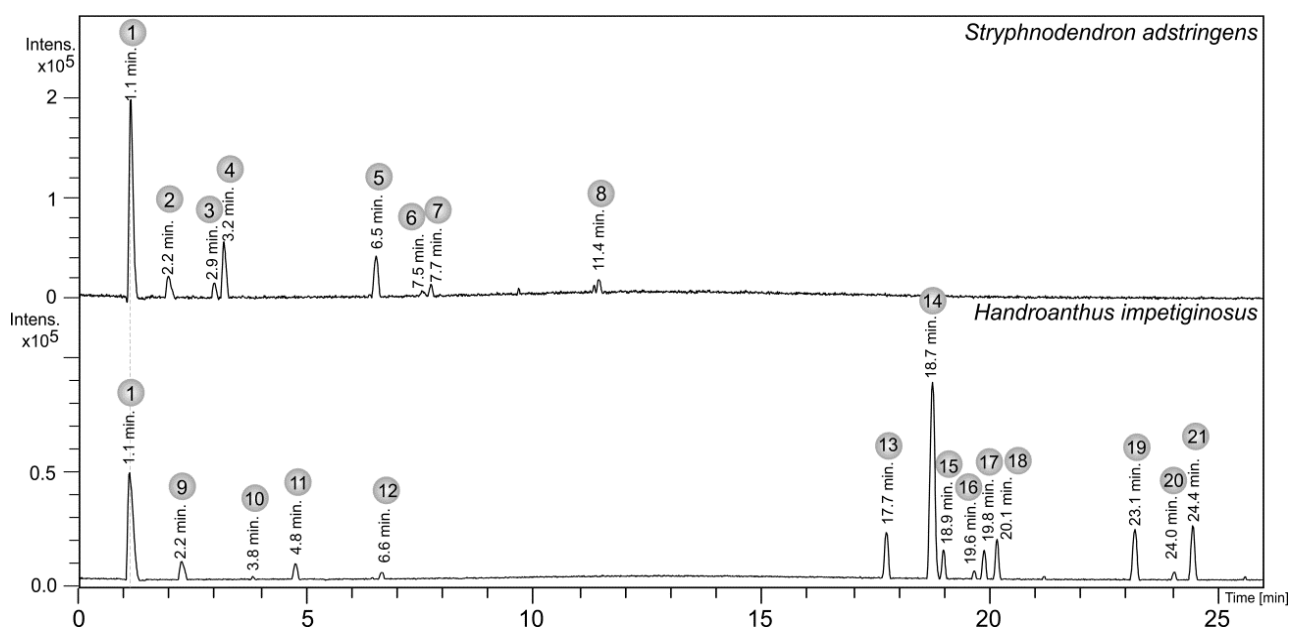


Figura 10- Cromatograma dos extratos de *S. adstringens* e *H. impetiginosus* no modo negativo. Os picos correspondem às substâncias. **Em *S. adstringens***: 1- Dissacarídeo, 2-(Epi)galocatequina, 3-(Epi)galocatequina-(4,8'), 4- Galocatequina,, 5- Epigalocatequina, 6- Prorobinetinidina, 7- Prodelfinidina, 8- Epigalocatequina-3-O-galato. **Em *H. impetiginosus***: 1-Dissacarídeo, 9- Aucubina, 10- Desconhecido, 11- Ajugol, 12- Desconhecido, 13- 6-O-(4-Hidroxibenzoil)-6-epiaucubina, 14- 6-O-p-Hidroxibenzoilajugol, 15-Glicosídeo feniletanóide tipo verbascosídeo, 16-Glicosídeo fenólico, 17-6-O-Vanilloilajugol, 18-Glicosídeo feniletanóide tipo verbascosídeo, 19- Desconhecido, 20- Desconhecido, 21-Acetilverbascosídeo

**Tabela1** – Dados cromatográficos e UV, MS e MS / MS de compostos no extrato aquoso de *S. adstringens*.

Nº	Rt (min)	Composto	Formula molecular [M-H] <sup>-</sup>	Produções	UV (nm)
1	1.1	Dissacarídeo	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> Δ= 4.9ppm	MS: 683.2284 [2M-H] <sup>-</sup> , 341.1104 [M-H] <sup>-</sup> . MS/MS (683.2284, 46.8 eV): 341.1105, 179.0559, 161.0443	-
2	1.9	(Epi)galocatequina-(4,8')-(epi)galocatequina	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>14</sub> Δ= 1.0ppm	MS: 609.1256 [M-H] <sup>-</sup> , 447.0413, 365.0278, 291.9906, 221.0242, 179.0105. MS/MS (609.1256, 46.1 eV): 423.0682, 305.0690, 283.0258, 177.0206.	272
3	2.9	(Epi)galocatequina-(4,8')-(epi)galocatequina	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>14</sub> Δ= 3.0ppm	MS: 609.1268 [M-H] <sup>-</sup> , 291.9882, 221.0240. MS/MS 609.1268, 46.1eV): 423.0737, 355.0874, 305.0684, 283.0252, 255.0295, 219.0628, 177.0198.	272
4	3.2	Galocatequina	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub> Δ= 4.7	MS: 305.0681 [M-H] <sup>-</sup> , 263.0389, 221.0244. MS/MS (305.0681, 35.3 eV): 177.0438, 167.0374, 166.0264, 165.0192	272
5	6.5	Epigalocatequina	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub> Δ= 0.7ppm	MS: 305.0669 [M-H] <sup>-</sup> , 263.0362, 221.0262. MS/MS (305.0681, 35.3 eV): 177.0325, 167.0274, 166, 0232, 165.0192	272
6	7.5	Prorobinetinidina	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>13</sub> Δ= 3.3ppm	MS: 593.1281 [M-H] <sup>-</sup> , 447.0229, 405.0130, 323.0121, 291.9872, 263.0367, 221.0232, 161.0037.	279
7	7.7	Prodelfinidina B-4/ Prodelfinidina B-2 3'-O-galato	C <sub>37</sub> H <sub>29</sub> O <sub>18</sub> Δ= 1.3ppm	MS: 761.1369[M-H] <sup>-</sup> , 593.1336, 405.0205, 263.0354, 221.0239. MS/MS (761.1369, 47.6eV) 423.0743, 305.0649, 269.0411, 243.0330, 177.0185.	274
8	11.4	Epigalocatequina-3-O-galato	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub> Δ= 3.7 ppm	MS: 457.0759 [M-H] <sup>-</sup> , 405.0127, 323.0167, 263.0327, 221.0231, 169.0125. MS/MS (457.0759, 42.9eV): 177.0575, 169.0128, 161.0219	274

**Tabela 2** – Dados cromatográficos e UV, MS e MS / MS de compostos no extrato aquoso de *H. impetiginosus*.

Nº	Rt (min)	Compostos	Formula molecular[M-H] <sup>-</sup>	Produção	UV (nm)
1	1.1	Dissacarídeo	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> Δ= 6.2ppm	MS: 683.2272 [2M-H] <sup>-</sup> , 341.1111 [M-H] <sup>-</sup> . MS/MS (683.2272, 46.8 eV): 341.1096, 179.0571, 161.0422.	-
9	2.2	Aucubina	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub> Δ= 1.9ppm	405.1419 [M+CH <sub>3</sub> COOH-H] <sup>-</sup> , 345.1198 [M-H] <sup>-</sup> , 291.9909, 221.0253, 183.0669. MS/MS (405.1419, 40.3eV): 183.0666, 165.0563.	-
10	3.8	Desconhecido	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub> Δ= 4.4ppm	MS: 299.0786 [M-H] <sup>-</sup> , 263.0394, 232.9892, 221.0263, 179.0223, 161.0036.	257
11	4.8	Ajugol	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> O <sub>9</sub> Δ= 2.5ppm	MS: 407.1561[M+CH <sub>3</sub> COOH-H] <sup>-</sup> , 347.1339[M-H] <sup>-</sup> , 291.9913, 221.0237, 179.0121. MS/MS (407.1541, 40.4 eV): 167.0687.	-
12	6.6	Desconhecido	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> O <sub>13</sub> Δ= -1.5 ppm	MS: 461.1308 [M-H] <sup>-</sup> , 405.0233, 365.0150, 323.0142, 291.9848, 255.2312, 221.0238, 161.0038. MS/MS (461.1308, 43.1 eV): 239.0598, 179.0355.	254
13	17.7	6-O-(4-Hidroxibenzoil)-6-epiaucubina	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> O <sub>11</sub> Δ= 1.6 ppm	MS: 465.1395 [M-H] <sup>-</sup> , 263.0315, 221.0231, 179.0120.	257
14	18.7	6-O-p-Hidroxibenzoilajugol	C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> O <sub>11</sub> Δ= -1.2 ppm	MS: 467.1564 [M-H] <sup>-</sup> . MS/MS (467.1564, 43.4 eV): 305.1030, 288.0971, 287.0978, 261.0793.	257
15	18.9	Glicosídeo feniletanóide tipo verbascosídeo	C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> O <sub>15</sub> Δ= -2.1ppm	MS: 623.1994 [M-H] <sup>-</sup> , 467.1550, 387.0307, 255.2334, 221.0237. MS/MS (623.1994, 46.2 eV): 461.1691, 315.1138, 297.1007, 179.0354, 162.0269, 161.0251.	288, 326
16	19.6	Glicosídeo fenólico	C <sub>26</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub> Δ= -1.6 ppm	MS: 567.1728 [M-H] <sup>-</sup> , 447.0312, 365.1266, 263.0374, 221.0243, 179.0119.	-
17	19.8	6-O-Vanilloilajugol	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>12</sub> Δ= -2.1 ppm	MS: 497.1675 [M-H] <sup>-</sup> , 291.9921, 255.2347, 221.0245. MS/MS	262, 294

				(497.1675, 44.9 eV): 482.1442, 167.0355.	
				MS: 623.1990 [M-H] <sup>-</sup> , 221.0267.	
<b>18</b>	20.1	Glicosídeo feniletanóide tipo verbascosídeo	C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> O <sub>15</sub> Δ= -1.3ppm	MS/MS (623.1990, 46.2 eV): 461.1691, 315.1039, 179.0348, 161.0240.	288 326
				MS: 571.2024 [M-H] <sup>-</sup> , 511.1805, 365.1210, 305.0264, 221.0248, 181.0485. MS/MS (571.2024, 45.7 eV): 181.0505.	262, 294
<b>19</b>	23.1	Desconhecido	C <sub>26</sub> H <sub>35</sub> O <sub>14</sub> Δ= 1.4 ppm		
				MS: 611.1962 [M-H] <sup>-</sup> , 365.1181, 255.2312, 221.0243, 179.0130.	263, 288
<b>20</b>	24.0	Desconhecido	C <sub>28</sub> H <sub>35</sub> O <sub>15</sub> Δ= 3.2 ppm	MS/MS (611.1962, 46.1 eV): 181.0450.	
				MS: 665.2070[M-H] <sup>-</sup> . MS/MS (665.2070, 46.7eV): 503.1743, 461.1647, 315.1069, 161.0226	289, 329
<b>21</b>	24.4	Acetilverbascosídeo	C <sub>31</sub> H <sub>37</sub> O <sub>16</sub> Δ= 3.3 ppm		

## 5.2. Análise macroscópica e histológica

Em relação ao processo de epitelização verificou-se que o uso das pomadas pelo período de 7 dias não aumentou ( $p > 0,05$ ) tal efeito. No entanto, após 14 dias verificou-se aumento ( $p < 0,05$ ) da frequência de epitelização e as linhas de tendência demonstram aumento gradual com a passagem do tempo e uso da pomada. A linha de tendência demonstra ainda que o efeito da pomada de *H. impetiginosus* tem efeito mais precoce que *S. adstringens*. Porém, os efeitos ao final dos tratamentos são idênticos (Figura 12).

Os achados macroscópicos e histológicos mostraram epitelização completa aos 14 dias em todos os animais dos grupos tratados com HIWE-O e SAWE-O, enquanto neste período, apenas 7 animais do grupo controle apresentavam as feridas parcialmente epitelizadas e 2 animais com a ferida totalmente epitelizada (Figura 11 e 12). Não foi observado hemorragias nem presença de secreções purulentas nos animais dos diferentes grupos experimentais.

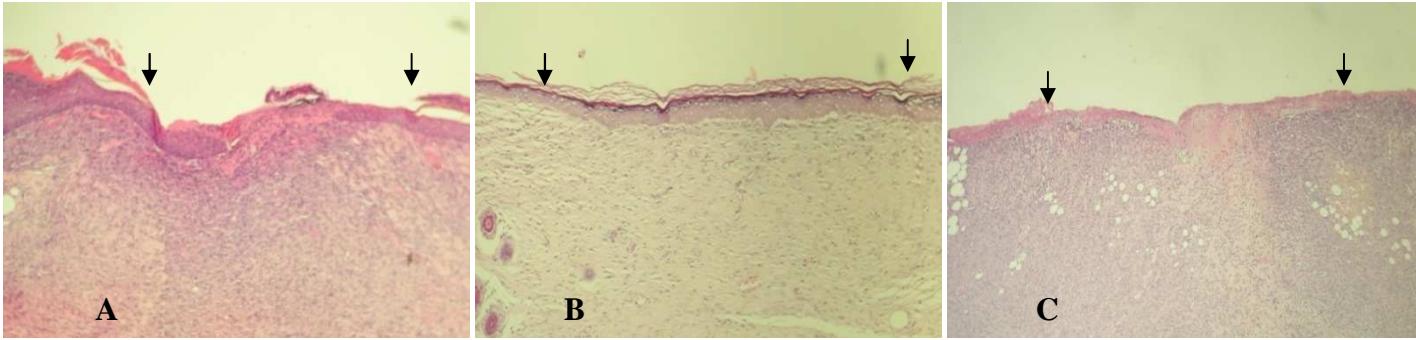


Figura 11- Fotomicrografia no 14º dia de avaliação do processo de reparação tecidual, mostrando epiteliação incompleta (entre as setas) no animal do grupo controle 14 (A), epiteliação completa no animal do grupo HIWE-O 14(B) e grupo SAWE-O 14 (C). Aumento 10x, M.O, coração H.E.

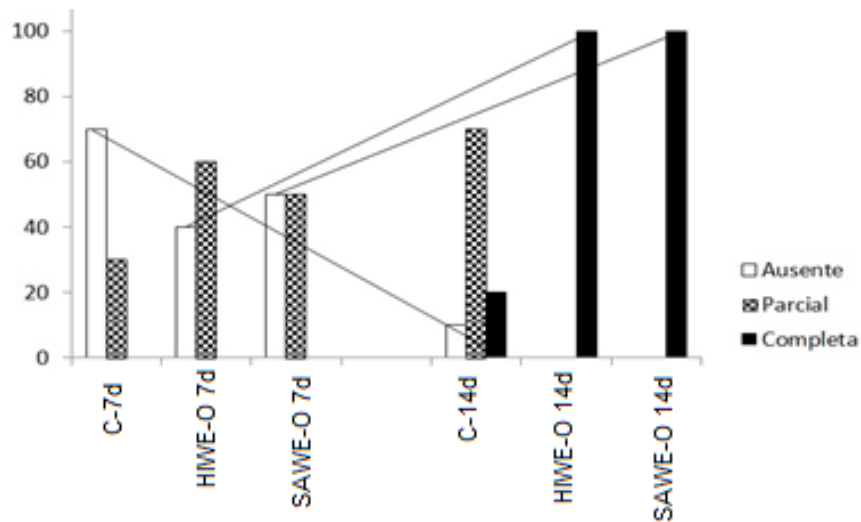


Figura 12 –Porcentagem de animais com ausência de epiteliação, epiteliação parcial ou completa segundo o tratamento tópico com as pomadas a base de *Handroanthus impetiginosus* e *Stryphnodendron adstringens*. Teste: Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ).

### 5.3. Estudos toxicogénicos

A análise toxicogénica indicou que as pomadas HIWE e SAWE quando aplicadas de forma tópica não alteram a frequência de lesões no DNA.

O ensaio do cometa indicou diferença estatisticamente significativa para o grupo HIWE tanto na avaliação em 7 quanto em 14 dias e o aumento da frequência de lesão genômicas foi de 1,18 e 1,20x, respectivamente (Tabela 3). Já ao ensaio do



micronúcleo não demonstrou aumento da frequência de lesões genética em nenhum dos grupos experimentais (Figura 13)

**Tabela 3-** Valores médios  $\pm$  erro padrão da média da frequência de células lesionadas, distribuição entre as classes de danos e escore referentes aos testes de genotoxicidade, em sangue periférico de ratos, das pomadas a base de *Handroanthus impetiginosus* e *Stryphnodendron adstringens*.

Grupos Experimentais	Células lesionadas	Classes de danos				Escore
		0	1	2	3	
<b>7 dias</b>						
Controle	18,0 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	82,0 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	17,8 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	0,20 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	18,2 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>
HIWE-O	21,3 $\pm$ 0,73 <sup>b</sup>	78,7 $\pm$ 0,73 <sup>b</sup>	20,9 $\pm$ 0,82 <sup>b</sup>	0,40 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	21,7 $\pm$ 0,70 <sup>b</sup>
SAWE-O	19,9 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	80,1 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	19,2 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>	0,70 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	20,6 $\pm$ 0,78 <sup>b</sup>
<b>14 dias</b>						
Controle	18,1 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	81,9 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	18,1 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	18,1 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>
HIWE-O	21,8 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>	78,2 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	20,9 $\pm$ 0,60 <sup>b</sup>	0,90 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	22,8 $\pm$ 0,60 <sup>b</sup>
SAWE-O	17,0 $\pm$ 1,97 <sup>a</sup>	73,0 $\pm$ 8,13	16,6 $\pm$ 1,94 <sup>a</sup>	0,40 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	17,0 $\pm$ 21,0 <sup>a</sup>

Legenda: Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Tukey).

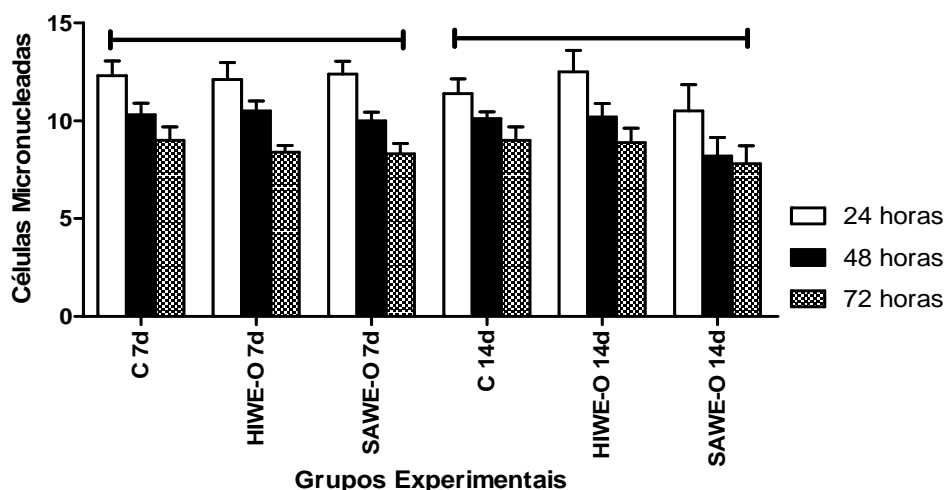


Figura 13 – Ensaio do micronúcleo em animais submetidos ao tratamento tópico com as pomadas a base de *Handroanthus impetiginosus* e *Stryphnodendron adstringens*. Frequência média de células micronucleadas em sangue periférico. A comparação foi realizada entre os diferentes grupos experimentais dentro períodos 7 e 14 dias de utilização das pomadas (F). Teste: ANOVA ( $p < 0,05$ ).

O ensaio de fagocitose esplênica demonstrou que o tratamento com as pomadas aumentou frequência de atividade fagocítica nos dois grupos experimentais, HIWE e SAWE, na avaliação no 7 dias e para o grupo HIWE na avaliação de 14 dias sendo o incremento da ordem de 1,06, 1,04 e 1,08x, respectivamente (Figura 14).

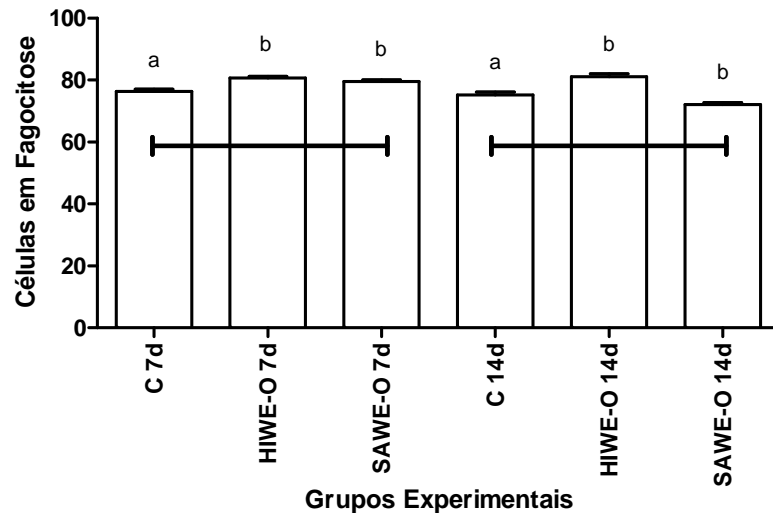


Figura 14 – Fagocitose esplênica em animais submetidos ao tratamento tópico com as pomadas a base de *Handroanthus impetiginosuse* *Stryphnodendron adstringens*. Frequência média de células com evidência de fagocitose esplênica. A comparação foi realizada entre os períodos 7 e 14 dias de utilização das pomadas (F). Teste: ANOVA, Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

A comparação dos diferentes grupos experimentais não demonstrou diferença estatisticamente significativa da média de frequência de células em apoptose no fígado, baço e rins ( $p < 0,05$ ) nos períodos 7 e 14 dias (Figura 15).

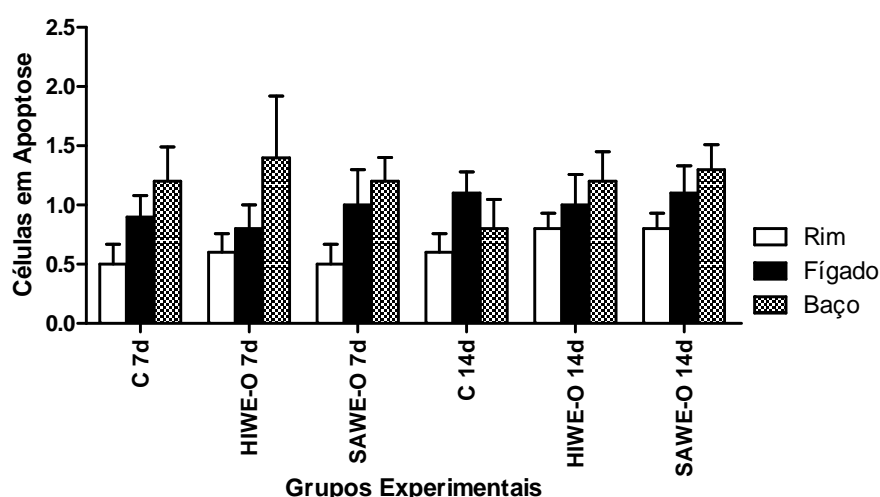


Figura 15 – Frequência média de células em apoptose em rim, fígado e baço de animais submetidos ao tratamento tópico com as pomadas a base de *Handroanthus impetiginosus* e *Stryphnodendron adstringens*. A comparação foi realizada entre grupos experimentais nos períodos de 7 e 14 dias de utilização das pomadas. Teste: ANOVA ( $p < 0,05$ ).

A contagem diferencial de células do sangue não demonstraram nenhuma diferença entre os grupos experimentais. No entanto, os grupos SAWE – 7d, Controle – 14 d, HIWE – 14 d e SAWE – 14 apresentaram linfopenia; os grupos Controle – 7d, HIWE – 7d e todos os grupos avaliados no 14 dia apresentaram basofilia; e todos os grupos avaliados em 7 e 14 dias apresentaram neutrofilia (Tabela 4).

**Tabela 4**– Valores de referência e média  $\pm$  erro padrão da média relativas à contagem diferencial de células do sangue periférico em ratos.

	Tipos Celulares			
	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos	Eosinófilos
Valores de Referência	55-95%	10-40%	0,1-3,5%	0-0,4%
<b>Controle 7dias</b>	53,00 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	45,20 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	0,90 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	0,90 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>
<b>HIWE-O 7 dias</b>	52,20 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	46,20 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	0,80 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	0,80 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>
<b>SAWE-O 7dias</b>	48,80 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup>	48,80 $\pm$ 0,93 <sup>a</sup>	1,00 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	0,40 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>
<b>Controle 14 dias</b>	48,20 $\pm$ 0,93 <sup>a</sup>	49,80 $\pm$ 1,07 <sup>a</sup>	1,50 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	0,50 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
<b>HIWE-O 14 dias</b>	48,50 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	49,90 $\pm$ 0,92 <sup>a</sup>	0,90 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	0,70 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>
<b>SAWE-O 14 dias</b>	44,40 $\pm$ 4,97 <sup>a</sup>	44,30 $\pm$ 4,97 <sup>a</sup>	0,90 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	0,40 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>

Legenda: Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Tukey).

#### 5.4. Estudos bioquímicos

A análise estatística indicou que não há nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais durante o primeiro e o segundo períodos de avaliação, 7 e 14 dias, respectivamente, para todos os parâmetros bioquímicos; exceto para TGO e TGP que aumentaram ( $p>0,05$ ) para ambos os grupos tratados com as pomadas na ordem de 4,83 e 4,74x para TGO e de 3,03 e 3,11x para TGP na primeira avaliação (Tabela 5) e de 3,40 e 4,21x para TGO e de 2,50 e 2,40x para TGP na segunda avaliação (Tabela 6), respectivamente.

**Tabela 5** – Valores médios  $\pm$  erro padrão da média dos parâmetros bioquímicos no período de 7 dias de animais tratados com as pomadas a base de *Handroanthus impetiginosus* e *Stryphnodendron adstringens*.

Parâmetros e Valores de Referência	Valores Pré – teste	Controle	HIWE-O	SAWE-O
		7 dias	7 dias	7 dias
Colesterol Total (55-79 mg/dL)	58,55 $\pm$ 1,56	61,33 $\pm$ 3,81 <sup>a</sup>	54,60 $\pm$ 1,65 <sup>a</sup>	52,67 $\pm$ 3,23 <sup>a</sup>
Colesterol HDL ( $\geq$ 40 mg/dL)	44,2 $\pm$ 2,10	52,88 $\pm$ 3,45 <sup>a</sup>	45,60 $\pm$ 1,54 <sup>a</sup>	43,88 $\pm$ 1,84 <sup>a</sup>
Colesterol VLDL (28-46 mg/dL)	46,26 $\pm$ 2,09	46,17 $\pm$ 2,28 <sup>a</sup>	40,18 $\pm$ 1,45 <sup>a</sup>	42,81 $\pm$ 2,36 <sup>a</sup>
Triglicérides (82-180 mg/dL)	170,11 $\pm$ 15,01	171,11 $\pm$ 15,81 <sup>a</sup>	192,10 $\pm$ 8,48 <sup>a</sup>	169,89 $\pm$ 13,41 <sup>a</sup>
Glicose (70-208 mg/dL)	176,5 $\pm$ 15,81	193,88 $\pm$ 8,45 <sup>a</sup>	200,80 $\pm$ 6,30 <sup>a</sup>	183,89 $\pm$ 15,56 <sup>a</sup>
Sódio (142 – 151 mEq/L)	134,60 $\pm$ 3,87	141,44 $\pm$ 1,93 <sup>a</sup>	137,00 $\pm$ 2,23 <sup>a</sup>	130,78 $\pm$ 2,89 <sup>a</sup>
Potássio (3,8 – 5,5 mmol/L)	4,95 $\pm$ 0,06	4,75 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	4,84 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	4,8 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
Cálcio (5,2- 10,7 mg/dL )	10,14 $\pm$ 0,24	9,53 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	11,09 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	10,47 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>
Uréia (30-57 mg/dL)	56,10 $\pm$ 1,48	52,33 $\pm$ 1,90 <sup>a</sup>	49,00 $\pm$ 3,29 <sup>a</sup>	52,11 $\pm$ 3,29 <sup>a</sup>
Creatinina (0,4 – 0,6 mg/dL)	0,38 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,41 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,38 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
TGO (36-89 U/L)	36,80 $\pm$ 8,33	31,66 $\pm$ 1,92 <sup>a</sup>	152,80 $\pm$ 7,81 <sup>b</sup>	150,22 $\pm$ 14,91 <sup>b</sup>
TGP (18-35 U/L)	18,1 $\pm$ 0,59	18,67 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	56,60 $\pm$ 2,49 <sup>b</sup>	58,11 $\pm$ 4,09 <sup>b</sup>
Fosfatase Alcalina ( 62-230 U/L)	158,80 $\pm$ 9,44	136,00 $\pm$ 16,02 <sup>a</sup>	197,90 $\pm$ 7,21 <sup>a</sup>	158,33 $\pm$ 10,57 <sup>a</sup>

Estatística: Os grupos experimentais foram comparados com os valores de referência (momento antes e após tratamento). Teste: ANOVA/Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ).

**Tabela 6** – Valores médios  $\pm$  erro padrão da média dos parâmetros bioquímicos no período de 14 dias de animais tratados com as pomadas a base de *Handroanthus impetiginosus* e *Stryphnodendron adstringens*.

Parâmetros e Valores de Referência	Valores Pré - teste	Controle	HIWE-O	SAWE-O
		14 dias	14 dias	14 dias
<b>Colesterol Total (55-79 mg/dL)</b>	58,55 $\pm$ 1,56	64,90 $\pm$ 2,92 <sup>a</sup>	56,5 $\pm$ 1,58 <sup>a</sup>	58,70 $\pm$ 2,07 <sup>a</sup>
<b>Colesterol HDL (<math>\geq</math> 40 mg/dL)</b>	44,2 $\pm$ 2,10	51,90 $\pm$ 2,08 <sup>a</sup>	47,00 $\pm$ 1,93 <sup>a</sup>	43,20 $\pm$ 2,25 <sup>a</sup>
<b>Colesterol VLDL (28-46 mg/dL)</b>	46,26 $\pm$ 2,09	44,58 $\pm$ 2,93 <sup>a</sup>	43,10 $\pm$ 2,61 <sup>a</sup>	41,44 $\pm$ 2,00 <sup>a</sup>
<b>Triglicérides (82-180 mg/dL)</b>	170,11 $\pm$ 15,01	186,20 $\pm$ 13,10 <sup>a</sup>	198,8 $\pm$ 13,10 <sup>a</sup>	201,80 $\pm$ 11,53 <sup>a</sup>
<b>Glicose (70-208 mg/dL)</b>	176,5 $\pm$ 15,81	178,55 $\pm$ 13,74 <sup>a</sup>	191,00 $\pm$ 13,52 <sup>a</sup>	184,7 $\pm$ 10,90 <sup>a</sup>
<b>Sódio (142 – 151 mEq/L)</b>	134,60 $\pm$ 3,87	135,00 $\pm$ 3,60 <sup>a</sup>	145,6 $\pm$ 2,00 <sup>a</sup>	144,00 $\pm$ 3,01 <sup>a</sup>
<b>Potássio (3,8 – 5,5 mmol/L)</b>	4,95 $\pm$ 0,06	4,90 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	4,97 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	4,85 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
<b>Cálcio (5,2- 10,7 mg/dL )</b>	10,14 $\pm$ 0,24	10,71 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	9,65 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>	10,01 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>
<b>Uréia (30-57 mg/dL)</b>	56,10 $\pm$ 1,48	51,50 $\pm$ 1,29 <sup>a</sup>	56,4 $\pm$ 1,73 <sup>a</sup>	56,60 $\pm$ 1,72 <sup>a</sup>
<b>Creatinina (0,4 – 0,6 mg/dL)</b>	0,38 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,37 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,37 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
<b>TGO (36-89 U/L)</b>	36,80 $\pm$ 8,33	30,5 $\pm$ 2,20 <sup>a</sup>	103,80 $\pm$ 8,09 <sup>b</sup>	128,90 $\pm$ 11,53 <sup>b</sup>
<b>TGP (18-35 U/L)</b>	18,1 $\pm$ 0,59	18,70 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>	46,70 $\pm$ 2,88 <sup>b</sup>	44,8 $\pm$ 2,43 <sup>b</sup>
<b>Fosfatase Alcalina( 62-230 U/L)</b>	158,80 $\pm$ 9,44	149,00 $\pm$ 10,83 <sup>a</sup>	162,6 $\pm$ 11,23 <sup>a</sup>	164,1 $\pm$ 10,93 <sup>a</sup>

Estatística: Os grupos experimentais foram comparados com os valores de referência (momento antes e após tratamento). Teste: ANOVA/Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Em função dos altos índices de doenças que acometem as populações e aos altos gastos com a saúde, as políticas públicas, em âmbito mundial e nacional, buscam aliar conhecimentos da medicina tradicional e da medicina complementar no intuito de prevenir e tratar doenças também por meio de produtos naturais (BRASIL, 2012).

No Brasil, um dos principais esforços nesse sentido, criou uma lista de plantas medicinais que possuem especial atenção para o uso no Sistema Único de Saúde de forma a garantir o acesso seguro e o uso racional das mesmas e de fitoterápicos de forma sustentável e assim promover de forma crescente a inserção de plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia no SUS em consonância com as diretrizes da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (BRASIL, 2009; BRASIL, 2012).

Dentre as 71 espécies citadas na relação de plantas medicinais do RENISUS estão incluídas o ipê-roxo e o barbatimão (BRASIL, 2012) o que justifica a escolha dessas plantas para a presente pesquisa, visto que essa, é uma continuação do trabalho realizado e publicado por Coelho et al. (2010). Logo, estudos multidisciplinares foram realizados a fim de identificar e compreender a ação terapêutica e/ou possíveis efeitos de toxicidade dos extratos da casca de ipê-roxo e de barbatimão em uso sobre o processo de reparação tecidual.

Uma análise do perfil químico dos extratos de ipê-roxo e de barbatimão foi realizada para identificar as substâncias presentes. A análise indicou dados relevantes para o trabalho, visto que as substâncias encontradas em HIWE e SAWE possuem ação adstringente, antiinflamatória, antiparasitária, antimicrobiana, antineoplásica e antioxidante (MIDDLETON et al., 2000; PAK et al., 2003; SANCHES et al., 2005; ZOCOLER et al., 2009; LOURENÇO, 2010; SENGER; SCHWANKE; GOTTLIEB; 2011; ROMANO, 2015).

As principais substâncias encontradas em SAWE: (Epi) galocatequina, (Epi) galocatequina-(4,8'), Galocatequina, Epigalocatequina, Prorobinetinidina, Prodelfinidina B- 4 e Epigalocatequina-3-O-galato são precursoras de taninos, dados que corroboram com a literatura, onde é descrito a presença de 20 a 30% de taninos na casca de barbatimão (PANIZZA et al., 1988). Essas substâncias presentes em grande quantidade no barbatimão também são encontradas em bebidas e alimentos

com reconhecida ação antioxidante, como o chá verde, vinho, uva e guaraná (JORDÃO, 2000; ALVAREZ, 2007; YAMAGUTI-SASAKI, 2007; SENGER; SCHWANKE; GOTTLIEB; 2011).

O perfil químico de HIWE revelou a presença de quatorze substâncias principais: Aucubina, Ajugol, 6-O-(4-Hidroxibenzoil)-6-epiaucubina, 6-O-p-Hidroxibenzoilajugol, Glicosídeo feniletanóide tipo verbascosídeo, Glicosídeo fenólico, 6-O-Vanilloilajugol, Glicosídeo feniletanóide tipo verbascosídeo, Acetilverbascosídeo, as quais foram identificadas como pertencentes à classe dos iridóides e fenilpropanóides glicosilados, além de alguns dissacarídeos e substâncias desconhecidas. Segundo Lourenço (2010), iridóides apresentam atividades farmacológicas tais como antibacteriana, antiinflamatória, antitumoral e antileishmania mas que os possíveis efeitos terapêuticos também podem estar relacionados à presença de fenilpropanóides glicosilados, para os quais são relatadas uma ampla gama de atividades farmacológicas, dentre elas o efeito antioxidante.

No perfil químico de HIWE não foi identificado a presença de naftoquinonas, como o lapachol e seus derivados. Segundo Fonseca (2003) a extração do lapachol se faz da serragem do cerne de ipê-roxo (*Handroanthus* e *Tabebuia*) com benzeno, ou com acetona, dados importantes para o trabalho visto a alta toxicidade do lapachol já relatada por Araújo (2002) e Costa (2012). No estudo, os extratos utilizados foram aquosos e extraídos da casca do *H. Impetiginosus*, o que sugere uma forma mais segura de utilização do extrato, pois não se extrai o lapachol.

O favorecimento do processo de reparação cutânea observada nos grupos tratados com pomadas de ipê-roxo e de barbatimão se deve em grande parte aos efeitos antiinflamatório, adstringente e antioxidante das substâncias encontradas no perfil químico dos extratos, pois no 14º dia as lesões do grupo HIWE-O 14 e do grupo SAWE-O 14 já estavam totalmente epitelizadas, enquanto o grupo controle demonstrou um atraso na epitelização, o que está de acordo com o estudo anterior realizado por Coelho (2010).

De acordo com Lino et al. (2011), a ação antiinflamatória, antimicrobiana e cicatrizante das plantas está relacionada aos taninos e flavonóides. Segundo Okuda (2005) os prováveis mecanismos responsáveis pela atividade farmacológica dos taninos são a capacidade de formar complexos com outras moléculas incluindo polissacarídeos e proteínas; formar complexos com íons metálicos como o ferro,

mangânês, cobre, alumínio, entre outros, além de exercer a atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres. Na cicatrização de feridas, queimaduras e inflamações agem através da formação de uma camada protetora (complexo taninos/proteínas e/ou polissacarídeos) sobre a pele ou mucosa danificada, ocorrendo o processo natural de cicatrização debaixo dessa camada (HASLAM, 1989; COSTA et al., 2008), podendo assim atribuir em grande parte da ação cicatrizante do barbatimão pela presença de altos teores de taninos na casca.

A ação antioxidante sobre o processo de cicatrização pode estar relacionado com o efeito inibitório dos componentes de HIWE e SAWE sobre a produção de óxido nítrico, pois a inibição da síntese de óxido nítrico é benéfica na medida em que reduz os danos teciduais provocados por esta substância, quando produzida excessivamente (PARK et al., 2003; AWALE et al., 2005). Nos estudos de Silva (2006) e Coelho et al. (2010), os autores também atribuíram o favorecimento na cicatrização de feridas cutâneas à ação antioxidante do *H. impetiginosus*, que inibem a ação deletéria dos radicais livres evitando dano tecidual.

No entanto, essas plantas possuem poucos estudos que garantem o seu uso seguro, fato que levou o presente grupo de pesquisa a avaliar os seus efeitos toxicogenéticos.

O ensaio de genotoxicidade indicou que somente o HIWE causou um discreto aumento da frequência de danos no DNA. Mas, apesar da diferença estatisticamente significativa esse efeito biológico não é preocupante. Reforça essa assertiva o fato de que essas lesões não foram fixadas no DNA visto que o ensaio do micronúcleo não demonstrou aumento de lesão para nenhum dos tratamentos realizados com as pomadas. Logo sugere-se segurança para o uso dos extratos por via tópica segundo o delineamento utilizado.

Outros dois fatos que demonstram e reforçam essa segurança de uso das pomadas são: (I) a baixa frequência de fagocitose esplênica o que sugere que poucas células com lesão de DNA foram retiradas da corrente sanguínea; e (II) a baixa frequência de células em apoptose no fígado e nos rins que sugerem baixa atividade citotóxica em tecidos altamente especializados em metabolismo, biotransformação e excreção de drogas e xenobióticos (TANIGUCHI; GUENGERICH, 2013).

Segundo alguns estudos a fagocitose esplênica decorre da capacidade que o baço possui de prover a filtração do sangue, devido à sua arquitetura reticular e



sua microcirculação, retirando da circulação sanguínea as células que possuem lesão no DNA, as tumorais, os restos celulares, as células infectadas por diferentes patógenos dentre outras. Assim, pode-se inferir que uma alta atividade fagocítica pode subestimar a frequência de micronúcleos circulantes o que poderia inculcar um resultado falso positivo na interpretação de uma ausência de toxicidade. Destaca-se ainda que o aumento da fagocitose esplênica possa correlacionar-se a variações na contagem diferencial de células do sangue uma vez que a potencialização dessa atividade pode associar-se a migração de células da corrente sanguínea para o baço (HAYASHI et al., 1990; ISHII et al., 2011; DAVID et al., 2014; FEDEL-MIYASATO et al., 2014; GONÇALVES et al., 2014; NAVARRO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

Já em relação a apoptose, segundo Navarro et al. (2014) e Oliveira et al. (2015), substâncias sejam elas xenobióticos e/ou drogas quando administradas aos ratos, necessariamente, sofrem metabolização/biotransformação no fígado, pelas enzimas de fase I e II, no intuito de aumentar a sua solubilidade e assim facilitar o processo de excreção pelos rins. Logo, se esses compostos forem tóxicos, ou se seus metabólitos possuírem essa capacidade, durante o processo de biotransformação e excreção, células de fígado e dos rins poderão entrar em morte celular. Frente ao exposto, diante da baixa frequência de apoptose observada nesses dois órgãos infere-se mais uma vez a segurança do uso das pomadas segundo esse delineamento.

Resultados obtidos nesse trabalho demonstram que, mesmo plantas que possam apresentar potencial genotóxico, não representam a concretização de um efeito genotóxico ou mutagênico. Provavelmente a interação entre as substâncias e ou compostos presentes no extrato é fundamental para que esse potencial se expresse concretamente ou não, como foi observado por Santos (2006) que avaliou a mutagenicidade in vivo e in vitro de compostos obtidos de plantas nativas do cerrado, que muitas mesmo apresentando compostos ou ativos isolados com potencial genotóxico, o extrato vegetal mostrou-se negativo aos testes.

As principais substâncias encontradas no perfil químico de SAWE e HIWE, já foram descritas na literatura apresentando uma série de atividades farmacológicas, mas acredita-se que a ação antioxidante possa estar relacionada para a diminuição dos danos oxidativos às macromoléculas biológicas (WONG, 2001). Segundo Auricchio (2007) são bem conhecidas as propriedades como supressores de radicais peróxila dos flavonóides e taninos.

A análise bioquímica também foi realizada no estudo com o intuito de prever a correlação entre os parâmetros bioquímicos com possíveis danos toxicogênicos, pois, segundo Melo et al. (2012) os parâmetros bioquímicos servem como ponto de partida para estudos de efeitos farmacológicos e toxicológicos.

Os valores de referência dos parâmetros bioquímicos analisados seguiram os valores descritos por Bazzano et al. (2015) e Melo et al. (2012), já os valores pré-teste foram obtidos da coleta de sangue realizada antes do início do experimento. Assim, a ausência de variações nos grupos tratados para as dosagens de colesterol totais e frações, triglicérides, glicose, sódio, potássio, cálcio, uréia, creatinina, fosfatase alcalina e Gama GT corroboram mais uma vez para a segurança do uso das pomadas. No entanto, houve aumento significativo das concentrações de TGO e TGP.

Segundo Quaresma (2007), esse aumento não permite inferir que ocorreram alterações bioquímicas significativas de toxicidade, já que inúmeros fatores metabólicos associados às diversas vias existentes nos hepatócitos destes animais podem causar alterações bioquímicas significativas, sem que isto possa ter provocado lesão hepatocelular importante.

Partindo do pressuposto que o tratamento foi em doses repetidas sem alteração da concentração dos extratos, os valores que indicariam possíveis sinais de lesão hepatocelular deveriam ser maiores conforme o tempo de aplicação das pomadas, no entanto, existe a suspeita de que as substâncias presentes em HIWE e SAWE, como os taninos e iridóides, ao ser absorvidas pelo organismo e como o fígado é um órgão importante no processo de metabolização e biotransformação, essas possam ter alterado os níveis de TGO e TGP, sem ter causado lesão hepatocelular significativa visto que os valores no 14º dia de avaliação já foram menores que aos 7 dias, podendo suspeitar que os valores retornariam à normalidade.

Portanto, novos estudos incluindo avaliação histopatológica do fígado para verificar se houve lesão hepatocelular devem ser realizados com os extratos de *Handroanthus impetiginosus* e de *Stryphnodendron adstringens* a fim de esclarecer essas alterações.

## 7. CONCLUSÃO

A análise dos resultados permite inferir que os extratos de *Handroanthus impetiginosus* e de *Stryphnodendron adstringens* apresentaram substâncias com ação adstringentes, antiinflamatórias e antioxidantes o que pode ter contribuído para o favorecimento da reparação tecidual nos grupos HIWE-O e SAWE-O e não apresentaram efeitos genotóxicos e mutagênicos, no modelo experimental estudado.

Na análise bioquímica os grupos HIWE-O e SAWE-O apresentaram aumento dos níveis séricos de TGO e TGP, que devem ser investigados em maiores detalhes de toxicidade em modelo experimental.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA ER, Mello AC, SANTANA CF, SILVA FILHO AA, Santos ER. **The action of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl) 1,4-naphtoquinone (Lapachol) in pregnant rats.** Revista Portuguesa de Farmácia. 38, Nº 3, 21-23. 1988.

ALMEIDA MZ. **Plantas medicinais.** 2ª ed. Salvador, EDUFBA. 2003.

ALVAREZ, J. M. **Tanino: la revolución tecnología. Mito o realidad?** Revista Enología, v. 4, n. 2, p. 34, 2007.

AMORIM, E. et al . **Efeito do uso tópico do extrato aquoso de Orbignya phalerata (babaçu) na cicatrização de feridas cutâneas: estudo controlado em ratos.** Acta Cir. Bras., São Paulo , v. 21, supl. 2, p. 67-76, 2006 .

ANTONIO, G.D. et al. **Fitoterapia na atenção primária à saúde** .Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 541-553, jun. 2014.

ARAUJO, E.L.; ALENCAR, J.R.B.; ROLIM N., Pedro J..**Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica.** Rev. bras. farmacogn., Maringá , v. 12, supl. 1, p. 57-59, 2002.

ARAÚJO, F.T.M. **Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação do perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ - Minas e do Centro de Criação de Animais de Laboratório/FIOCRUZ.** [Dissertação- Mestrado] Belo Horizonte, 2012.

AURICCHIO, MT. et al. **Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de Eugenia uniflora.** Latin American Journal of Pharmacy, v. 26, n. 1, p. 76, 2007.

AWALE S, KAWAKAMI T, TEZUKA Y, UEDA J, TANAKA, KADOTA S. **Nitric oxide (NO) production inhibitory constituents of Tabebuia avellaneda from Brazil** Chem Pharmacol Bull. 2005.

BADKE, M. ROSSATO et al . **Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais.** Texto contexto - enferm., Florianópolis , v. 21, n. 2, p. 363-370, June 2012.

BAZZANO, T et al. Renal biomarkers of male and female Wistar rats (Rattus norvegicus) undergoing renal ischemia and reperfusion. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo , v. 30, n. 4, p. 277-288, Apr. 2015.

BERGONSO, T.H.D. **Valores bioquímicos referenciais de javali (*Sus scrofa scrofa*, Linnaeus, 1758), confinados em fazendas do estado de São Paulo** [dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista; 2007.

BRASIL. Ministério da saúde. ANVISA. <[http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/saude\\_brasil\\_junho\\_2006.pdf](http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/saude_brasil_junho_2006.pdf)>  
BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms\\_relacao\\_plantas\\_medicinais\\_sus\\_0603.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf)>. 2009. Acesso em 07/10/2015.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consolidado de Normas da COFID**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 05/03/ 2014. [ Links ]

BRASIL. Ministério da Saúde: **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.<<http://www.saude.gov/>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/11/sus-tem-fitoterapicos-para-doencas-simples>>. Acesso em: 06/10/2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monografia da espécie *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão)**. Brasília, 2014.

BRIANEZI, G; CAMARGO, J. L. e MIOT, H. A. **Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata.***J. Bras. Patol. Med. Lab.* [online]. 2009.

CANESSO, M.C.C. **Avaliação da cicatrização de feridas cutâneas em animais isentos de microbiota comensal**. bibliotecadigital.ufmg.br. Belo Horizonte, 2014.

CARREGARRO, A. B.; CASTRO, M. B.; MARTINS, F. S. **Acute inflammatory action of tiopental intraperitoneal in rats**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 57, n. 2, p. 191-195, 2005.

CARVALHO, A. C. B.; et al. **Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos**. Revista de T & C Amazônia, Manaus, v. 5, n. 11, p. 26-32, 2007.

CARVALHO, A.C.B; SILVEIRA, D. **Drogas vegetais: a antiga nova forma de utilização de plantas medicinais**. Brasília Médica, v.47, n.2, p. 219-37, 2010.

CAVALCANTI, B.C. et al . **Potent antileukemic action of naphthoquinoidal compounds: evidence for an intrinsic death mechanism based on oxidative stress and inhibition of DNA repair**. J. Braz. Chem. Soc., São Paulo, v. 24, n.

1, p. 145-163, Jan. 2013.

CHADBURN A. **The spleen: anatomy and anatomical function.** Semin Hematol. 37:13-2. 2000.

COELHO J.M *et al* . **O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos.** Rev. Col. Bras. Cir., Rio de Janeiro,v. 37, n. 1, fev. 2010.

COSTA, C.T.C et al. **Taninos e sua utilização em pequenos ruminantes.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. Botucatu, v. 10, n. 4, p. 108-116, 2008.

COSTA, J.P.R et al. **Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e do extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite.** Biotemas, v. 24, n. 4, p. 1-6, 2011.

COSTA, A.M. **Estudo do mecanismo de ação citotóxica de naftoquinonas sintéticas análogas do lapachol.** [Dissertação] Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2012.

COUTINHO H, PINTO DS, RIBEIRO JE, FRIEDMAN H. **Ação antiedematosa do Stryphnodendron barbadetiman (Barbatimão) a 1% em comparação a clorexidina a 0,12%.** Rev odonto cienc. 2004.

CRUVINEL, W. M et al. **Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.** Rev. Bras. Reumatol., São Paulo , v. 50, n. 4, p. 434-447, Aug. 2010.

CSGMT (Collaborative Study Group for the Micronucleus Test). **Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.** MMS. Mutation Res., v. 278, p. 83- 98, 1992.

DA SILVA, A S; DOYLE, R L; MONTEIRO, SG. **Método de contenção e confecção de esfregaço sanguíneo para pesquisa de hemoparasitas em ratos e camundongos.** Revista da FZVA, v. 13, n. 2, 2006.

DA SILVA, A.M.L. et al. **Anatomia foliar com implicações taxonômicas em espécies de ipês.** 2009.

DAVID, N.; MAURO, M.O.; GONÇALVES, C.A.; PESARINI, J.R.; STRAPASSON, R.L.B.; KASSUYA, C.A.L.; STEFANELLO, M.É.A.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; OLIVEIRA, R.J. **Gochnatia polymorpha ssp. floccosa: Bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy.** Journal of Ethnopharmacology , v. 154, p. 370-379, 2014.

DA SILVA, A.M.P. et al. **Atividade Biológica de Naftoquinonas de Espécies de Bignoniaceae.** Revista Fitos Eletrônica, v. 7, n. 04, 2013.

DE LIMA PEREIRA, S.A.et al. **O peso do baço em chagásicos crônicos**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 32, n. 2, p. 167-170, 1999.

EURIDES, D.; FRANCO, L. G.; MOURA, M. I.; CAMPOS, S. B. S.; FREITAS, S. L. R. *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville. In: SILVA, L. A. F.; Eurides, D.;Paula, J. R.; Lima, C. R. O.; Moura, M. I. **Manual do barbatimão**. Goiânia:Kelps, 2010.

EURIDES, D. et al. **Morfologia e Morfometria da Reparação Tecidual de Feridas Cutâneas de Camundongos Tratadas com Solução Aquosa de Barbatimão**. Rev. Fac. Zootec. Vet . Agro. Uruguaiana, v. 2/3, n. 1, p. 37-42 jan./dez. 1995/1996.

FEDEL-MIYASATO, L.E.S. ; FORMAGIO, A.S.N. ; AUHAREK, S.A. ; KASSUYA, C.A.L. ; NAVARRO, S.D. ; CUNHA-LAURA, A.L. ; MONREAL, A.C.D. ; VIEIRA, M.C. ; OLIVEIRA, R.J. **Antigenotoxic and antimutagenic effects of Schinus terebinthifolius Raddi in Allium cepa and Swiss mice: A comparative study**. Genetics and Molecular Research , v. 13, p. 3411-3425, 2014.

FELFILI JM, SILVA JÚNIOR MC, DIAS BJ, REZENDE AV. **Estudo fenológico de Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville no cerrado sensu stricto da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil**. Revista Brasileira Botânica, São Paulo. v.22, n.1, p.83-90. 1999.

FENNEL, C.W. et al. **Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices**. Journal of Ethnopharmacology, v.95, n.2-3, p.113- 121, 2004.

FENECH M.; MORLEY A.A. **Measurement of micronuclei in lymphocytes**. Mutat. Res., Amsterdam, v.147,n.1-2 p.29-36, 1985.

FENECH, M. **The Human Micronucleus Project – International collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans**.Mutat. Res, Amsterdam, v.428,n.1-2, p.271-83, 1999.

FERREIRA, S. B.; et al. **Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato hidroalcoólico de Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville sobre isolados ambulatoriais de Staphylococcus aureus**. Revista Brasileira de Análises Clínicas, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, p. 27-31, 2010.

FIGUEIREDO, C.A.; GURGEL, I.D.G.; GRGEL JUNIOR, G.D. **A implantação da Fitoterapia no SUS: uma avaliação à luz do arcabouço normativo**. In: Oliveira, M.H.B. et al. (Orgs.). Direito e saúde : cidadania e ética na construção de sujeitos sanitários. Maceió: EdUFAL, 2011.

FONSECA,S.G.C, BRAGA, R.M.C & SANTANA, D.P. **Lapachol química, farmacologia e métodos de dosagem**. Rev Bras Farm. 2003.

GARCEZ FR et al. **Novos constituintes químicos das cascas do caule de Tabebuia heptaphylla**. Quím Nova. São Paulo, v. 30, n. 8. 2007.

GONÇALVES, C.A. ; SILVA, N.L. ; MAURO, M.O. ; DAVID, N. ; CUNHA-LAURA, A.L. ; AUHAREK, S.A. ; MONREAL, A.C.D. ; VIEIRA, M.C. ; SILVA, D.B. ; SANTOS, F.J.L; SIQUEIRA, J.M. ; OLIVEIRA, R.J. . **Evaluation of mutagenic, teratogenic, and immunomodulatory effects of *Annona nutans* hydromethanolic fraction on pregnant mice.** Genetics and Molecular Research , v. 13, p. 4392-4405, 2014.

GONZÁLEZ FHD, CARVALHO V, MOLLER VA, DUARTE FR. **Perfil bioquímico sangüíneo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.** Arq Fac Vet UFRGS. 2001.

GRIVICH, I. et al. **Morte celular por apoptose.** Rev Bras Cancerol, v. 53, n. 3, p. 335-43, 2007.

GROSE, S. O.; OLMSTEAD, R. G. **Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* sl (Bignoniaceae).** Systematic Botany, v. 32, n. 3, p. 660-670, 2007.

GUARIM NETO, G. **Plantas utilizadas na medicina popular do Estado de Mato Grosso.** Brasília: CNPq/UFMT, 1987.

GUIRAUD P, STEIMAN R, CAMPOS-TAKAKI G-M, SEIGLE-MURANDI F, BUOCHBERG MS. **Comparison of antibacterial and antifungal activities of Lapachol and b-Lapachone.** Planta Medica. 1994.

HASLAM, E. **Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action.** Journal of Natural Products, v.59, n.2, p.205-15, 1996.

HAYASHI, M.; et al. **The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides.** Mutat. Res., v. 245, p. 245-249, 1990.

HERNANDES, L.; PEREIRA, L. M. S.; PALAZZO, F.; MELLO, J. C. P. **Wound healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 431- 436, 2010.

HIGA RA, AYDOS RD, SILVA IS, RAMALHO RT, SOUZA AS. **Study of the antineoplastic action of *Tabebuia avellaneda* in carcinogenesis induced by azoxymethane in mice.** Acta Cir Bras. 2011.

HOGAN SP, ROSENBERG HF, MOGBEL R, Phipps S, FOSTER PS, Lacy P et al. **Eosinophils: biological properties and role in health and disease.** Clin Exp Allergy 2008.

HOLLANDA, N. **The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps.** Mutat. Res., Amsterdam, v.659, n.1-2, p.93-108, 2008.



ISHII P.L., Prado C.K., Mauro M.O., Carreira C.M., Mantovani M.S., Ribeiro L.R., Dichi J.B., Oliveira R.J. **Evaluation of *Agaricus blazei* *in vivo* for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities.** Regul. Toxicol. Pharmacol. v.59, p.412–422, 2011.

JORDÃO, A.M. **Estrutura e composição das proantocianidinas da uva.** Evolução ao longo da maturação. 2000.

JORGE, F.C et al. **Aplicações para as cascas de árvores e para os extractos taninosos:** uma revisão. 2001.

KALENIKOFF J, GALLI SJ. **New developments in mast cell biology.** Nat Immunol 2008.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. **A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay.** MMS Communications, v. 2, p. 103-115, 1995.

LIMA, C. R. O.; SOUZA, L. A.; HELOU, J. B.; ALMEIDA e SILVA, J.; CAETANO, L. B. **Caracterização dos metabólitos secundários do barbatimão.** In: SILVA, L. A. F.; EURIDES, D.; PAULA, J. R.; LIMA, C. R. O.; MOURA, M. I. Manual do barbatimão. Goiânia: Kelps, 2010.

LIMA O.G, D'Albuquerque IL, LIMA CG, MaiaMHD. **Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XX. Atividade antimicrobiana de alguns derivados do Lapachol em comparação com a xiloidona, nova ortonaftoquinona natural isolada de extratos do cerne do “Pau d’arco” rôxo,** *Tabebuia avellaneda* Lor . Ex Griseb. Revista do Instituto de Antibióticos. 1962.

LIMA, A.R.A et al . **Actions of women farmers in family care: use of medicinal plants in Southern Brazil.** Texto contexto - enferm., Florianópolis , v. 23, n. 2, p. 365-372, June 2014 .

LIMA, L.O.; GOMES, E.C. **Alimento ou medicamento?: Espécies vegetais frente à legislação brasileira.** Rev. bras. plantas med., Botucatu , v. 16, n. 3, supl. 1, p. 771-782, 2014 .

LINO, P. B. et al. **Evaluation of post-surgical healing in rats using a topical preparation based on extract of *Musa sapientum* epicarp.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 21, n. 3, p. 491-496, maio/jun. 2011.

LOPES, J.N.; CRUZ, F .S.; DOCAMPO, R; VASCONCELOS, M.E.; SAMPAIO, M.C.R.; PINTO, A.V.; GILBERT, B. **In vitro and in vivo evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*.** Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 1978.

LORENE, É. M. **Atividade alelopática de extratos foliares e periderme (casca) de *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) na germinação e desenvolvimento**

**inicial de *cucumis sativus* (pepino).**UEMS-Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Coxim, 2007.

LORENZI H. **Árvores brasileiras manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas no Brasil.** Nova Odessa. Plantarum, 1992.

LORENZI H, MATOS FJA. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum;. p.93-94. 2002.

LORENZI TF et al – **Manual de Hematologia.** Propedêutica e clínica. 3ª edição, Editora Médica Científica, São Paulo, 2003.

LOURENÇO, J. A. et al. **Ausência de mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato obtido das flores do ipê roxo [*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.].** Rev Bras Plantas Med, v. 12, n. 4, p. 414-420, 2010.

LUBECK W. **O poder terapêutico do ipê-roxo.**São Paulo: Madras, 2001.

LUCENA, M. N.; MENDES, M. M.; BRANDEBURGO, I. H.; **Avaliação da estabilidade da pomada à base de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Conville e a sua eficácia na neutralização dos efeitos locais induzidos pela peçonha de *Bothrops pauloensis*.** Revista Horizonte Científico, v. 3, n. 1, p. 1-29, 2009.

MAIA-SILVA C, DA SILVA CI, HRNCIR M, DE QUEIROZ RT, IMPERATRIZ-FONSECA VL. **Guia de Plantas Visitadas por Abelhas na Caatinga.** Fundação Brasil Cidadão; Fortaleza-CE, Brazil. 194, 2012.

MAJEROWICZ J. **Procedimentos de biossegurança para as novas instalações do laboratório de experimentação animal (LAEAN) de Biomanguinhos [Dissertação].** Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2005.

MARQUES RG, et al. **"Importância da preservação de tecido esplênico para a fagocitose bacteriana."** *Acta cir. bras* 17.6: 388-393.2002.

MARTINS PS, ALVES ALG. **Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização e pele em eqüinos.** Archives of Veterinary Science.; v. 8, n. 2, p. 1-7.2003.

MAURO, M.O.; SARTORI, D.; OLIVEIRA, R.J.; ISHII, P.L.; MANTOVANI, M.S.; RIBEIRO, L.R. **Activity of selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells.** Mutat.Res. v.715, p. 7–12, 2011.

MELBIUS, R.E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, p. 606-616, 2005.

MELO JO et al. **Effect of Stryphnodendron adstringens (barbatimão) bark on animal models of nociception.** Rev Bras Cienc Farm. São Paulo. 2007.

MELO, J. G et al . **Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (Aesculus hippocastanum L.), capim-limão (Cymbopogon citratus (DC.) Stapf ) e centela (Centella asiatica (L.) Urban).** Acta Bot. Bras., São Paulo , v. 21, n. 1, p. 27-36, Mar. 2007 .

MELO MGD, DÓRIA GAA, SERAFINI MR, ARAÚJO AAS. **Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (Rattus norvegicus linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe.** Scientia Plena 2012.

MENEZES, M.P.F. **"Autotransplante do baço: revisão da literatura."** Universidade da Beira Interior. [Dissertação- Mestrado] Covilhã, Portugal. 2009.

MIDDLETON, E., KANDASWAMI, C., THEOHARIDES, T.C. **The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer.** Pharmacol. Rev. 52, 673-751, 2000.

MONTANARI C.A, BOLZANI V.S. **Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais.** Química. Nova. 2001.

MONTEIRO, J.M. et al. **Taninos: uma abordagem da química à ecologia.** Química Nova, v. 28, n. 5, p. 892, 2005.

MOTTA VT. **Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações.** 4ed. São Paulo: Robe, 2003.

MULLER-HARVEY, I. **Analysis of hydrolysable tannins.** Animal feed science and technology, v. 91, n. 1, p. 3-20, 2001.

NAVARRO, S.D.; BEATRIZ, A.; MEZA, A.; PESARINI, J.R.; GOMES, R.S.; KARAZIACK, C.B.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; ROMÃO, W.; JÚNIOR, V.L. MAURO, M.O.; OLIVEIRA, R.J. **A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H isobenzofuran-1-one: Evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide.** European Journal of Medicinal Chemistry. v.75, p.132-142, 2014.

OLIVEIRA, P.R. **Avaliação dos efeitos do fipronil (ingrediente ativo do FRONTLINE®) nos ovários de carrapatos Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) e no sangue periférico de roedores /** Patrícia Rosa de Oliveira. – Rio Claro, 2010.

OLIVEIRA, R.J.; SALLES, M.J.; DA SILVA, A.F.; KANNO, T.Y.N.; LOURENÇO, A.C.S.; FREIRIA, G.A.; MATIAZI, H.J.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S. **Effects of the polysaccharide  $\beta$ -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice.** Regul. Toxicol. Pharmacol. v.53, p.164–173, 2009.

OLIVEIRA, R.J. **Os compostos 6-dimetilaminopurina e ciclohexamida são genotóxicos, mutagênicos, alteram o desempenho reprodutivo e a expressão dos genes TP53, CASP9 e CCNA em sistemas testes de mamíferos.** [Tese – Doutorado]. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, 2009.

OLIVEIRA, R. J. ; NAVARRO, S.D. ; DE LIMA, D. P.; MEZA, A. ; PESARINI, J. R.; DA SILVA GOMES, R.; KARAZIACK, C.B. ; MAURO, M.O ; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A. C.D. ; ROMÃO, W. ; JÚNIOR, V. L.; BEATRIZ, A.. **A novel cytosporone 3-Heptyl-4,6-dihydroxy-3H-isobenzofuran-1-one: synthesis; toxicological, apoptotic and immunomodulatory properties; and potentiation of mutagenic damage.** BMC Cancer (Online), v. 15, p. 1-15, 2015.

OLMSTEAD, R.G.; GROSE, S.O. **Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* s. 1.(Bignoniaceae).** Systematic Botany 32: 660-670, 2007.

OMS – Organización Mundial de la Salud, **Situación reglamentaria de los medicamentos herbarios.** Reseña Mundial, 2000.

PANIZZA S. **Plantas que curam.** 24ªed. São Paulo: IBRASA; 1997. p.126-127.

PANIZZA S, ROCHA AB, GECCHI R, SOUZA E, SILVA RAP. **Stryphnodendron barbadetiman (vellozo) martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante.** Revista de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v. 10, p. 101-106, 1988.

PARK BS, LEE KG, SHIBAMOTO T, LEE SE, TAKEOKA GR. **Antioxidant activity and characterization of volatile constituents of *Tabebuia impetiginosa*.** J. Agri. Food Chem., v. 51, p.295-300, 2003.

PAROLIN, MB; REASON, IJM. **Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares.** Arq. Gastroenterol., São Paulo , v. 38, n. 2, p. 138-144, abr. 2001 .

PASTORI, T. et al. **Genotoxic and antiproliferative action of *Polygonum punctatum* Elliott (Polygonaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L.** Revista Brasileira de plantas Medicinais, v. 17, n. 2, p. 186-194, 2015.

QUARESMA, A. B. et al. **Estudo histológico do fígado e bioquímico do sangue de ratos após ligadura do ducto hepático direito.** Acta Cirúrgica Brasileira, v. 22, n. 1, p. 68-78, 2007.

ROCHA, R.S. **Avaliação do uso do teste de micronúcleo em células esfoliadas como biomarcador para o desenvolvimento do câncer oral em usuários de bebidas alcoólicas e anti-sépticos bucais [Dissertação de Mestrado].** Universidade Estadual de Feira de Santana. Bahia, 2011.

RODRIGUES, R.O et al. **Ensaio do micronúcleo como indicador de genotoxicidade em indivíduos com albinismo e histórico prévio de câncer de pele.** Revista de Ciências Médicas e Biológicas, v. 12, n. 2, p. 194-197, 2013.

ROMANO, L.H. **Bioprospecção de Microrganismos Endofíticos Isolados de *Tabebuia* spp. e *Hymenaea courbaril* e Identificação da Produção de Metabólitos de Interesse Biotecnológico.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), São Carlos, 2015.

SABA TM. **Physiology and physiopathology of the reticuloendothelial system.** Arch Intern Med 1970.

SANTOS A.F, FERRAZ P.A.L. PINTO A.V, PINTO F.R, GOULART M.O.F, SANT'ANA A.E.G. **Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatides.** Int. J. Parasitol. 2002.

SANTOS, F. V. **Avaliação da mutagenicidade *in vivo* e *in vitro* de compostos obtidos de plantas nativas do cerrado.** Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara. 2006.

SANCHES, A.C.C., LOPES, G.C., NAKAMURA, C.V., DIAS FILHO, B.P., MELLO, J.C.P.d. **Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth.** Rev. Bras. Cienc. Farm. 41, 101-107, 2005.

SCHMID, W. **The micronucleus test.** Mutat. Res. 31: 9-15.1975.

SENGER, A.E; SCHWANKE, C.H; GOTTLIEB, Maria Gabriela. **Green tea (*Camellia sinensis*) and its functionals properties on transmissible chronic diseases [Abstract in English].** Scientia Medica, v. 20, n. 4, p. 292-300, 2011.

SESTER, E.A. **Avaliação Biofarmacêutica do Lapachol Tópico: ensaios *in vitro* e *in vivo*.** [Dissertação-mestrado] Ciências farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFPE-Recife, Brasil, p-gs 30-50,1996.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.** Exper. Cell Res., v.175, p.184-191, 1988.

SILVA MN, FERREIRA VF, SOUZA MCBV. **Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados.** Quím. Nova, São Paulo. 2003.

SILVA DT. **O uso do Ipê-Roxo (*Tabebuia vellanedae*) na cicatrização de feridas catâneas em ratos.** [Dissertação-Mestrado]. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

SOARES S.P. **Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Stryphnodendron adstringens* sobre microorganismos da cárie dental.** Rev. odonto ciênc. 2008.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, 2005.

SOUZA T.M et al. **Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato**. Rev bras farmacogn. João Pessoa. 2007.

TANIGUCHI, C.; GUENGERICH, P. (s/a) - **Metabolismo dos fármacos**. Universidade Federal do Piauí, S/A. Acedido a 05 de Junho de 2013.

TAZIMA M.F.G.S, VICENTE Y.A.M.V.A, MORIYA T: **Biologia da ferida e cicatrização**. Medicina (Ribeirão Preto) 2008.

TICE, R. R. **The single cell gel/ Comet assay: a microgel eletrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells**. In: PHILLIPS, D. H. E.; VENITT, S. Environmental Mutagenesis. Oxford: Bios Scientific Publishers. p.315-339, 1995.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. **Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing**. Environ. Mol. Mutagen., v. 35, p. 206-221, 2000.

TUCKER J.D; PRESTON R.J. **Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment**. Mutat Res 365:147–159, 1996.

VEIGA-JUNIOR, V.F. **Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população**. Rev Bras Farmacogn 18: 308-313, 2008.

VIEIRA, A.; GUIMARÃES, M.A.; DAVID, G.Q.; KARSBURG, I.V.; Campos, A.R. **Efeito genotóxico da infusão de capítulos florais de camomila**. Revista Trópica. Ciências Agrárias e Biológicas, v. 3, n. 1, 2009.

WANICK MC, BANDEIRA J.Á, FERNANDES RV. **Ação antiinflamatória e cicatrizante do extrato hidroalcoólico do líber do pau d'arco roxo (Tabebuia avellanadae), em pacientes portadoras de cervicites e cervico-vaginites**. Revista do Instituto de Antibióticos. 1970.

WONG, I.Y.F.; HE, Z.; HUANG, Y.; CHEN, Z. **Antioxidative activities of phenylethanoid glycosides from Ligustrum purpurascens**. J. Agric. Food Chem., v.49, p.3113 – 3119, 2001.

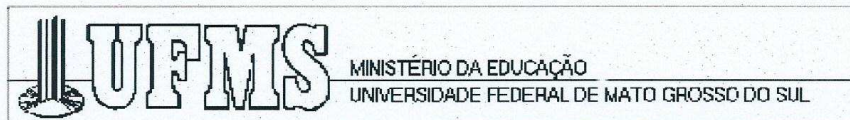
YAMAGUTI-SASAKI, E. et al. **Antioxidant capacity and in vitro prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of Paullinia cupana**. Molecules, v. 12, n. 8, p. 1950-1963, 2007.

ZAGUE, V. et al. **Efeito do ultra-som e do d-pantenol na regeneração tegumentar**. Rev. bras. fisioter, v. 9, n. 3, p. 365-371, 2005.

ZOCOLER, A.M.D., SANCHES, A.C.C., ALBRECHT, I., Mello, J.C.P.d. **Antioxidant capacity of extracts and isolated compounds from Stryphnodendron obovatum Benth**. Braz. J. Pharm. Sci. 45, 443-452, 2009.

## **ANEXOS**

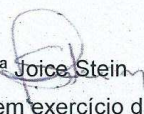




## C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 273 da Profª Drª Andréa Conceição Milan Brochado Antonioli Silva , referente ao projeto de pesquisa, **“O Estudo da toxicidade do extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão, em ratos”**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião de 19 de agosto de 2010.

Campo Grande (MS), 23 de agosto de 2010.

  
Drª Joice Stein  
Presidente em exercício da CEUA