

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS – PICOS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALANA DA SILVA FERRÃO

CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
DE *Poincianella pyramidalis* EM SISTEMA TESTE ANIMAL E VEGETAL

PICOS – PI
2017.

ALANA DA SILVA FERRÃO

**CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
DE *Poincianella pyramidalis* EM SISTEMA TESTE ANIMAL E VEGETAL**

Monografia apresentada como pré-requisito para obtenção do grau de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros.

Orientador: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa

PICOS – PI

2017.

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí

Biblioteca José Albano de Macêdo

F395c Ferrão, Alana da Silva

Citotoxicidade e mutagenicidade do extrato hidroalcoólico de *Poincinella pyramidalis* em sistema teste animal e vegetal / Alana da Silva Ferrão.– 2017.

CD-ROM : il.; 4 ¾ pol. (39 f.)

Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí, Picos, 2017.

Orientador(A): Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa.

1. Plantas Medicinais. 2. *Poincianella pyramidalis*. 3. Citotoxicidade-Genotoxicidade. I. Título.

CDD 581.634



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS
Chefia do Curso de Ciências Biológicas
Rua Cícero Duarte, 905 – Bairro Junco – CEP. 64.607-670 - Picos, Piauí
Fone/Fax: (89) 3422-1008 / 34221024



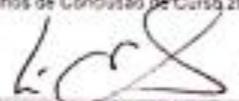
DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o(a) Professor(a) **Dr. João Marcelo de Castro e Sousa** orientou e foi o(a) presidente da Banca do Trabalho de Conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, intitulado "CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Caesalpinia pyramidalis* EM SISTEMA TESTE VEGETAL E ANIMAL", do(a) aluno(a) Alana da Silva Ferrão, apresentado no dia 15 de fevereiro de 2017, em que participaram como avaliadores o(a) professor(a) FELIPE CAVALCANTE VARGAS DA SILVA, da Universidade FEDERAL DO PIAUÍ e o(a) professor(a) WÂNIA MARSA MENDES MORAES, da Universidade FEDERAL DO PIAUÍ, no Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, Universidade Federal do Piauí.

Picos (PI), 15 de fevereiro de 2017.



Prof. Dr. Paulo Victor de Oliveira
SIAPE 1854814
Membro da Comissão de Coordenação dos
Trabalhos de Conclusão de Curso 2016/2



Prof. Dr. Luís Evêncio da Luz
SIAPE 1245671
Membro da Comissão de Coordenação dos
Trabalhos de Conclusão de Curso 2016/2

À minha família pelo amor, dedicação, educação e apoio integral em todos os momentos, e sem os quais os meus passos não seriam os mesmos. Em especial aos meus pais Ivonete Matos da Silva e Moisés Gomes Ferrão, pelo imenso amor, carinho, compreensão e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pois mesmo não sendo merecedora da sua graça Ele derrama sobre mim bênçãos sem medidas, tendo sempre misericórdia da minha vida. Por permitir que tudo isso acontecesse, não somente nestes anos como universitária, mas em todos os momentos da minha caminhada. Obrigada Senhor, por ter me dado saúde e forças para superar as dificuldades.

À minha família, por todo carinho e apoio. Principalmente, aos meus pais Ivonete Matos da Silva e Moisés Gomes Ferrão, pelo amor, cuidado, dedicação, pela bolsa pai/mãe, por me passarem segurança e força para enfrentar todas as dificuldades, e em alguns momentos, a esperança para seguir. E ao meu irmãozinho, Pedro Ferrão por todo seu companheirismo. Com vocês tenho a certeza que não estou sozinha nessa caminhada.

Ao meu orientador, Professor Dr. João Marcelo de Castro e Sousa, pelo apoio, paciência, disponibilidade e conhecimentos transmitidos ao longo desta etapa. Agradeço também pela amizade que construímos, posso dizer que a minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem a sua pessoa.

Agradeço a Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, aos administradores, funcionários e a todo corpo docente do curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, pelas experiências compartilhadas.

Aos meus companheiros de laboratório, à todos os meus amigos sobreviventes nesses anos de universidade, pela amizade, alegrias compartilhadas e noites em claro que passamos juntos trocando conhecimentos. E à família LAOH (Liga Acadêmica de Oncologia e Histologia) por todos os momentos vivenciados, certamente foram essenciais na minha vida.

Meus agradecimentos aos meus irmãos na amizade e todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Todas as coisas foram feitas por intermédio dEle;
sem Ele, nada do que existe teria sido feito.”

João 1:3

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

FIGURA 1 – <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L. P. Queiroz.....	13
FIGURA 2 – Entrecasca de <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L. P. Queiroz.....	14
FIGURA 3 – Fotomicrografia de eritrócitos policromáticos micronucleado (1000x).....	16
FIGURA 4 - Células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> em diferentes fases do ciclo celular.....	17

ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURA 1 – Efeito tóxico (tamanho de raízes) de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de <i>Poincionella pyramidalis</i> em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	31
FIGURA 2 – Efeito citotóxico (índice mitótico) de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de <i>Poincianella pyramidalis</i> em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	32

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

TABELA 1 – Frequência de Micronúcleo (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) do sangue periférico de camundongos e a relação EPC/EPC+ENC após, 24, 48, 168 horas de tratamento com o extrato hidroalcoólico de <i>P. pyramidalis</i> em diferentes concentrações.....	34
TABELA 2 – Frequência de Micronúcleo (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea de camundongos e a relação EPC/EPC+ENC após o tempo de exposição de 168 horas de tratamento com o extrato hidroalcoólico de <i>P. pyramidalis</i> em diferentes concentrações.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Extratos vegetais e atividades farmacológicas.....	12
2.1.1 Gênero <i>Caesalpinia</i>	13
2.1.2 Espécie <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L.P. Queiroz	14
2.2 Ensaio toxicológicos.....	15
2.2.1 Teste de micronúcleo em <i>Mus musculus</i>	16
2.2.2 Utilização de células de <i>Allium cepa</i>	18
REFERÊNCIAS.....	19
1 ARTIGO CIENTÍFICO.....	26
1.1 INTRODUÇÃO.....	27
1.2 METODOLOGIA.....	29
1.2.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico da <i>Poincianella pyramidalis</i>	29
1.2.2 Obtenção das células meristemáticas das raízes de <i>Allium cepa</i>	29
1.2.2.1 Preparo, leitura das lâminas e análise citogenética para o teste de <i>A. cepa</i>	30
1.2.3 Ensaio toxicogenéticos utilizando sistema teste animal.....	30
1.2.3.1 Obtenção e acondicionamento dos animais, grupo tratamentos e procedimento de administração realizados nos camundongos.....	30
1.2.3.2 Teste de micronúcleo via células sanguíneas e de medula óssea de camundongos.....	31
1.2.4 Análise estatística	31
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
1.3.1 Teste de <i>Allium cepa</i>	32
1.3.2 Teste de Micronúcleos.....	34
1.4 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO GERAL

Desde a antiguidade, as plantas vêm sendo utilizadas como agentes medicinais, sendo que várias abordagens têm sido realizadas, ao longo dos anos, a fim de selecionar plantas como candidatas para a descoberta de novas drogas (AKRAM et al., 2014; TUTTOLOMONDO et al., 2014). As plantas medicinais alcançaram uma grande importância no sistema de saúde em todo o mundo, pois são utilizadas como recursos terapêuticos, tanto para seres humanos quanto para animais (ARAUJO et al., 2015).

De acordo com Singh e Raghav (2012), as plantas não são utilizadas apenas para tratamento e cura, mas também na prevenção de doenças e manutenção da saúde. Contudo, torna-se necessário conhecer quais os componentes de ervas medicinais responsáveis para fins terapêuticos, pois muitas destas plantas ditas como medicinais contêm compostos farmacologicamente ativos e poucas delas têm sido estudadas cientificamente para assegurar sua qualidade, segurança e evitar que a planta seja usada equivocadamente (SPEIT E ROTHFUSS, 2012).

A riqueza florística brasileira, juntamente aos levantamentos etnobotânicos, etnofarmacológicos, farmacognósticos e fitoquímicos, permite aos pesquisadores isolar compostos biologicamente ativos a partir de diferentes espécies vegetais. Existem vários estudos com ervas medicinais no Brasil que tratam especialmente da extração, isolamento, identificação, quantificação e atividade biológica de metabólitos secundários de várias espécies de plantas (HIRUMA, LIMA et al., 2009; ZANUTTO et al., 2013; MININEL et al., 2014).

O Bioma Caatinga é exclusivo do Brasil, tendo localização na região nordeste, possuindo um clima semiárido quente e seco, tendo como resultado uma vegetação xerofítica com uma riqueza florística significativa (RODAL; NASCIMENTO, 2006). As plantas medicinais são algumas vezes disponíveis para o tratamento de doenças na região da caatinga, com isso os habitantes locais possuem uma riqueza de conhecimentos tradicionais acumulados, tornando essas ervas um componente social e cultural (TRENTIN et al., 2011). A *Poincianella pyramidalis* antigamente conhecida como *Caesalpinia pyramidalis* conhecida vulgarmente como catingueira, é uma das espécies de mais ampla distribuição neste bioma, ocorrendo nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e também Mato Grosso (MEDEIROS et al. 2012).

A catingueira que tem como gênero *Poincianella*, e pertence família Leguminosea, são compostos por 150 gêneros, 2.200 espécies, possui plantas de grande potencial econômico, ecológico e medicinal (SANTOS et al. 2013). Em um estudo efetivado por Agra et al. (2008) nos estados da região nordeste do Brasil, constatou-se que em um total de 126 espécies tidas como medicinais, 6 eram do gênero *Poincianella*, onde a Catingueira (*P. pyramidalis*), foi uma das plantas mais mencionadas pelos populares. São utilizadas na medicina popular, em lugares de clima tropical e subtropical, flores, frutos, entrecasca, vagem e raízes (RIBEIRO et al. 2013), porém no Brasil é mais utilizada a entrecasca (AGRA et al. 2008).

Apesar da extensa utilização na medicina tradicional e de existirem estudos científicos comprovando atividade terapêutica, as partes botânicas citadas acima e seus constituintes químicos possuem pouca informação sobre sua toxicidade em nível celular (MENEGUETTI et al. 2014). De acordo com Polleto et al. (2012) e Hussin et al. (2014), informações sobre a ação em nível celular de extratos etanólicos de plantas medicinais são importantes para a incrementar a segurança do uso pela população e estimular estudos, mais elaborados, sobre o mecanismo de ação de compostos químicos presentes nestes organismos.

Devido à necessidade da descoberta de novas drogas, vários estudos de caracterização biológica e pesquisa sobre os efeitos colaterais têm sido intensificados com princípios ativos isolados de plantas (MOHANTY et al., 2014; PRZEDPELSKA-WASOWICZ e WIERZBIKA 2010). Compostos com atividades biológicas continuam sendo reconhecidos, entretanto, muitos deles ainda não podem ser utilizados na terapêutica devido às suas propriedades tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas (GAVAMUKULYA et al., 2014).

Na produção de uma nova droga, os resultados de testes de genotoxicidade representam considerável peso, pois, a maioria das indústrias farmacêuticas delibera o processamento de um novo agente terapêutico com base nos resultados de testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (POURRUT et al., 2015). Sabendo-se da utilização das plantas medicinais pela população e dos escassos estudos toxicogênicos, o presente trabalho teve como finalidade avaliar o potencial citotóxico e mutagênico do extrato hidroalcoólico de *Poincianella pyramidalis* em diferentes concentrações em células de roedores e *Allium cepa*, visto que se trata de uma planta bastante utilizada na medicina popular. Diante do exposto, visou-se responder o seguinte questionamento: Será que o extrato hidroalcoólico da catingueira (*P. pyramidalis*) apresenta efeito citotóxico e mutagênico em células de roedores e *Allium cepa*, e potencialmente para a saúde humana?

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Extratos vegetais e atividades farmacológicas

Atualmente, o foco em pesquisas sobre plantas tem aumentado em todo o planeta, e uma ampla quantidade de evidências coletadas tem mostrado um potencial imenso em diversos sistemas tradicionais de remédios. Na medicina tradicional, existe um grande interesse e uma crescente demanda por mais medicamentos a partir de fontes vegetais. Este renascimento do interesse em medicamentos derivados de plantas é principalmente devido à crença generalizada de que a "medicina verde" é mais confiável e segura do que as drogas sintéticas caras, muitas das quais causam efeitos negativos (NAYAK; SHETTIGAR, 2010; GUPTA; PATEL, 2013).

Na terapia moderna as plantas constituem uma fonte efetiva para a descoberta e desenvolvimento de fármacos (SINGH; RAGHAV, 2012). De acordo com Reyes-Garcia (2010), na busca para a saúde humana a etnofarmacologia tem contribuído, com uma visão interdisciplinar, e tem evidenciado ser uma ferramenta importante na descoberta de produtos naturais com ação terapêutica.

Cerca de 88% da população dos países em desenvolvimento faz uso de plantas medicinais, principalmente extratos de plantas, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), pois a droga vegetal é um produto mais tolerado pelo organismo do que as drogas sintéticas, além de mais acessível e de trazer mais benefícios a um grande número de pacientes (CARVALHO, 2004).

No que se refere ao interesse global por produtos derivados da biodiversidade, o Brasil é privilegiado, por possuir inúmeras espécies vegetais com potencial medicinal em sua imensa diversidade biológica (ALMEIDA, 2009; AGARWAL et al., 2010). Diante disso, o país é favorecido na pesquisa e no desenvolvimento de fitoterápicos e, portanto, a Portaria do Ministério da Saúde de nº 971 de 03 de maio de 2006, aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), trazendo em suas diretrizes a elaboração de Relação Nacional de Plantas Medicinais e de Interesse ao SUS (RENISUS) (BRASIL, 2006a).

O Ministério da Saúde reconhece o potencial terapêutico das plantas medicinais e tem como objetivo promover um maior aproveitamento desses recursos pela população brasileira, aprovando a RENISUS, que inclui 71 espécies vegetais selecionadas pelo amplo uso popular. Além disso, a finalidade da relação também é orientar estudos e pesquisas científicas que

possam auxiliar a elaboração da lista de plantas medicinais e fitoterápicas a serem disponibilizados para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de doenças (BRASIL, 2009).

O conhecimento popular juntamente com o potencial farmacológico de certos vegetais, precisa-se está coligado ao aprimoramento no isolamento, purificação e elucidação estrutural de compostos químicos e à credibilidade na eficácia e segurança clínica, favorecendo assim a expansão mundial do mercado dos fitomedicamentos (CALIXTO, 2005).

Portanto, é de grande importância a avaliação das atividades farmacológicas e da toxicidade de extratos vegetais, pois os mesmos constituem a principal forma de preparação utilizada pela população no tratamento de diversas doenças.

2.1.1 Gênero *Poincianella*

O gênero *Poincianella* (*Caesalpinia*) pertence à família Fabaceae ou Leguminosae (Leguminosas), que tem ampla ocorrência geográfica. Este gênero é constituído por 150 gêneros e 2.200 espécies distribuídas em regiões de clima tropical de todo o mundo, possui plantas de grande potencial econômico, ecológico e medicinal (SANTOS et al. 2013).

Em um estudo realizado por Agra et al. (2008) em estados da região nordeste do Brasil verificou-se que em um total de 126 espécies tidas como medicinais, 6 pertenciam ao gênero *Caesalpinia*, onde as plantas mais citadas pela população foram a Catingueira (*Caesalpinia pyramidalis*, atualmente, conhecida como *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz), o Pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*) e o Flamboyazinho (*Caesalpinia pulcherrima*). São utilizadas na medicina popular de países de clima tropical e subtropical diferentes partes botânicas destas três espécies, como frutos, flores, entrecasca, vagem e raízes, (RIBEIRO et al. 2013), porém, no Brasil comumente é mais utilizada a entrecasca, a vagem e as folhas da Catingueira, Pau Ferro e Flamboyazinho, respectivamente (AGRA et al. 2008).

A entrecasca da *P. pyramidalis*, em infusão com água é utilizada tradicionalmente como antitérmica, anti-inflamatória, expectorante, depurativa e no tratamento de infecções intestinais e bronquites (MEDEIROS et al. 2012). A *C. ferrea* utilizada na forma de chá. A vagem de *C. ferrea* é usada como antidiarreicas, cicatrizantes e antitérmica e como eficiente no tratamento de úlceras (WYREPKOWSKI et al. 2014). As folhas de *C. pulcherrima* são utilizadas tradicionalmente em infusão como laxante, tônico, antitérmico e anticonvulsivante (KUMAR et al. 2010) e, em estudos laboratoriais demonstraram potencial para o tratamento de úlceras gástricas, infecções do trato respiratório e de dermatites, e atividade emenagoga

(MEDEIROS et al. 2012). Contudo, apesar de serem muito utilizadas na medicina popular e com estudos científicos comprovando a atividade terapêutica, as partes botânicas citadas destas três leguminosas possuem pouca informação sobre sua toxicidade em nível celular (MENEGUETTI et al. 2014).

2.1.2 Espécie *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz

Caesalpinia pyramidalis, popularmente conhecida como catingueira, atualmente é definida taxonomicamente como *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz. Esta, entre outras espécies do mesmo gênero são bastante utilizadas pela população como planta medicinal (AGRA et al. 2008) (Figura 1).

Figura 1: *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz.



Fonte: <http://www.resacol.wur.nl/gest/privateGEST/South%20America/Pictures>. 2016.

P. pyramidalis é uma espécie de ampla dispersão no Nordeste semiárido, podendo ser encontrada em diversas associações vegetais, crescendo bem nas várzeas úmidas, o qual chega a atingir mais de 10 m e poucos centímetros de diâmetro na base. São encontradas nos Estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, sendo considerada endêmica da caatinga (MAIA, 2004).

A entrecasca de *P. pyramidalis* (Figura 2) possui em sua composição química flavonoides, triterpenos e fenilpropanóides (RIBEIRO et al. 2013), e a sua infusão em água é usada popularmente como antitérmica, anti-inflamatória, expectorante, depurativa e no tratamento de infecções intestinais e bronquites (MEDEIROS et al. 2012). Estudos de avaliação terapêutica desta entrecasca demonstraram atividade anti-inflamatória (SANTOS et al. 2011), antinociceptiva (SANTANA et al. 2012) e eficaz no tratamento de úlceras gástricas (RIBEIRO et al. 2013).

Figura 2: Entrecasca de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz.



Fonte: <http://www.baraoervas.com.br/catingueira-casca>. 2016.

Sabe-se que as plantas sempre foram empregadas como fonte comum de medicamentos. Mas atualmente, avalia-se que mais de 80% da população das espécies vegetais podem conter constituintes que apresentam efeitos colaterais indesejáveis (BRASIL, 2009). Assim, os fitoterápicos devem ser avaliados sob diversos aspectos, como eficácia, qualidade e segurança toxicológica (YU et al., 2011).

2.2 Ensaios toxicológicos

Para o desenvolvimento de novos fármacos são necessários estudos toxicológicos pré-clínicos com o objetivo de se obter informações que comprovem a segurança dos novos compostos nos ensaios clínicos e, posteriormente, na sua comercialização (FAQI, 2013).

Os ensaios toxicológicos pré-clínicos contêm estudos para avaliação de toxicidade geral (por dose única e repetida), genotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade e toxicidade sobre a função reprodutora. Além destes, podem ser efetuados ensaios

toxicológicos complementares, como os ensaios de tolerância local, sempre que a via de administração e/ou efeito produzido pelo novo fármaco o exija. O objetivo deste conjunto de ensaios é avaliar a segurança através da caracterização dos efeitos tóxicos nos órgãos-alvo, da relação dose-resposta e, quando adequado, da reversibilidade de determinado efeito (NUALSANIT et al., 2012; AZIZ et al., 2014).

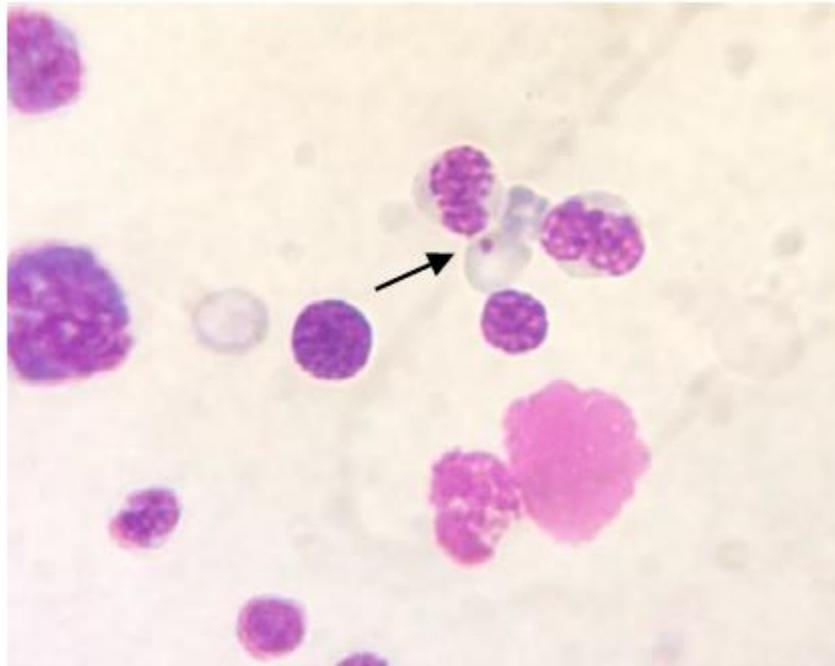
A informação adquirida durante a realização destes ensaios serve para conferir a dose inicial a ser administrada, o intervalo terapêutico a ser utilizado durante os ensaios clínicos e os efeitos adversos que poderão surgir, visto que cada ensaio apesar de estar confinado a determinados parâmetros encontra-se rigorosamente delineado para caracterizar os potenciais efeitos adversos que possam surgir nos ensaios clínicos (NUGENT et al., 2013). Portanto, é notável a importância e necessidade de ensaios toxicológicos na avaliação de substâncias a fim de garantir a segurança e eficácia de novo fármaco.

2.2.1 Teste do micronúcleo em *Mus musculus*

O teste de micronúcleo se fundamenta na ocorrência de quebras cromossômicas ou falhas na ligação de cromossomos ao fuso, de modo que, o processo de maturação destas células, quando ocorre a expulsão do núcleo, esta não se faz de modo integral, permanecendo no citoplasma estruturas resultantes destes eventos os micronúcleos. O teste de micronúcleo em eritrócitos policromáticos de roedores é utilizado para avaliação do potencial de um dado agente em induzir danos cromossômicos (MEIRELES et al., 2013; SANTOS, 2015).

Micronúcleos (MN) são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que, durante a divisão celular, falham em se ligar às fibras do fuso e, assim, não são incluídos no núcleo das células filhas (Figura 3). Detectam, portanto, a ação de agentes aneugênicos e de agentes clastogênicos. Em eritrócitos apresentam forma arredondada e medem cerca de 1/20 a 1/5 do diâmetro do eritrócito (RIBEIRO, 2003).

Figura 3: Fotomicrografia de eritrócito policromático micronucleado em medula óssea de *Mus Musculus* (1000X/).



Fonte: Santos, 2015.

O teste de micronúcleo em eritrócitos policromáticos (PCE), que são eritrócitos jovens, foi pioneiramente proposto por Schmid, Matter e Von Ledebur (MATTER e SCHMID, 1971; LEDEBUR e SCHMID, 1973; SCHMID, 1975) e modificado por Heddle (1973). Assim, na condução do teste de micronúcleo em eritrócitos policromáticos, é fundamental conhecer a dinâmica de maturação da linhagem que origina os eritrócitos. A primeira célula da linhagem eritroblástica, formada a partir da célula indiferenciada, é o pró-eritroblasto. Este, após quatro divisões origina os eritroblastos, que passam por uma só divisão e dão origem às células nas quais o núcleo é expulso e que se diferenciam primeiramente em eritrócitos policromáticos e, posteriormente, em eritrócitos normocromáticos (NCE) (HOLLAND et al., 2008; VASQUEZ et al., 2010).

Dois aspectos devem ser destacados na utilização deste teste: 1) Os eritrócitos policromáticos são ricos em ácido ribonucleico (RNA) e, assim, apresentam a cor azulada quando as preparações são coradas pelo método de Leisham (RIBEIRO, 2003) e; 2) O período entre a formação do eritrócito policromático e sua diferenciação em eritrócito normocromático é de 10h a 24h de modo que seu cômputo deve ser feito antes que se esgote este período (RABELO-GAY, 1991).

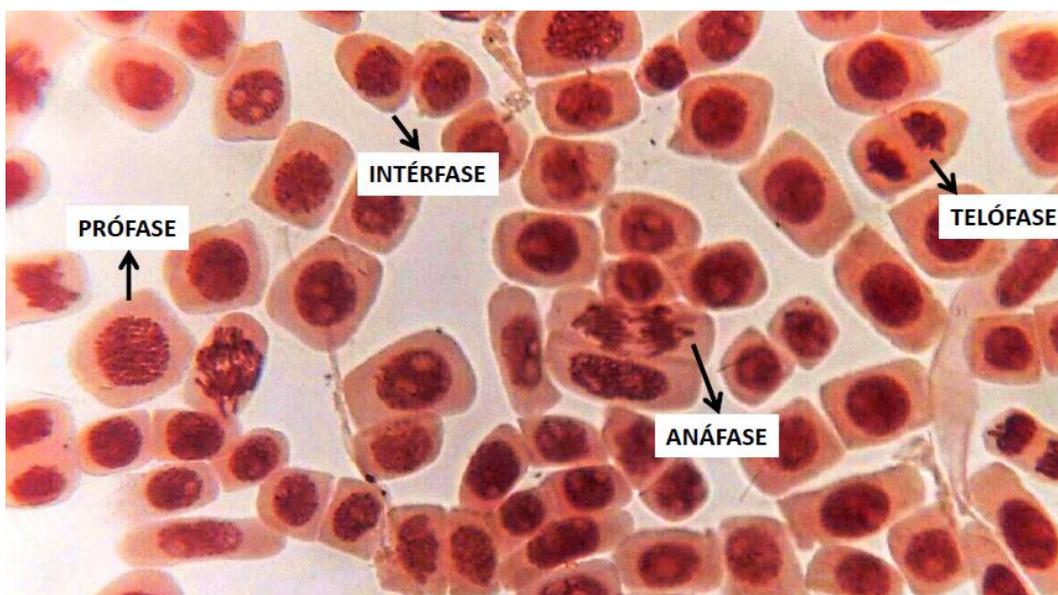
O teste de micronúcleo em eritrócitos de camundongos apresenta muitas vantagens, como: Micronúcleos são observados em células de interfase, dispensando procedimentos de cultura; O teste é realizado a baixo custo; A análise é simples e as estruturas são facilmente

identificadas; O teste detecta a ação de agentes aneugênicos e clastogênicos. Adicionalmente à genotoxicidade, o teste de micronúcleo propicia também a avaliação da citotoxicidade de uma dada substância através do cômputo da relação PCE/PCE+NCE (VILAR et al., 2008; BORGES et al., 2011). Porém apresenta algumas limitações, tais como: Micronúcleos são observados apenas em células que passaram anteriormente por uma divisão; Eventos de não-disjunção mitótica não são detectados; Quebras que promovem rearranjos cromossômicos sem a ocorrência de fragmentos não são observáveis.

2.2.2 Utilização de células de *Allium cepa*

A avaliação do potencial citotóxico/mutagênico de espécies de plantas medicinais pode ser realizada através de um dos testes citogenéticos mais empregados, o sistema teste de *Allium cepa* (BAGATINI, 2006). Regularizado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) o método de avaliação de células meristemáticas utilizando as variáveis índice mitótico e alterações cromossômicas em raízes de *Allium cepa* (Figura 4) é um teste eficiente para a análise e monitoramento da genotoxicidade de várias substâncias químicas que vão desde xenobióticos ambientais a extratos vegetais (SILVA et al., 2004).

Figura 04: Células meristemáticas de *Allium cepa* em diferentes fases do ciclo celular.



Sistemas testes vegetais como o de *Allium cepa*, têm sido empregados para o estudo dos efeitos toxicológicos de extratos de plantas, tendo em vista a detecção de genotoxicidade (TEIXEIRA et al., 2003; FACHINETTO et al., 2007). A importância e a utilidade de sistemas testes vegetais na avaliação de riscos de genotoxicidade foi destacada por Fiskesjo (1993, 1994), e enfatizou que apesar das diferenças entre os metabolismos de plantas e animais, também existem similaridades na resposta toxicológica.

Para o estudo do efeito de citotoxicidade de plantas medicinais, o sistema de teste *Allium cepa* é bem aceito, porque as suas raízes ficam em contato direto com a substância estudada, permitindo a avaliação de concentrações diferentes. As alterações cromossômicas e de divisão das células meristemáticas da raiz de cebola são comumente usadas para alertar a sociedade sobre o consumo de diferentes produtos (VICENTINI et al., 2001).

Os efeitos dos chás de plantas medicinais sobre o ciclo celular de *Allium cepa* têm sido descritos por vários autores (KNOLL et al., 2006; FACHINETTO et al., 2007), os quais mostraram que os efeitos principais que ocorrem são a mutagenicidade e anti-mutagenicidade, bem como aumento e diminuição da proliferação celular das pontas das raízes tratadas, o que caracterizaria o efeito citotóxico.

O sistema teste vegetal de *Allium cepa* se mostra, nesse caso, como um bom bioindicador da genotoxicidade de infusões de plantas medicinais, por conta do baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade, auxiliando os estudos de prevenção de danos à saúde humana.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, V.; LAL, P.; PRUTHI, V. Effect of Plant Oils on *Candida albicans*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2010.
- AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 8(3): 472- 508. *Allium cepa*/Analysis of mutagenicity hydrossoluble extract *Derrisrari flora*. **Revista Pesquisa & Criação**, 10(1): 163-176, 2008.
- _____. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2008.
- AKRAM M. et al. Review on medicinal uses, pharmacological, phytochemistry and immunomodulatory activity of plants. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol**, 2014.
- ALMEIDA, A.C. et al. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. **Ciência Rural**, 2009.

ARAÚJO E.J.F. et al. Counteracting effects on free radicals and histological alterations induced by a fraction with casearins. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 2015.

AZIZ MY. et al. Damnacanthal is a potent inducer of apoptosis with anticancer activity by stimulating p53 and p21 genes in MCF-7 breast cancer cells. *Oncol. Lett.*, 2014.

BAGATINI, M. D. et al. Uso do sistema teste *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2007.

BORGES, F.F.V. et al. Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and antigenotoxic activities of *Celtis iguanaea* (Jacq.) in mice. *Anais Academia Brasileira de Ciências*, 2011.

BRAGANÇA-PEREIRA, C.A. (1991) Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A.L.R., MAONTELEONE-NETO, R. (editors). Mutagênese, carcinogênese e teratogênese: Métodos e critérios de avaliação, São Paulo: **Sociedade Brasileira de Genética**, 113-121.

BRASIL, **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 03 de maio de 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos-Formulário Terapêutico Nacional: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS RENISUS**. Fev 2009. Disponível em: < <http://www.saude.gov.br/bvs> >. Acessado em janeiro de 2017.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005.

CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos clínicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: **Tecmedd**, 2004.

FACHINETTO JM, BAGATINI MD, DURIGON J, SILVA ACF, TEDESCO SB. Efeito anti proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Rev Bras Farmacogn*, 2007.

FAQI, A. S. (2013). Introduction. In Faqi, A. S. A Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development. 1ª Edição. Amesterdão. **Editora Elsevier**.

FISKESJO G. The Allium Test II: Assesmente of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. *Environ Toxicol Water*, 1994.

_____. The *Allium* test. In: waste water monitoring. *Environ Toxicol Water*, 1993.

GAVAMUKULYA Y. et al. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pac J Trop Med*, 2014.

GUPTA RK, PATEL AK. Do the health claims made for *Morinda citrifolia* (Noni) harmonize with current scientific knowledge and evaluation of its biological effects. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2013.

HIRUMA; LIMA CA. et al. Brazilian “cerrado” medicinal plant presentes na important anti ulcer activity. *J Ethnopharmacol*, 2009.

HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project prospective on current status and knowledge gaps. *Mutat. Res.*, 2008.

HUSSIN F. et al. The *Centella asiatica* juice effects on DNA damage, apoptosis and gene expression in hepatocellular carcinoma (HCC). *BMC Complement. Altern. Med.*, 2014.

KNOLL MF. et al. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. *Genet Mol Biol*, 2006.

KUMAR, D. et al. Anti convulsant effect of the ethanol extract of *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw., Fabaceae, leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2010.

MAIA, G. N. Catingueira. In: MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. **São Paulo: Leitura e Arte**, 2004.

MEDEIROS, J. G. F, et al. Fungos associados com sementes de flamboyant-mirim (*Caesalpinia pulcherrima*): incidência, efeito na germinação, transmissão e controle. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 2012.

MEIRELES, J.R.C. et al. Genotoxic and cytotoxic effects of testosterone cypionate (depostron®). *Mutat. Res.*, 2013.

MENEGUETTI, D. U. O, et al. Análise citotóxica e mutagênica do extrato aquoso de *May tenus guy an sis Klotz schex Reissek* (celastraceae) chichuá (xixuá) amazônico. *Ciência e Natura*, 2014.

MININEL, F.J, et al. Characterization and quantification of compounds in the hydroalcoholic extract of the leaves from *Terminalia catappa* Linn. (Combretaceae) and their mutagenic activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.

MOHANTY SK. Evaluation of antioxidant, in vitro cytotoxicity of micropropagated and naturally grown plants of *Leptadenia reticulata* (Retz.) Wight & Arn. - an endangered medicinal plant. *Asian Pac J Trop Med*. 2014.

NAYAK S, SHETTIGAR R. *Morinda citrifolia*: A review. *J. Pharm.*, 2010.

NUALSANIT T. et al. *Damnacanthal*, a noni component, exhibits antitumorigenic activity in human colorectal cancer cells. *J. Nutr. Biochem.*, 2012.

NUGENT, P. et al. The Preparation of a Preclinical Dossier to Support an Investigational New Drug (IND) **Application and First-in-Human**, 2013.

POLETO, P. D. O., et al. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derrisrariflora*(Mart. exbenth. Jfmabr: Fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*/Analysis of mutagenicity hydros soluble extract *Derrisrari flora*. **Revista Pesquisa & Criação**, 2012.

POURRUT B. et al. Recommendations for increasing alkaline comet assay reliability in plants. **Mutagenesis**, 2015.

PRZEDPELSKA-WASOWICZ, E. M. & WIERZBIKA, M. Gating of aquaporins by heavy metals in *Allium cepa* L. epidermal cells. **Protoplasma**, 2010.

REYES-GARCIA, V. The relevance of tradicional knowledge systems for Ethnobiol **Ethnomed**, 2010.

RIBEIRO, A. R. S., et al. Gastroprotective activity of the ethanol extract from the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 2013.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Editora da ULBRA, 2003.

_____, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. 1ª ed. Canoas. ULBRA, 2003.

RODAL, M.J.N., NASCIMENTO, L.M. The arboreal componente of a dry forest in Northeastern Brazil. **Braz J Biol**, 2006.

SANTANA, D. G., et al. Beneficial effects of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* on the inflammatory response and abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, 2012.

SANTOS, L.C., et al. New Naphthopyranone Dimer and Flavonoids from *Paepalanthus planifolius*. **J. Nat. Prod.**, 2011.

SANTOS, M. L. O., et al. Estudo do efeito radioprotetor do extrato metanólico de *Caesalpinia pyramidalis* sobre células embrionárias de *Biomphalaria glabatra*. **ScientiaPlena**, 2013.

SANTOS, N. NILTON CESAR; **Avaliação da genotoxicidade e da citotoxicidade de produtos utilizados na terapia pulpar de dentes decíduos com o uso do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos e do ensaio cometa em linfócitos humanos**. Feira de Santana/Bahia, 2015.

SILVA CR. et al. Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. **Rev Bras Farmacogn**, 2004.

SINGH; RAGHAV, et al. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos.** In: SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRS, 2012.

SPEIT G, ROTHFUSS A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods Mol. Biol.**, 2012.

TEIXEIRA RO, CAMPAROTO ML, MANTOVANI MS, VICENTINI VEP. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. And *Achillea mille folium* L. in in vivo assays. **Genet Mol Biol**, 2003.

TRENTIN, D.S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and bio film life styles. **J Ethnopharmacol**, 2011.

TUTTOLOMONDO T. et al. Ethnobotanical investigation on wild medicinal plants in the Monti Sicani Regional Park (Sicily, Italy). **J. Ethnopharmacol.**, 2014.

VASQUEZ, M.Z. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. **Mutagenesis**, 2010.

VICENTINI VEP, CAMPAROTO ML, TEIXEIRA RO, MANTOVANI MS. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissampelos grandis* L.: medicinal herbal tea effect on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, 2001.

VILAR, J.B. et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal Of Biologoy**, 2008.

WYREPKOWSKI, C. C., et al. Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from *Caesalpinia ferrea* stem bark and evaluation of their mutagenic activity. **Molecules**, 2014.

YU EL. et al. Acute hepatotoxicity after ingestion of *Morinda citrifolia* (Noni Berry) juice in a 14-year-old boy. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, 2011.

ZANUTTO, F. V., et al. Characterization of Flavonoids and Naphthopyranones in Methanol Extracts of *Paepalanthus chiquitensis*. Herzog by HPLC-ESI-IT-MSn and Their Mutagenic Activity. **Molecules**, 2013.

Artigo elaborado e formatado conforme as normas da revista científica *Experimental and Toxicologic Pathology*. Disponível em: <https://www.elsevier.com/journals/experimental-and-toxicologic-pathology/0940-2993/guide-for-authors>

ARTIGO CIENTÍFICO

Citotoxicidade e mutagenicidade do extrato hidroalcoólico de *Poincianella pyramidalis* em sistema teste animal e vegetal

Alana da Silva Ferrão¹; Larissa de Sousa Soares¹; Victor Alves de Oliveira¹; Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva^{1,2}; Márcia Maria Mendes Marques¹; Ana Paula Peron^{1,3}; Thiago Pereira Chaves⁴; João Marcelo de Castro e Sousa^{1,2*}.

¹Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Universidade Federal do Piauí.

²Laboratório de Citogenética e Mutagênese. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Piauí.

³Laboratório de Ensaio e Desenvolvimento de Drogas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

RESUMO

A *Poincianella pyramidalis* é uma espécie arbórea, endêmica da Caatinga, amplamente distribuída na região semiárida brasileira. Esta planta é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de diversos tipos de doenças humanas, porém com poucos estudos sobre seus efeitos toxicológicos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade citotóxica e mutagênica do extrato hidroalcoólico de sua entrecasca utilizando dois sistemas testes: vegetal (teste de *Allium cepa*) e animal (teste do micronúcleo com *Mus musculus*). Foram avaliadas para cada sistema teste três concentrações com diferentes tempos de exposição. Juntamente com as concentrações testadas foram utilizados dois controles: Negativo (água destilada) e positivos (sulfato de cobre e ciclofosfamida). Os resultados mostram que para os dois bioindicadores utilizados, o extrato hidroalcoólico de *P. pyramidalis* mostrou-se tóxico e citotóxico para suas células, porém sem efeitos mutagênicos significantes. Conclui-se, portanto, que o extrato apresentou efeitos toxicogênicos importantes, com ênfase para a ação antiproliferativa, podendo o mesmo ser estudado para uma possível atividade antitumoral.

Palavras chaves: Plantas medicinais; *Poincianella pyramidalis*; Genotoxicidade; *Allium Cepa*; Camundongos.

1.1 Introdução

As plantas têm sido uma rica fonte de agentes terapêuticos desde a antiguidade. Na indústria farmacêutica cerca de 25-30% de todas as drogas disponíveis são derivadas de produtos naturais (plantas, microrganismos e animais) (Efferth e Koch, 2011; Rather et al. 2013).

Para o tratamento de doenças muitas plantas medicinais de conhecimento popular são usadas mundialmente. Conforme a Organização Mundial da Saúde, cerca de 60-80% da população mundial nos países em desenvolvimento, dependem basicamente de plantas para cuidar de sua saúde, devido à pobreza e falta de acesso à medicina tradicional. Todavia, poucas espécies (15 a 17%) têm sido estudadas cientificamente para a avaliação de suas qualidades, segurança e eficácia (George et al., 2010; Cort e Ozben, 2015).

O Bioma Caatinga apresenta uma grande diversidade de espécies vegetais. Dentre as espécies utilizadas na medicina popular que ainda necessitam de estudos encontra-se a catingueira *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz (anteriormente conhecida como *Caesalpinia pyramidales*). *P. pyramidalis* é uma espécie de ampla dispersão no Nordeste semiárido ocorrendo nos Estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e uma pequena faixa no norte de Minas Gerais (Prado, 2003).

A espécie *P. pyramidalis* possui algumas atividades farmacológicas conhecidas tais como: diurético, digestivo, antidispéptico, estomático e antitérmico. Apresenta sua composição química triterpenos, esteroides, flavonoides, biflavonoides e ácidos fenólicos. (Oliveira, 2010).

Em um estudo realizado por Agra et al. (2008) em estados da região nordeste do Brasil verificou-se que dentre as espécies tidas como medicinais, as plantas do gênero *Poincianella*, foram as mais citadas pela população. Entretanto, apesar da ampla utilização na medicina popular e de existirem estudos científicos comprovando atividades terapêuticas, as partes botânicas utilizadas destas leguminosas ainda possuem pouca informação sobre sua toxicidade em nível celular (Meneguetti et al. 2014). De acordo com Polleto et al. (2012) e Bagatini et al. (2007), conhecimentos sobre a ação em nível celular de extratos de plantas medicinais tem grande importância para aumentar a segurança do uso pela população e estimular estudos, mais detalhados, sobre o mecanismo de ação de compostos químicos presentes nestes organismos. Os extratos provenientes de plantas devem ser estudados em

diversos sistemas-testes, em diferentes concentrações e tempos de exposição, para a obtenção de uma completa avaliação da citotoxicidade e mutagenicidade (Przedpelska-Wasowicz; Wierzbika, 2010). A exposição contínua a produtos químicos sintéticos ou naturais presentes em preparações a base de plantas medicinais pode levar a danos estruturais e funcionais a macromoléculas. Devido a possíveis efeitos tóxicos, que podem ser medidos por várias metodologias de testes genotóxicos e mutagênicos (Speit e Rothfuss, 2012; Hussin et al. 2014). Entre os vários testes toxicogenéticos disponíveis atualmente, o teste de *Allium cepa* e o teste de micronúcleos (MN) em roedores, juntamente com o Ensaio Cometa são os mais utilizados (Moraes et al., 2016).

O teste de *Allium cepa* é usado para avaliar os danos no DNA, tais como aberrações cromossômicas e avaliar alterações no ciclo mitótico. A utilização de *A. cepa* como um sistema-teste para detectar agentes mutagênicos remonta a década de 40 e ele tem sido usado até hoje para avaliar um grande número de agentes químicos, o que contribui para aumentar a sua aplicação em estudos de atividade toxicológica de plantas medicinais (Leme; Marin-Morales, 2009). O teste de Micronúcleo tem seu lugar entre os testes de biomonitoramento, pois proporciona um procedimento técnico mais fácil em relação aos ensaios de aberrações cromossômicas. Além do fácil manuseio o teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* busca detectar e quantificar a ação mutagênica e/ou anti-mutagênica de agentes indutores, sendo amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais como parte de uma bateria de testes aconselhados para se estabelecer a estimativa e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (Magalhães et al. 2010; Bona et al. 2012; Queiroz et al. 2013).

Devido à necessidade constante de estudos sobre os efeitos toxicológicos de extratos de plantas medicinais, este objetivou avaliar o potencial citotóxico e mutagênico do extrato hidroalcoólico da entrecasca de *P. pyramidalis*, utilizando os testes de *Allium cepa* e o teste de Micronúcleos em *Mus musculus*.

1.2 Metodologia

1.2.1 Material vegetal e a obtenção do extrato hidroalcoólico de *Poincianella pyramidalis*

A entrecasca de *P. pyramidalis* foi coletada na fazenda “Farinha”, município de Pocinhos, PB, Brasil (7 ° 07'54,53"S e 36 ° 07'14,51"O), em janeiro de 2015. Um exemplar da

espécime (CSTR 5036) foi depositado no herbário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande.

O material vegetal foi limpo e submetido à secagem em estufa de circulação de ar a 40°C até a manutenção do peso constante. Posteriormente, foi triturado em moinho de facas com tamanho de partícula de 10 mesh. O pó resultante foi mantido a temperatura ambiente em recipiente de plástico hermeticamente fechado e protegido da luz. O extrato hidroalcoólico foi obtido por extração assistida por ultrassom a 40 °C durante 60 min, utilizando como solvente etanol:água 50% (v/v). Em seguida foi submetido à secagem por aspersão em um Mini *Spray Dryer* Labmaq PS-1 (Labmaq do Brasil Ltda), com temperatura de entrada foi de 120°C, fluxo de ar 40 L.min⁻¹, vazão de ar de secagem 3 mL.min⁻¹. O extrato nebulizado (ENPp) foi seco com o adjuvante dióxido de silício coloidal (Aerosil 200[®]) em 20%, em relação ao resíduo seco.

1.2.2 Obtenção das células meristemáticas de raízes de *A. cepa*

Para o teste de ponta de raiz de *Allium cepa*, foram utilizados bulbos de tamanho pequeno, uniforme, de mesma origem, não germinadas e saudáveis. Os bulbos de cebola foram colocados em frascos com água, a temperatura ambiente, para enraizar. Quando as raízes atingiram 0,5 cm foram colocadas nas soluções de tratamento. Para verificar a atividade citotóxica e mutagênica dos compostos estudados, foram realizados cinco tratamentos com cinco repetições cada: T1 – controle negativo-CN, onde as raízes dos bulbos foram tratadas com água destilada; T2 – 0,1 mg/100ml do extrato hidroalcoólico de *Poincianella pyramidalis*; T3 - 0,2 mg/100ml do extrato hidroalcoólico de *Poincianella pyramidalis*; T4 - 0,5 mg/100ml do extrato hidroalcoólico de *Poincianella pyramidalis* e T5 – Controle positivo (CP) tratados com sulfato de cobre (0,0006 mg/ml). Os bulbos ficaram submersos nos tratamentos durante os tempos de exposição de 24, 48 e 72 horas. Foram observados em cada um desses tempos de exposição (TE) o crescimento de duas raízes selecionadas em cada um dos bulbos, através da medição com o auxílio de uma régua como medida de toxicidade.

1.2.2.1 Preparo, leitura das lâminas e análise citogenética para o teste *A. cepa*

As lâminas, em média 03 por bulbo, foram preparadas seguindo o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002), e analisadas em microscópio óptico em objetiva de 40x. Para cada

bulbo, analisou-se 1.000 células, totalizando 5.000 células para cada tratamento. Foram observadas células em intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase.

Calculou-se o número de células em intérfase e em divisão de cada controle e tempo de exposição, e em seguida foi determinado o índice de divisão celular ou índice mitótico (IM) para avaliação do efeito citotóxico. Avaliou-se também a ação mutagênica dos extratos por meio do número de células com alterações cromossômicas: micronúcleos, metáfases colchícnicas, pontes anáfasicas, pontes telofásicas e metáfases poliplóides.

1.2.3 Ensaio toxicogenético utilizando sistema teste animal

1.2.3.1 Obtenção e acondicionamento dos animais, grupos tratamentos e procedimento de administração realizados nos camundongos

Neste trabalho, foram utilizados camundongos “swiss” (*Mus musculus* L.), machos e fêmeas, com três meses de nascidos e 30-35 g de peso corpóreo, fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Piauí. Os animais permaneceram durante todo o tempo de experimento em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 horas. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água fornecida *ad libitum*.

Foram estabelecidos cinco grupos experimentais para análise, que foram: Grupo controle negativo (CN), T2, T3 e T4 – animais tratados com extrato hidroalcoólico de *Poincianella pyramidalis* nas concentrações de 100, 200 e 500 mg Kg⁻¹ e T5 – tratados com Controle positivo (CP) com ciclofosfamida (50 mg/kg), dose equivalente a 36,4% da dose letal (137 mg = kg);

Para cada grupo, utilizou-se três camundongos, escolhidos de forma aleatória quanto ao sexo. Os tratamentos com extrato hidroalcoólico de *P. pyramidalis* foram administrados aos animais via gavagem, em aplicação diária durante sete dias, por meio de seringa adaptada à aplicação oral de pequenas dosagens. Os camundongos do grupo controle positivo receberam tratamento diferenciado, onde se aplicou ciclofosfamida na concentração 50 mg/kg (Carvalho et al., 2010), via intraperitoneal. Os tempos de exposição foram para o sangue periférico 48, 72 e 168 horas e medula óssea apenas o tempo de 168 horas.

Os animais utilizados nesta pesquisa foram tratados conforme os princípios definidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e em conformidade aos preceitos da legislação brasileira (Lei Arouca - Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008). O

protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (protocolo número 5618092015).

1.2.3.2 Teste do micronúcleo via células sanguíneas e de medula óssea de camundongos

O teste de micronúcleos (MN) utilizando células sanguíneas periféricas e medula óssea foi realizado de acordo com metodologia descrita previamente por Krishna e Hayashi, 2000. Para a determinação da frequência micronúcleos em sangue periférico e medula óssea, o que caracteriza o efeito mutagênico do extrato foram observados 2000 eritrócitos por animal em cada amostra de sangue para os tempos de exposição (TE) de 48, 72 e 168hs e 400 eritrócitos policromáticos na medula por tratamento para o TE 168hs. Para esta análise foi utilizado microscópio óptico com objetiva de aumento de 100x. Para determinar a citotoxicidade do extrato, foi utilizado a equação $EPC / EPC+ENC$, onde EPC: é o número de eritrócitos policromáticos e ENC: o número de eritrócitos normocromáticos. Foram contados 1000 células em amostras de sangue periférico enquanto que, para amostras da medula óssea foi contabilizado um total de 400 eritrócitos (EPC+ENC) por animal (200/lâmina) e 1200 células por tratamento.

1.2.4 Análise estatística para os dados obtidos com animais

Os dados obtidos neste trabalho por meio do ensaio em *Allium cepa* e *Mus musculus* foram avaliados pelo método estatístico ANOVA seguido pelo teste de Tukey, através do programa computacional Graph Prism 7.0, e o $p < 0.05$ foi utilizado como valor de significância.

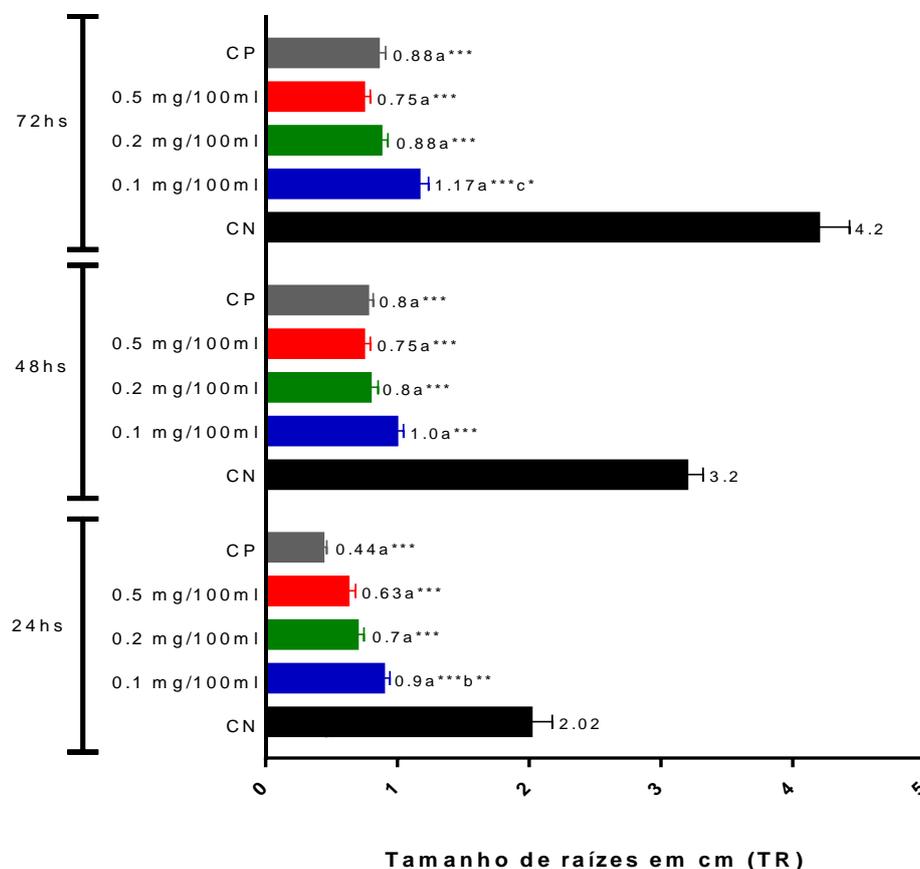
1.3 Resultados e Discussão

1.3.1 Teste de *Allium cepa*

A caracterização toxicogenética do extrato hidroalcoólico de *P. pyramidalis* foi realizado por parâmetros macroscópicos: Tamanho das raízes (TR) e citogenéticos: Índice mitótico (IM) e Alterações cromossômicas (AC). Diferenças estatisticamente significantes para TR, IM, mas não para AC, foram observadas em comparação ao controle negativo (CN), indicando efeitos tóxicos e citotóxicos do extrato nas células avaliadas (Figura 01 e 02).

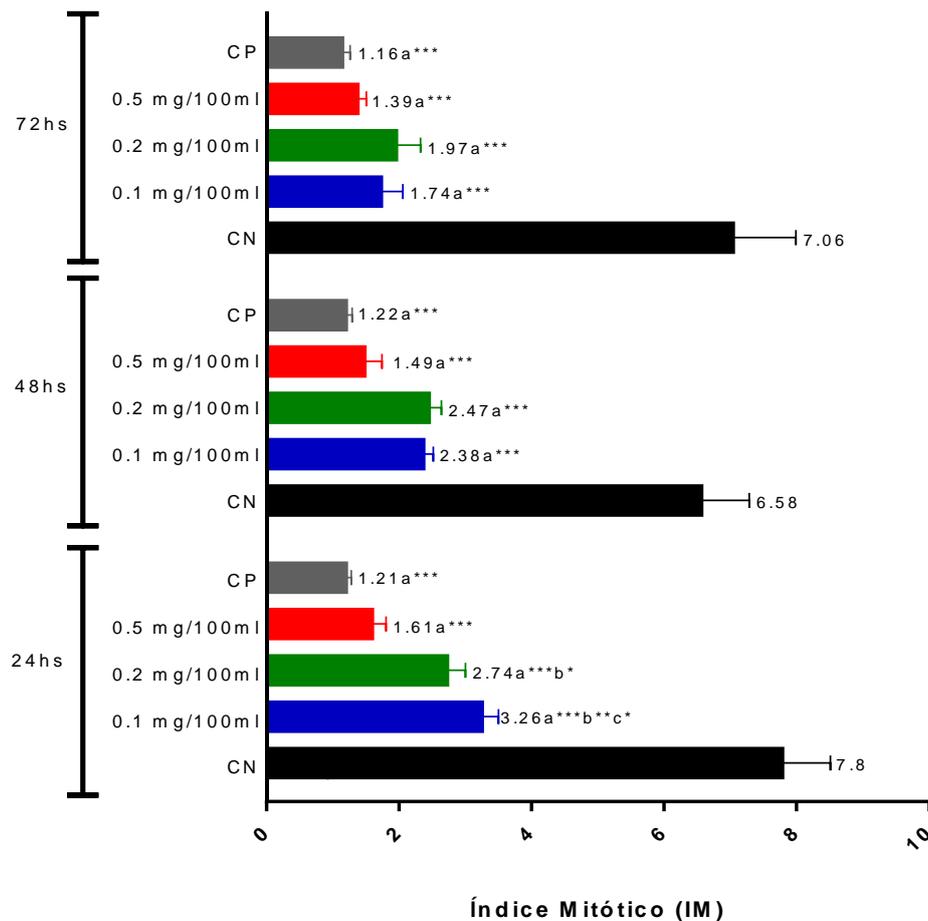
A avaliação do efeito tóxico representado pela variável TR nas três concentrações, durante os três tempos de exposição (TE) apresentaram significante ($p < 0,001$) efeito tóxico em comparação ao CN. Quanto a comparação com o controle positivo (CP), as concentrações testadas foram estatisticamente igual, o que confirma o efeito tóxico das concentrações, com exceção a concentração 0,1 mg/100ml no tempo de exposição de 24 horas ($p < 0,01$) (Figura 01).

Figura 1: Efeito tóxico (tamanho de raízes) de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Poincianella pyramidalis* em células meristemáticas de *Allium cepa*. ANOVA-One-way e pós-teste de Tukey. Valores de significância, a: comparado ao controle negativo (CN); b: comparado ao Controle positivo (CP); c: 0.1 mg/100ml comparado a 0.5 mg/100ml. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.



Em nível celular (Índice mitótico – IM), as três concentrações avaliadas apresentaram efeitos citotóxicos significantes ($p < 0,001$) para os três tempos de exposição, obtendo valores estatisticamente iguais em comparação ao controle positivo, com exceções apenas das concentrações 0,1 e 0,2 mg/100ml no primeiro TE (24hs) (Figura 02).

Figura 2: Efeito citotóxico (índice mitótico) de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Poincianella pyramidalis* em células meristemáticas de *Allium cepa*. ANOVA-One-way e pós-teste de Tukey. Valores de significância, a: comparado ao controle negativo (CN); b: comparado ao Controle positivo (CP); c: 0.1 mg/100ml comparado a 0.5 mg/100ml. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.



No teste de *A. cepa*, resultados de estudos macroscópicos (TR) e microscópicos (IM) são relacionados entre si e geralmente um dá suporte ao outro (Radić et al. 2009; Sousa et al. 2013). Portanto, a inibição de crescimento da raiz pelo extrato hidroalcoólico pode ser explicada devido os inferiores IM estatisticamente observados ($p < 0.001$) em comparação ao CN. Em contrapartida, valores baixos de IM, podem dificultar a análise de AC, tendo em vista que a observação de mutações nesse tipo de bioensaio é feito em células em divisão celular. Para o bioensaio com *Allium cepa*, não foram observados valores significantes de alterações cromossômicas.

Melo et al. (2013) constataram que o pólen produzido por *P. pyramidalis* apresentou toxicidade para *Apis mellifera* em condições laboratoriais. Outras espécies do Gênero *Caesalpinia* já foram avaliadas quanto ao potencial citotóxico, em concentrações e organismos diferentes, tais como o estudo realizado por Grupta et al. (2004) que demonstraram a atividade citotóxica das folhas da espécie *Caesalpinia bonducella*, em células de tumor mamário de camundongos.

Indícios de citotoxicidade de extratos aquosos de folhas de *P. pyramidalis* foram encontrados por Silva et al. (2015), utilizando o teste de *Allium cepa*. O extrato aquoso desta

planta apresentou potencial antiproliferativo estatisticamente significativo em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* nas concentrações de 1000 e 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por outro lado, foram encontrados indícios de atividade antimutagênica dessa planta, visto que as mesmas proporcionaram a redução do número de alterações cromossômicas induzidas pelo paracetamol.

Além de estudos sobre a toxicidade das espécies do gênero *Caesalpinia* e *Poincianella*, tem-se a necessidade da realização de estudos mais aprofundados sobre as atividades farmacológicas e sobre a composição química, por ser Gêneros que contém muitas espécies com fins medicinais. O Estudo fitoquímico de Chaves et al., 2016 com a casca de *P. pyramidalis* constatou a presença de metabólitos secundários como polifenóis, flavonoides, taninos condensados e saponinas. No mesmo estudo, eles constataram por cromatografia gasosa a presença de ácido cafeico, ácido gálico, catequinas, quercetinas e rutina.

Segundo Sayeed et al. (2004) a ação em nível celular da entrecasca da *Caesalpinia pulcherrima* possui ação em nível celular bem definida, onde os flavonoides existentes em sua composição química têm papel importante quanto ao potencial citotóxico frente a linhagens celulares normais e tumorais. Oliveira (2010) demonstrou que diferentes compostos químicos existentes na composição de *P. pyramidalis* quando testados isoladamente possuem ações, sejam elas terapêuticas ou não. Nesse estudo químico, foi possível detectar a presença de efeitos citotóxicos dos flavonoides e biflavonoides presentes na casca da *P. pyramidalis*, tais como lupeol, acacetina e 7-hidroxi-4'-metoxiflavona-5 α -2,4- dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona.

1.3.2 Teste de Micronúcleos

A frequência de EPCMN e a relação EPC/EPC+ENC de amostras obtidas do sangue periférico e da medula óssea dos camundongos tratados com o extrato hidroalcoólico de *P. pyramidalis* estão contidas nas tabelas 1 e 2. A genotoxicidade é indicada pelo aumento significativo na frequência de micronúcleos, enquanto a citotoxicidade é indicada pela redução significativa de EPC. O extrato apresentou citotoxicidade em células sanguíneas periféricas nas duas concentrações mais elevadas nos tempos de exposição (TE) de 48 e 168hs. Em relação à mutagenicidade, o extrato promoveu efeitos mutagênicos apenas na concentração de 100 mg kg^{-1} no TE de 168hs. Nas lâminas preparadas com a medula óssea no TE de 168hs, o extrato apresentou efeito citotóxico nas duas concentrações mais elevadas. Nenhum efeito mutagênico foi observado para o extrato na medula.

Tabela 1: Frequência de micronúcleo (MN) em eritrócitos de sangue periférico de camundongos e a relação EPC/ EPC+ENC após, 24, 48 e 168 horas de tratamento com extrato de hidroalcolico de *P. pyramidalis* em diferentes concentrações.

Tratamento	TE	Eritrócitos com MN	EPC/EPC+ENC
CN	48hs	3.8 ± 1.5	0.16 ± 0.01
	72hs	3.0 ± 2.3	0.1 ± 0.0
	168hs	3.0 ± 2.0	0.12 ± 0.0
0,1g/ml	48hs	4.0 ± 1.66	0.07 ± 0.03
	72hs	5 ± 7.66	0.08 ± 0.01
	168hs	14.3 ± 6.4*	0.09 ± 0.01
0,2g/ml	48hs	3.0 ± 1.0	0.01 ± 0.03*
	72hs	8.2 ± 2.1	0.09 ± 0.01
	168hs	6.0 ± 3.3	0.018 ± 0.01*
0,5g/ml	48hs	5.5 ± 4.3	0.016 ± 0.02*
	72hs	2.5 ± 1.16	0.8 ± 0.24
	168hs	2.8 ± 2.44	0.01 ± 0.02*
CP	48hs	19.5 ± 2.1*	0.01 ± 0.0*
	72hs	34.2 ± 2.5*	0.009 ± 0.0*
	168hs	30.2 ± 2.7*	0.02 ± 0.01*

TE: tempo de exposição; CN – Controle negativo; CP: controle positivo; * médias diferem do CN no mesmo TE analisado para $p < 0,05$ utilizando o teste de RM-MANOVA seguido de Tukey.

Tabela 2: Frequência de micronúcleo (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea de camundongos e a relação EPC/EPC+ENC após o TE de 168 horas de tratamento com extrato de hidroalcolico de *P. pyramidalis* em diferentes concentrações.

Tratamento	TE	EPC-MN	EPC/EPC+ENC
CN	168hs	1.0 ± 0.0	0.81 ± 0.08
0,1g/ml	168hs	0.66 ± 0.44	0.74 ± 0.18
0,2g/ml	168hs	3.16 ± 1.22	0.63 ± 0.07*
0,5g/ml	168hs	6.0 ± 1.33	0.59 ± 0.17*
CP	168hs	29.16 ± 4.1*	0.53 ± 0.08*

TE: tempo de exposição; CN – Controle negativo; CP: controle positivo; * médias diferem do CN no mesmo TE analisado para $p < 0,05$ utilizando o teste de RM-MANOVA seguido de Tukey.

Ainda são poucas as informações acerca do potencial tóxico e mutagênico de *P. pyramidalis*. Luna et al., 2005, verificaram a toxicidade do extrato etanólico da casca e

frações acetato de etila, metanólica e butanólica da planta, constatando a presença de efeitos tóxicos para os bioindicadores *Artemia salina* e *Aedes Aegypti*.

Preparações à base de plantas podem conter substâncias conhecidas por sua toxicidade. Substâncias de origem vegetal como alguns flavonoides e compostos aromáticos como estragol, safrol e metileugenol apresentam potencial mutagênico e carcinogênico (Rietjens et al., 2005) Van den Berg et al. (2011) listaram compostos de origem vegetal que possuem as características citadas, dentre eles, além dos citados, estão monoterpenos, cumarina, polifenóis, alcaloides e antraquinonas.

Entretanto, outros metabólitos secundários vegetais atuam de maneira inversa aos referidos compostos com atividade mutagênica. Ensaio realizados com espécies da mesma família de *P. pyramidalis* (Fabaceae) revelaram ausência de mutagenicidade através de diversos testes, a exemplo de *Caesalpinia ferrea* pelo teste *Salmonella/microsome assay* (Wyrepkowski et al., 2014); *Hymenaea courbaril* pelos testes SMART em *Drosophila melanogaster* e micronúcleo em camundongos (Vale et al., 2013) e *Mimosa tenuiflora* pelos testes *Salmonella/microsome assay* e micronúcleo em camundongos.

Ahmad et al. (2013) avaliaram o potencial antimutagênico de *Caesalpinia bonducella* contra genotoxicidade em linfócitos humanos e medula óssea de camundongos induzida por metil metano sulfonato. O extrato etanólico da planta reduziu significativamente as aberrações cromossômicas em até 51.75%, assim como o número de aberrações por célula *in vitro*. Resultados semelhantes aos encontrados por Silva et al., (2015) já citado anteriormente.

Os resultados na literatura e observados no presente estudo para *P. pyramidalis* mostram sua capacidade citotóxica, provavelmente pela presença elevada de flavonoides e biflavonoides, a ausência de genotoxicidade em diferentes testes e sua capacidade antimutagênica. Chaves et al., 2016, por meio do teste de capacidade de eliminar o radical DPPH, observaram a atividade antioxidante da planta em questão o que colabora para sua atividade antimutagênica logo que o estresse oxidativo está diretamente relacionado com o aumento de mutações e o desenvolvimento de doenças importantes como o câncer.

Estudos como de Sandoval et al. (2016) observaram a atividade antitumoral do extrato de *Caesalpinia spinosa* em linhagem de células tumorais de pulmão bem como o aumento dessa capacidade quando conjugado com a doxorubicina. Galotaninos também presentes em *P. pyramidalis*, foram encontrados em *C. spinosa* o que justificaria a presença de tal

atividade. Outros estudos como de Castañeda et al. (2012) e Urueña et al. (2013) observaram a mesma atividade antitumoral, o que pode indicar que espécies do Gênero *Caesalpinia* podem ter constituintes químicos com efeitos citotóxicos para células tumorais. Porém, estudos adicionais precisam ser realizados para confirmar tal atividade além de explicitar os seus mecanismos de morte celular tumoral.

1.4 Conclusão

O extrato hidroalcoólico da entrecasca de *Poincianella pyramidalis* apresentou efeito tóxico e citotóxico em ensaios toxicogenéticos *in vivo* o que sugere estudos toxicológicos adicionais em humanos devido a espécie ser utilizada como planta medicinal bem como investigar seu possível potencial antiproliferativo/antitumoral.

REFERÊNCIAS

- Agra, MF (2008). Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 8(3): 472- 508.
- Ahmad M. S., (2013). “Does *Caesalpinia bonducella* ameliorate genotoxicity? An *in vitro* study in human lymphocyte culture and *in vivo* study in Albino mice”, *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, vol. 14, no. 3, pp. 247-257.
- Bagatini, MD. (2007). Uso do sistema teste *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. 17(3): 444-447.
- Bona AP. (2012). Phytochemical and mutagenic analysis of leaves and inflorescences of *Erythrina mulungu* (Mart. Ex Benth) through micronucleus test in rodents. *Rev Bras P Med*. 14:344-51.
- Castañeda DM. (2012). A gallotannin-rich fraction from *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze displays cytotoxic activity and raises sensitivity to doxorubicin in a leukemia cell line. *BMC Complement Altern Med*. Apr 10;12:38.
- Chaves TP. (2016). Evaluation of the Interaction between the *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz Extract and Antimicrobials Using Biological and Analytical Models. *Rev Plos One* 10.1371/journal.pone.0155532.
- Cort, A. and T. Ozben. (2015). Natural product modulators to overcome multidrug resistance in cancer. *Nutr. Cancer* 2016: 1–13.
- Efferth, T. and E. Koch. (2011). Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. *Curr. Drug Targets* 12: 122–132.
- George S. (2010). Cytotoxicity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts on pancreatic cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 10:52.

- Grupta, M. (2004). Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, 94(2): 177-184.
- Hussin F. (2014). The *Centella asiatica* juice effects on DNA damage, apoptosis and gene expression in hepatocellular carcinoma (HCC). *BMC Complement. Altern. Med.* 14:32.
- Luna J. S. (2005). “A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil”, *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 97, no. 2, pp. 199–206.
- Magalhães E A. (2010). The evaluation of the genotoxic potency of the *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, Bignoneaceae, crude extract on boné marrow of mice. *Rev Bras Farmacogn.* 20:65-69 (in Portuguese).
- Maia, G. N. Catingueira. In: Maia, G. N. (2004). *Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades*. São Paulo: Leitura e Arte. p.159-169.
- Melo, I. R. B. U. (2013). The pollen of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. Is toxic to honeybees (*Apis mellifera*). *Arthropod-Plant Interactions*, 7(4): 463-466.
- Meneguetti, D. U. O. (2014). Análise citotóxica e mutagênica do extrato aquoso de *Maytenus guyanensis* klotzsch ex Reissek (celastraceae) chichuá (xixuá) amazônico. *Ciência e Natura*, 36(3): 301-309.
- Moraes GP. (2016). Grivicich I and Picada JN. Toxicogenetic profile of rats treated with aqueous extract from *Morinda citrifolia* fruits. *Journal of Medicinal Plants Research* Doi: 0.5897/JMPR2015.6017 Vol. 10(2), pp. 18-28.
- Oliveira J. C. S. (2010). Estudo químico e avaliação biológica do extrato das cascas das raízes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Leguminosae). Dissertação. Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Química.
- Poletto, P. D. O. (2012). Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (Mart. ex benth. Jf macbr: Fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*/Analysis of mutagenicity hydrossoluble extract *Derris rariflora*. *Revista Pesquisa & Criação*, 10(1): 163-176.
- Prado, D. E. As caatingas da América do Sul. In: Leal, I. R.; Tabarelli, M.; Silva, J. M. C. (2003). (Ed.). *Ecologia e conservação da caatinga*. Recife: Editora Universitária da UFPE. p. 3-74,.
- Przedpelska-Wasowicz E. M. & Wierzbika, M. (2010). Gating of aquaporins by heavy metals in *Allium cepa* L. epidermal cells. *Protoplasma*, 248(4): 663-671.
- Queiroz FMD (2013). Evaluation of (anti) genotoxic ctivities of *Phyllanthus niruri* L. in rat bone marrow using the micronucleus test. *Braz J Pharm Sci.* 49: 135-48.
- Rather, M.A., B.A. Bhat and M.A. Qurishi (2013). Multicomponent phytotherapeutic approach gaining momentum: Is the “one drug to fit all” model breaking down? *Phytomedicine* 21: 1–14.

- Rietjens I. M. (2005). "Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 574, no 1, pp. 124-138.
- Sandoval TA. (2016). Standardized Extract from *Caesalpinia spinosa* is Cytotoxic Over Cancer Stem Cells and Enhance Anticancer Activity of Doxorubicin. *Am J Chin Med.* 44(8):1693-1717.
- Sayed, M. A. (2004). Antimicrobial and Cytotoxic Effects of a Glycoside from *Caesalpinia pulcherrima* Swartz. *Journal of Medical Science*, 4(1): 15-18.
- Silva F. D. B. (2015). "Potencial citotóxico, genotóxico e citoprotetor de extratos aquosos de *Caesalpinia pyramidalis* Tul., *Caesalpinia ferrea* Mart. e *Caesalpinia pulcherrima* Sw," *Revista Brasileira de Biociências*, vol. 13, no. 2, pp.101-109.
- Speit G, Rothfuss A (2012). The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.* 314:79-90.
- Urueña C. (2013). *Caesalpinia spinosa* fraction decreases the primary tumor and factors associated with poor prognosis in a murine breast cancer model. *BMC Complement Altern Med.*
- Vale C. R. (2013). "Assessment of toxic, genotoxic, antigenotoxic, and recombinogenic activities of *Hymenaea courbaril* (Fabaceae) in *Drosophila melanogaster* and mice", *Genetics and molecular research: GMR*, vol. 12, no. 3, p. 2712.
- Van Den Berg S. J. (2011) "Levels of genotoxic and carcinogenic ingredients in plant food supplements and associated risk assessment", *Food and Nutrition Sciences*, vol. 2, no. 9, pp. 989-1010.
- Wyrepkowski C. C. (2014). "Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from *Caesalpinia ferrea* stem bark and evaluation of their mutagenic activity", *Molecules*, vol. 19, no. 10, pp. 16039-16057.



TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DIGITAL NA BIBLIOTECA
"JOSÉ ALBANO DE MACEDO"

Identificação do Tipo de Documento

- () Tese
() Dissertação
(X) Monografia
() Artigo

Eu, Alana da Silva Fervão
autorizo com base na Lei Federal nº 9.610 de 19 de Fevereiro de 1998 e na Lei nº 10.973 de 02 de dezembro de 2004, a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar, gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Panicumella pyramidalis* EM SISTEMA TESTE ANIMAL E VEGETAL de minha autoria, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, pela internet a título de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

Picos-PI 08 de junho de 2018.

Alana da Silva Fervão
Assinatura

Alana da Silva Fervão
Assinatura

