



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

INFLUÊNCIA DO BARBATIMÃO(*Stryphnodendron adstringens*)NA ANGIOGÊNESE E GENOTOXICIDADE.

Dwight Assis Chaves

GOIÂNIA-GOIÁS, 2015



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

**INFLUÊNCIA DO BARBATIMÃO(*Stryphnodendron
adstringens*)NA ANGIOGÊNESE E GENOTOXICIDADE.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Saúde, da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

Mestrando: Dwight Assis Chaves

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis

GOIÂNIA-GOIÁS, 2015

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)
(Sistema de Bibliotecas PUC Goiás)

C512i Chaves, Dwight Assis.
Influência do Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) na Angiogênese e Genotoxicidade [manuscrito] / Dwight Assis Chaves. – Goiânia, 2015.
xiv, 67 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais e Saúde, 2015.

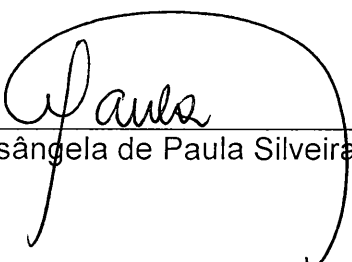
“Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis”.
Bibliografia.

1. Neovascularização. 2. Barbatimão. 3. Plantas medicinais. I. Título.

CDU 615.89(043)

DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE
DEFENDIDA EM 05 DE FEVEREIRO DE 2015 E CONSIDERADO
APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA:

1) 
Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis / PUC Goiás (Presidente)

2) 
Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda / UFG (Membro Externo)

3) 
Prof. Dr. Darlan Tavares Feitosa / PUC Goiás (Membro)

4) 
Profa. Dra. Fátima Mrué / UFG (Suplente)

DEDICATÓRIA

À minha mãe: Iolanda Lima de Assis, minha heroína, aquela a qual me ensinou a nunca desistir dos meus sonhos.

Ao meu saudoso pai: Adenor Chaves, quem deixou o maior aprendizado a minha família: o amor incondicional a Deus.

A minhas filhas Laura Verginassi Chaves e Rita de Cássia Verginassi Chaves, as quais mesmo morando longe, lembro todos os dias de minha vida com muito amor e carinho em pensamentos e orações.

Aos meus irmãos: Antonio Carlos Chaves de Assis, Maria Regina Chaves de Assis e Cardoso e João Saldanha Assis Chaves pelo exemplo de perseverança e altruísmo que me passaram em toda minha vida.

Ao meu cunhado Ademar Marques Cardoso, pela paciência e incentivo em meus estudos ao longo destes dois anos de aprendizado, às minhas cunhadas Flora e Maysa pela grande importância que nos representam em nossa família.

A todos meus sobrinhos: Alfredo, Daniele, Luzia, Alisson, Liane, Aline, Michel, Maria Augusta e José Gabriel, os quais seguem o caminho do saber com os livros como amamos em nossa família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, Aquele o qual nos dá a vida, o Qual protege meus sonhos e está ao meu lado sempre, mesmo errando ou acertando.

Ao meu orientador e amigo: Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis.

Os meus sinceros agradecimentos àqueles que diretamente e indiretamente contribuíram para esta realização deste trabalho.

À Pontifícia Universidade Católica de Goiás, à Pró-Retitoria de Pós-graduação e Pesquisa, Ao Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, na pessoa do Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Jr.

Ao Corpo Docente do Mestrando em Ciências Ambientais e Saúde,

Ao Secretário do MCAS Jader Alves Gomes.

As colegas e aos colegas do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, e ao Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos-MCAS-PUCGoiás.

Agradeço a todos pela excelente convivência e as trocas de informações técnico-científicas.

A minha amiga farmacêutica Giselle Ávilla, pela vezes que sempre se dispôs a fazer trocas de horários no meu trabalho, disponibilizando a realização deste trabalho.

Ao meu primo enfermeiro Rogério Assis Machado por suas palavras de otimismo e torcida para realização deste trabalho.

Agradeço a mestrandas Maria Alice Montes de Sousa pela sua ajuda intensa no Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos-MCAS-PUC Goiás, ajuda indispensável para todos os trabalhos do ano de 2014 e 2015. A minha amiga em vários trabalhos no laboratório: Susy Ricardo Lemes Pontes.

Aos meus professores de minha graduação de farmácia da UNIFEV (Centro Universitário de Votuporanga SP), os quais me espelharam e tenho boas lembranças. Devido as suas dedicações, sempre acreditei que ainda possa existir um mundo melhor.

À banca de defesa composta pelos Professores Doutores: Darlan Tavares Feitosa, Elisângela de P. S. Lacerda e Fátima Mrué pelas sugestões, generosidade e a oportunidade de interlocução significativa. Rendo-lhe meu agradecimento.

“A verdade vos libertará”
(João 8,32).

RESUMO

O barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) é uma planta medicinal, rica em taninos, encontrada no cerrado, a qual possui atividade anti-inflamatória, analgésica e uma atividade protetora da mucosa gástrica. Neste trabalho foram avaliadas as atividades angiogênica e antiangiogênica, genotóxica e antigenotóxica da solução aquosa da casca do Barbatimão. Dados dos estudos recentes da angiogênese utilizando a MCA de ovo de galinha para o barbatimão não foram encontrados na literatura. As cascas de barbatimão para o preparo da SAB (Solução aquosa de barbatimão) foram adquiridas na cidade de Goiânia. Foram utilizadas 30 gramas de cascas trituradas para um litro de água. As atividades angiogênica e antiangiogênica foram avaliadas pelo método experimental da membrana corioalantoide (MCA) e como controle positivo foi utilizado o produto Regederm, que apresenta atividade angiogênica conhecida. A atividade genotóxica foi avaliada a partir da solução aquosa do barbatimão utilizando como modelo experimental o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos, sendo que a atividade antigenotóxica foi avaliada pelo tratamento simultâneo da SAB e do composto sabidamente genotóxico Mitomicina C (MMC). A SAB pelos testes apresentados foi considerada angiogênica, genotóxica e não possui características antigenotóxicas na concentração testada comparada com os controles. A SAB apresentou uma elevada vascularização na MCA (50.4%) quando comparada com o controle positivo (52,9%). A dose da solução da casca de barbatimão (30 mg.ml^{-1}) analisada apresentou diferença ($p < 0,05$) na frequência de EPCMN em relação ao grupo controle negativo. Comparando a frequência de EPCMN da dose do tratamento de SAB+MMC simultâneo com o controle positivo, não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

Os resultados foram promissores, cooperando com pesquisas futuras para desenvolvimento de novos medicamentos. Percebe-se que o barbatimão apresenta princípios ativos promissores para o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos, para isso tornam-se necessários mais estudos e pesquisas para segurança do consumidor final.

Palavras chave: Angiogênese, barbatimão, genotoxicidade, planta medicinal.

ABSTRACT

The barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) is a medicinal plant, rich in tannins, found in the cerrado, which has anti-inflammatory, analgesic activity and a protective activity of gastric mucosa. In this work we evaluated the angiogenic activity and result from antiangiogenic, genotoxic and non-genotoxic of the barbatimão bark aqueous solution. Data from recent studies of the angiogenesis using the CAM of hen's egg to the barbatimão were not found in the literature. The barbatimão shells for the preparation of ASB (aqueous solution of barbatimão) were acquired in the city of Goiânia. Were used 30 grams of crushed shells to one litre of water. Angiogenic activities and result from antiangiogenic were evaluated by the experimental method of the corioalantoide membrane (CAM) and as positive control was used the Regederm product, which features angiogenic activity known. Genotoxic activity was evaluated from the barbatimão from aqueous solution using experimental model the micronucleus test in bone marrow of mice, and non-genotoxic activity was evaluated by the simultaneous treatment of the ASB and the compound known to be genotoxic Mitomycin C (MMC). The presented ASB tests, was considered genotoxic, angiogenic and features not non-genotoxic on concentration tested compared with the controls. The ASB presented a high vascularization in MCA (50.4) compared with the positive control (52.9). The dose of the barbatimão's peel solution (30 mg.ml⁻¹) analyzed presented difference ($p < 0,05$) at the EPCMN frequency relative to the negative control group. Comparing the frequency of dose EPCMN SABMMC concurrent treatment with the positive control, there was no significant difference ($p > 0,05$).

The results were promising, cooperating with future research for developing new medicines. It is noticed that the genus presents promising active principles for the development of new herbal medicines, that becomes necessary more studies and research for consumer safety.

Key words: Angiogenesis, barbatimão, genotoxicity, medicinal plant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição do Bioma Cerrado na América do Sul	22
Figura 2: <i>Barbatimão</i> (<i>Stryphnodendron adstringens</i>) – árvore com galhos e folhas verdes e flores.....	25
Figura 3: Casca do tronco do <i>Barbatimão</i> (<i>Stryphnodendron adstringens</i>).....	26
Figura 4: <i>Barbatimão</i> (<i>Stryphnodendron adstringens</i>) – Detalhes dos galhos e da semente	27
Figura 5: <i>Barbatimão</i> (<i>Stryphnodendron adstringens</i>). – Detalhes de uma árvore, tronco, galhos e folhas	27
Figura 6: Inter-relações entre angiogênese e inflamação	30
Figura 7: Etapas do processo angiogênico	31
Figura 8: Desenho esquemático destacando o aspecto morfológico das alterações metanucleares.....	32
Figura 9: Formação da célula micronucleada contendo um fragmento cromatídico acêntrico.....	33
Figura 10: Membrana corioalantoidea do ovo embrionado de galinha.....	40
Figura 11: Situação da rede vascular formada na CAM após o tratamento, com solução aquosa de barbatimão juntamente com os controles.....	46
Figura 12 A: Detalhes da abertura de 1,0 cm de diâmetro na casca do ovo.....	47
Figura 12 B: Visão da rede vascular da CAM no 16º dia desenvolvimento, bem como, o papel filtro que foi embebecido com a substância teste)	47
Figura 13: As secções de parafina corados com hematoxilina-eosina.....	48
Figura 14: O tratamento com a SAB mostra vasos bem organizado.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Situação de desmatamento no cerrado, por estado, no período de 2002 a 2008	21
Tabela 2: Porcentagem de vascularização obtida com tratamento de solução aquosa de barbatimão e controles	45
Tabela 3: Frequência de MNEPCe relação entre EPC/ENC após 24 horas do tratamento com solução aquosa de barbatimão e controles	49
Tabela 4: Frequência de MNEPC e relação entre EPC/ENC após tratamento simultâneo com MMC e da solução aquosa do barbatimão	50
Gráfico 1: Gráfico Boxplot, com respectivos valores da membrana corioalantóide após tratamento com a solução aquosa de barbatimão e controles	46
Quadro I: Propriedades medicinais dos taninos e outros	20

LISTA DE ABREVIações

* Controle negativo

** Controle Positivo

= Igual

® Marca registrada

α Alfa

β Beta

μ Microlitro

AFB1 Aflatoxina B1

Afgb Fator Ácido de Crescimento de Fibroblatos

AKT Quinase/Serina Treonina

AZS Azida Sódica

bFGB Fator Básico de Crescimento de Fibroblatos

CINC2 $\alpha\beta$ Citocina tipo 2 $\alpha\beta$

COX Ciclo-Oxigenase

DNAácido desoxirribonucléico

DV Desvio Padrão

EGF Fator de Crescimento Epidérmico

GST Glutathionas S-Transferases

HIF Fator Induzido por Hipóxia

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBAMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IL-1b Interleucina tipo 1b

IL-6 Interleucina tipo 6

Kg Quilograma

MCA Membrana Corioalantóide

mg miligrama

ml mililitro

MMC Mitomicina

MN Micronúcleo

MNEPC Eritrócito Policromático Micronucleado

NCE Eritrócito Normocromático
NFkB Fator Nuclear Kappa B
NPD 4-o-nitrofenilenodiamina
OMS Organização Mundial da Saúde
PCE Eritrócitos Policromáticos
PECAM Molécula de Adesão Plaqueta-Célula Endotelial
PDGF Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
SF Fator de Cicatrização
SAB Solução aquosa de barbatimão
TGF Fator de Transformação do Crescimento
TNF Fator de Necrose Tumoral
VEGF Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VVO Organelas Vesículo – Vacuolar
PMV: Porcentagem Média de Vascularização
RD: Retinopatia Diabética
RNA: ácido ribonucleico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 Plantas medicinais	19
2.1.1 Taninos.....	20
2.2 Cerrado	21
2.3 Barbatimão (<i>Stryphnodendron adstringens</i>).....	24
2.4 Angiogênese e antiangiogênese.	28
2.5 Testes do Micronúcleo em medula óssea de roedores <i>in vivo</i>	31
2.6 Atividade Genotóxica de Plantas Medicinais	34
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 Geral.....	38
3.2 Objetivos específicos	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Avaliação da atividade angiogênica na MCA	39
4.1.1 Solução aquosa da Casca do barbatimão.....	39
4.1.2 Ovos embrionados de galinha.....	39
4.1.3 Controles e reagentes (Angiogênese)	39
4.1.4 Procedimento Experimental (Atividade angiogênica)	40
4.1.5 Obtenção da imagem e mensuração automatizada da rede vascular.....	41
4.1.6 Análise estatística	41
4.2 Teste do micronúcleo	42
4.2.1 Solução aquosa da Casca do barbatimão.....	42
4.2.2 Animais da experimentação	42
4.2.3 Aprovação em Comitê de Ética	42
4.2.4 Controles e reagentes (Teste do micronúcleo).....	42
4.2.5 Procedimento Experimental (Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongo).	43
4.2.6 Análise Citogenética.....	44
4.2.7 Análise estatística	44

5 RESULTADOS.....	45
5.1 Atividade angiogênica	45
5.1.1 Análises histológicas	47
5.2 Atividade genotóxica e antigenotóxica	49
6 DISCUSSÃO	51
6.1 Atividade Angiogênica.....	51
6.2 Teste do micronúcleo	52
7 CONCLUSÕES	55
8 BIBLIOGRAFIA	56

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, os primeiros relatos sobre o uso de fitoterápicos estão ligados a cultura indígena(MARTIUS,1844).

Em países com rica biodiversidade e conhecimentos tradicionais, como é o caso do Brasil, há grande utilização de plantas medicinais pelos nativos.O Ministério do Ambiente estima que populações indígenas brasileiras dominem o uso de 1300 plantas medicinais (SILVEIRA,2003).

A biodiversidade brasileira é considerada a maior do mundo, adicionada à diversidade étnica e cultural detém um grandioso conhecimento associado a plantas medicinais, devido a suas várias vantagens (MINISTÉRIO DA SAÚDE2006).

Cerca de 1/3 da população mundial faz o uso de plantas medicinais em tratamentos, por vários aspectos que as tornam desejáveis como: baixo valor comparado aos fármacos, baixo risco, reprodutibilidade e constância de seus efeitos. Essas vêm sendo de maneira expressiva usadas na assistência primária, conseguindo ótimos resultados em vários países do novo e antigo Continentes, devido à presença de substâncias que auxiliam em tratamento preventivo e curativo, tais como: taninos, alcaloides, compostos fenólicos, óleos essenciais e vitaminas(VIEIRA *et al.*, 2007).

Nos dias atuais plantasmedicinais movem altos valores financeiros no mundo todo, representando um tratamento acessível para aproximadamente 80% da população, principalmente nos países em desenvolvimento. Os métodos de eficácia e segurança de plantas medicinais estão relacionados à qualidade: serem corretamente identificadas, cultivadas e coletadas, estarem livres de material estranho, contaminação orgânica/microbiana, partes de outra planta (MOREIRA,2010).

O poder de aliviar e curar enfermidades na população também é dado às plantas medicinais, que têm o seu uso preventivo e também o uso no combate a enfermidades já instaladas. É necessário saber a verdadeira procedência da planta, como fazer a colheita e, principalmente, como prepará-la. Isso, devido a efeitos adversos e até mesmo tóxicos, que podem ocasionar quando preparamos sem saber a medida exata do extrato com seu diluente.No Brasil os medicamentos

fitoterápicos industrializados devem ser registrados na ANVISA, antes de serem comercializados(FITOTERÁPICOS, Vigilância Sanitária).

Desde tempos remotos o uso de plantas medicinais foi um dos principais recursos com fins terapêuticos para tratamento na área de saúde dos povos, com avanços no âmbito das ciências da saúde, novas maneiras de cura surgiram. O uso de medicamentos industrializados foi introduzido no cotidiano das pessoas modernas. Desde então, o uso de medicamentos alopáticos cresceu em todo o planeta(BADKE,2011).

Uma grande quantidade de plantas com poder medicinal é empregada no tratamento de diferentes enfermidades. Entre as várias plantas com poder terapêutico o barbatimão ocupa uma posição de destaque, como o efeito de cicatrização em ferida cutâneas. A principal matéria prima para formulação do fitoterápico é a casca, sendo que existem vários testes descritos na literatura como na apresentação farmacológica de extratos fluídos (EURIDES *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 2009; BARROSO *et al.*, 2010), cremes (COELHO *et al.*, 2010; LIMA, 2010) e pomadas (HERNANDES *et al.*, 2010).

Estudos etnobotânicos sobre sua história terapêutica apontam que o barbatimão foi inserido na lista da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) junto às espécies vegetais com potencial medicinal de interesse ao SUS, (2014).

Nos meados dos anos 80 o interesse pelos vegetais aumentou consideravelmente, principalmente devido aos avanços tecnológicos, que permitiram o desenvolvimento de métodos com a finalidade de isolar substâncias ativas a partir de recursos naturais (RATES, 2001).

Já se conhece na literatura que produtos de origem vegetal apresentam substâncias indutoras de angiogênese (WANG *et al.*, 2004). Com a alta tecnologia já é possível observar a existência de inúmeros biomateriais com a capacidade de promover a angiogênese. Entre estes, podemos citar cremes que induzem a cicatrização de feridas, como exemplo: a Regederm® (PELE NOVA, 2014).

A angiogênese é o processo pelo qual novos vasos sanguíneos são formados por brotamento, a partir de pequenos vasos pré-existentes em adultos ou em tecidos embrionários, ou por divisão intravascular (intussuscepção). Processo de órgão específico que depende do estágio da microvasculatura local (RISAU, 1997).

Alguns fatores pró e anti-angiogênicos têm a função de regular a formação de novos vasos sanguíneos, isso ocorre tanto em processos fisiológicos como patológicos(ZHANG *et al.*, 2011).

A angiogênese patológica tem como uma das principais características a neovascularização maléfica (como no caso das retinopatias proliferativas) ou excessiva (como nos tumores), entretanto, a angiogênese fisiológica tem sua formação durante a embriogênese, ciclo reprodutivo da mulher e crescimento dos tecidos dentre outros(FOLKMAN, 1987).

As vênulas terminais e os capilares venososapresentam pequeno calibre com células endoteliais sobre a lâmina basal abrigadas por pericitos e células musculares lisas. A quebra das ligações entre células desta camada corresponde a um dos primeiros processos regulatórios da resposta angiogênica. As células endoteliais ativadas produzem enzimas proteolíticas que gera um processo que expressa moléculas de adesão na superfície celular(HELLSTON,2001).

Dentre os diversos testes de curta duração existente, destaca-se o Teste de Micronúcleo em roedores, realizado no presente estudo. A formação do micronúcleo resulta de uma lise na molécula de DNA, após a ação de carcinógenos quando as células da camada basal estão em divisão (STICH,1983;1984).

Os estudos que avaliam as atividades genotóxica e antigenotóxica da maioria dos vegetais e de seus compostos bioativos isolados ainda são considerados abaixo do necessário. Já se percebe uma variedade de testes *in vivo* e *in vitro* que detectam compostos genotóxicos e identificam substâncias de risco a saúde humana. Estes mesmos testes são usados para detectar agentes antigenotóxicos e contribuir para a redução das alterações genômicas que possivelmente induzem ao aparecimento de doenças (AMES, 1993; SILVEIRA *et al.*, 2008).

Os MNs(micronúcleos) são constituídos de fragmentos de cromátides ou cromossomos acêntricos ou aberrantes, que não foram anexados no núcleo principal após a conclusão da mitose(BELIEN, 1995; BENNER, 1994).

O teste de micronúcleo é amplamente utilizado para a procura de danos genotóxicos em populações expostas a substâncias mutagênicas e carginogênicas. A quantidade de MNs constatada em um determinado momento pode ser considerada como resposta notória entre a atividade genotóxica e a eficiência do mecanismo fisiológico de defesa do organismo teste(MERSCH *et al.*, 1996).

Devido à utilização do extrato do barbatimão pela população e também à presença das atividades farmacológicas e biológicas descritas na literatura (SILVA *et al.*, 2010), os principais objetivos para a realização deste trabalho, foi avaliar os efeitos da solução aquosa de barbatimão em ovos embrionados de galinha e camundongos, observando possíveis atividades angiogênica/antiangiogênica, genotóxica e antigenotóxica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais são utilizadas na preparação de remédios. Folhas de chá e várias espécies cultivadas por empresas farmacêuticas, para a produção de medicamentos industrializados, são classificadas como plantas medicinais. Apenas passando por rigorosos estudos científicos é possível afirmar ou não as ações medicamentosas de uma planta, transformando-a em medicamentos eficaz e seguro. Os “*princípios ativos*” ou *fitofármacos* são ações farmacológicas de plantas medicinais causadas pela presença de substâncias químicas. São exemplos de fitofármacos: a digoxina, obtida das folhas da dedaleira (*Digitalis lanata*, Família Escrofulariaceae), sendo está usada no tratamento de insuficiência cardíaca; o flavonoide quercetina, usado no tratamento de varizes e hemorroidas; isolado da faveira (*Dimorphandra* sp., Fabaceae), planta nativa do cerrado brasileiro. Os *fitoterápicos* são medicamentos preparados a partir de plantas medicinais que geralmente apresenta o custo mais barato, nesses o princípio ativo encontra-se agregado a outras substâncias da própria planta, sob a forma de extrato. No Brasil a Organização Mundial da Saúde incentiva o desenvolvimento desses produtos devido ao custo alto desses medicamentos, sendo o país rico em *biodiversidade* (SOARES,2011).

As substâncias ativas das plantas medicinais são classificadas como: produtos de metabolismo primário (essencialmente sacarídeos) se formam em todas as plantas verdes, devido a fotossíntese; metabolismo secundário ocorre a assimilação do azoto (nitrogênio amínico). De contrapartida esses produtos parecem ser inúteis a planta, mas as suas propriedades terapêuticas são notáveis (ROCHA, 1998).

Plantas venenosas ou tóxicas possuem princípios ativos os quais provocam intoxicações nos seres humanos ou em animais. A diferença entre plantas medicinais e plantas tóxicas está nos seus efeitos causados no organismo através de seus princípios ativos. Os princípios ativos são extraídos dos órgãos das plantas medicinais por métodos indicados pela farmacologia, usando esses no preparo de remédios vegetais ou fitoterápicos (ACCORSI, 1994).

A natureza química da droga é definida pela proporção de substâncias referentes aos seguintes grupos principais (Quadro I): alcalóides, glucosídeos, saponinas, princípios amargos, taninos, substâncias aromáticas, óleos essenciais e terpenos, óleos gordos, glucoquininas, mucilagens vegetais, hormonas e anti-sépticos vegetais (ROCHA 1998).

A característica terapêutica predominante para que o barbatimão apresente propriedades medicinais é atribuída principalmente ao grupo dos taninos (LIMA, 2010).

Quadro I: Propriedades medicinais dos taninos e outros

ALCALÓIDES	Atuam no sistema nervoso central (calmante, sedativo, estimulante, anestésico, analgésicos). Alguns podem ser cancerígenos e outros antitumorais. Ex.: Cafeína do café e guaraná, teobromina do cacau, pilocarpina do jaborandi, etc.
MUCILAGENS	Cicatrizante, anti-inflamatório, laxativo, expectorante e antiespasmódico. Ex.: babosa e confrei.
FLAVONÓIDES	Anti-inflamatório, fortalece os vasos capilares, antiesclerótico, anti-dematoso, dilatador de coronárias, espasmolítico, anti-hepatotóxico, colerético e antimicrobiano. Ex.: rutina (em arruda e favela).
TANINOS	Adstringentes e antimicrobianos (antidiarréico). Precipitam proteínas. Ex.: barbatimão e goiabeira.
ÓLEOS ESSENCIAIS	Bactericida, antivirótico, cicatrizante, analgésico, relaxante, expectorante e antiespasmódico. Ex.: mentol nas hortelãs, timol no tomilho e alecrim pimenta, ascaridol na erva-de-santa-maria, etc.

Fonte: (BARRACA, 1999) apud (MARTINS, 1995).

2.1.1 Taninos

Os taninos são substâncias de composição química variável com a propriedade de coagular as albuminas, os metais pesados e os alcalóides. Possui uma natureza adstringente, tem o poder de coagular as albuminas das mucosas e dos tecidos, formando assim uma camada de coagulação nas albuminas das mucosas e dos tecidos e uma camada de coagulação protetora e isoladora, cujo poder é reduzir a dor e a irritabilidade, bloqueando pequenas hemorragias.

Preparações à base de taninos na maioria das vezes são usadas: externamente contra as inflamações da cavidade bucal; inflamações dérmicas; catarros; transpiração excessiva; bronquite; hemorróidas locais; hemorragias locais; feridas; queimaduras; frieiras. Para o uso interno são usadas em casos de catarro

intestinal; diarreia; afecções da vesícula, assim como antídoto nos envenenamentos por alcaloides vegetais (ROCHA, 1998).

Este trabalho visa contribuir como base de pesquisas futuras sobre: as propriedades medicinais do barbatimão.

2.2 Cerrado

Com perdas da cobertura vegetal o cerrado se torna um dos biomas brasileiros mais ameaçados (Tabela 1). Os fatores de riscos: as queimadas, os incêndios, os desmatamentos, provocam alteração na paisagem, transformando totalmente o cerrado, promovendo à destruição de habitats, a extinção das espécies, a invasão de espécies exóticas, a poluição dos aquíferos. O desmatamento das cabeceiras dos rios gerando assoreamento dos rios, dentre outros prejuízos. A chegada da agricultura mecanizada e o plantio direto, em curso há quatro décadas na região, levou à perda da metade da área original nativa. Isso, devido ao cultivo das terras com técnicas modernas como: correção do pH com calcário, envenenamento de nascentes com uso descontrolado de venenos e outras. Com a entrada dos transgênicos isso aumentou mais ainda. A velocidade do desmatamento ocorrido é maior do que a própria Mata Atlântica e a Amazônia (PPCERRADO, 2009).

Tabela 1: Situação de desmatamento no cerrado, por estado, no período de 2002 a 2008.

UF	Área de Cerrado (Km ²)	Área desmatada 2002-2008(Km ²)	Área desmatada 2002-2008(%)
Maranhão	212.092	22.739	11
Bahia	151.348	14.596	10
Mato Grosso	358.837	21.556	6
Minas Gerais	333.710	20.042	6
Piauí	93.424	5.438	6
Tocantins	252.799	14.076	6
Mato Grosso do Sul	216.015	11.663	5
Goiás	329.595	15.967	5
Paraná	3.742	75	2
Rondônia	452	8	2
São Paulo	81.137	1.326	2
Distrito Federal	5.802	78	1

Fonte: Segundo os Mapas dos Biomas Brasileiros do IBGE.

O cerrado brasileiro (figura 1) ocupa aproximadamente 24% do nosso território, sendo isso expresso em: 2.036.448 km². A área de maior significância abrange o Distrito Federal e dez estados: Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Maranhão, Bahia, Piauí, Minas Gerais, São Paulo e Paraná. O cerrado abrange lugares mais distantes e isolados em quase todo o país. Lugares importantes como: Campos de Humaitá de Campos do Puciarí(Amazonas), Serra dos Pacaás Novos (Rondônia), Serra do Cachimbo (Pará) e Chapada Diamantina(Bahia),(PPCERRADO, 2009).



Figura1: Distribuição do Bioma Cerrado na América do Sul.

Fonte: Ministério do Meio Ambiente, Plano de Ação para Prevenção e Controle do Desmatamento e das Queimadas no Cerrado – (PPCERRADO, 2009).

A grande diversidade biótica do Cerrado é um considerável reflexo da variedade de solos e climas associados (DIAS, 1996; COUTINHO, 1978). Observam-

se duas formações principais: as herbáceas e as arbóreas (RIZZINI, 1963, COUTINHO, 1978), as quais respondem contrariamente a outros fatores climáticos como vento e fogo. Em relação a sua hidrografia, o Cerrado encontra-se recortado pelas bacias do Amazonas, Tocantins, Paraná, Paraguai, São Francisco e Parnaíba. Nasce ainda no cerrado as nascentes das bacias Platina, Amazônica e Franciscana (DIAS, 1996).

Encontra-se no cerrado elevada riqueza de espécies, com plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós, totalizando 11.627 espécies nativas sendo que aproximadamente 44%, são flora endêmica (MENDONÇA *et al.* 2008). Esta grandeza de diversidades deve-se principalmente a alternância de ambientes existentes, vários tipos de solos, relevo e fisionomias. São descritos onze tipos principais de vegetação para o bioma Cerrado, enquadrados em formações florestais (Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão), savânicas (Cerrado sentido restrito, Parque de Cerrado, Palmeiral e Vereda) e campestres (Campo sujo, Campo limpo e Campo rupestre (RIBEIRO & WALTER, 2008).

Considerando também os subtipos neste sistema são reconhecidos 25 tipos de vegetação (RIBEIRO & WALTER, 2008).

O barbatimão é uma espécie muito comum do cerrado, sendo encontrado nas comunidades rurais da região norte do estado de Minas Gerais e, devido ao seu valor medicinal, é muito utilizado nas empresas de reflorestamento em áreas degradadas. Com o barbatimão, várias pessoas nestas comunidades conseguem, a partir dele, vários outros produtos fundamentais para sua subsistência, os quais são comercializados e consumidos como fitoterápicos originados a partir de suas cascas e sua madeira (LORENZI & MATOS, 2008).

Segundo Pereira (1992), várias plantas úteis do Cerrado fazem parte de costumes regionais e tradições. Entre elas várias são utilizadas como produtos industrializados. Entre vários grupos, o das plantas medicinais, calcula-se que aproximadamente 100 espécies são empregadas na cura e prevenção de doenças. Muitas plantas do Cerrado tem o valor terapêutico comprovado cientificamente. Entre essas plantas, segundo Rizzini & Mors (1995), encontra-se o barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*).

Uma grande quantidade de espécies de animais habita a região do cerrado, aproximadamente 320.000 espécies. Uma posição de destaque se dá aos insetos,

que tem cerca de 90.000 espécies. Isso representa 28% de toda biota do Cerrado(PPCERRADO, 2009).

Das 12 regiões hidrográficas brasileiras(cf. Resolução CONAMA nº32/2003), seis têm nascentes no Cerrado. São elas: a região hidrográfica do Amazonas (rios Xingu, Madeira), do Tocantins/Araguaia, do Parnaíba, do Atlântico Norte Oriental (rio Itapecuru), do São Francisco (rios São Francisco, Pará, Paraopeba, das Velhas, Jequitaí, Paracatu, Urucuia, Carinhanha, Corrente e Grande), do Atlântico Leste (rios Pardo e Jequitinhonha), do Paraná (rios Paranaíba, Grande, Sucuriú, Verde e Pardo) e do Alto Paraguai (rios Cuiabá, São Lourenço, Taquari e Aquidauana)(PPCERRADO, 2009).

O Ministério do Meio Ambiente calcula através do Projeto Probio, projetando imagens de satélite de 2002, que o desmatamento no cerrado foi de cerca de 80 milhões de hectares (39%). Desse total desmatado (23,5% do bioma) estavam ocupados por pastagens cultivadas principalmente destinada à criação de gado, e 21,56 milhões de hectares (10,5% do bioma) por culturas agrícolas como: soja, milho, sorgo, feijão, trigo, cana-de-açúcar e outras. Calcula-se que estas porcentagens tenham mudado, devido ao aumento do principalmente do preço da soja em determinada épocas devido a quebra de safra nos EUA, aumentando assim a área de cultura agrícolas (SANO *et al.*, 2007, 2008).

2.3 Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*).

Existem cinco espécies de barbatimão, os quais estão em todas regiões do país, principalmente no Cerrado: *Stryphnodendron adstringens*, *S. obovatum*, *S. polyphyllum*, *S. coriaceum* e *S. rotundifolium* (OCCHIONI, 1990).

Sua floração ocorre de setembro a novembro. Se frutifica entre os meses de novembro a junho, os frutos são vagens cilíndricas, indeiscentes, de 6-9 cm de comprimento, com várias sementes de coloração verde, quando imaturos, e de cor parda quando maduros (MEIRA, 2013).

Apesar de produzir muitas sementes, são poucas as sementes que prosperam, podendo chegar a árvore adulta (figura 5).

As sementes (figura 4) da *S. adstringens* possuem dormência tegumentar, uma estratégia às condições ambientais adversas, característica muito comum em

plantas de Cerrado (FELFILI *et al.*, 2002). Existem técnicas para a superação da dormência da *S. adstringens* como escarificação mecânica, escarificação ácida e choques térmicos (MARTINS *et al.*, 2008).

A espécie tem preferência por solos arenosos e de drenagem rápida, como os das encostas suaves e topos de morros, tanto formações primárias como secundárias. Está entre as espécies mais citadas pelas comunidades do Cerrado para tratamentos das enfermidades (LORENZI 1992, 2000; FELFILI & BORGES-FILHO, 2004).

O comércio utilizando cascas de barbatimão (figura 3) pelos agricultores é fundamental para o acréscimo na renda mensal destas famílias. Todavia, com a exploração extrativista sem controle a extinção da planta em algumas áreas já pode ser observada (SOUZA & FELFILI, 2006). Isso prejudica os extrativistas tendo eles, em alguns casos, que se deslocarem por distâncias maiores para encontrarem a planta, aumentando os custos, dificultando assim a aquisição da matéria-prima para a própria subsistência (GONÇALVES *et al.*, 2012).



Figura 2: Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*)—árvore com galhos e folhas verdes e flores.

O uso do barbatimão (figura 2) na medicina popular mais comum pela população é o extrato da casca, sendo também usado, mas, em menor escala, o

extrato da casca triturada. Tem ele um poder medicinal popular muito considerado pelos nossos ancestrais para o tratamento de leucorreia, diarreia, hemorragia, hemorroida, feridas, conjuntivite, inflamação da garganta, corrimento vaginal e úlcera gástrica(SILVA *et al.*, 2010). Possui outras propriedades importantes como o curtimento da pele, na fabricação de tintas, na indústria madeireira e como planta ornamental (LIMA *et al.*, 2010). Mas, entre os principais efeitos medicinais atribuídos a essa planta destacam-se o seu poder cicatrizante (EURIDES *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 2009; HERNANDES *et al.*, 2010; LIMA, 2010).O uso das folhas, cascas e raízes para formulação de estratos é bastante conhecido na medicina popular(SILVA *et al.*, 2010).

A casca (figura 3) do tronco é a principal matéria-prima usada para o desenvolvimento de produtos medicinais. No processo de cicatrização cutânea, os taninos que são encontrados na composição do barbatimão têm a capacidade de formar pontes de hidrogênio ou ligações hidrofóbicas duradouras com proteínas, polissacarídeos ou ambos. Com isso, ocorre a formação do complexo taninoproteína ou tanino-polissacarídeo, que por serem insolúveis em água formam uma camada protetora, crosta, sobre a lesão. Abaixo da camada o processo de cicatrização ocorre naturalmente (HASLAM, 1996; LIMA *et al.*, 2010).



Figura 3: Casca do tronco do Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*).



Figura 4: Barbatimão(*Stryphnodendron adstringens*) – Detalhes dos galhos e da semente



Figura 5: Barbatimão(*Stryphnodendron adstringens*). – Detalhes de uma árvore, tronco, galhos e folhas.

Fonte: <http://www.tuasaude.com/barbatimao>

2.4 Angiogênese e antiangiogênese.

Angiogênese é definido como a formação de novos vasos sanguíneos por um processo de germinação de brotos endoteliais a partir de vasos capilares preexistentes (HANAHAHAN& FOLKMAN, 1996).

A angiogênese está ligada a vários processos fisiológicos como a menstruação, ovulação, formação do corpo lúteo, nidação, glândula mamária durante a lactação, morfogênese, cicatrização de feridas. Quando praticamos exercícios físicos, o coração aumenta o fluxo sanguíneo e contração, a angiogênese repercute favoravelmente promovendo a ramificação vascular das coronárias, melhorando ainda mais o fluxo sanguíneo e a força de contração. Está presente também nos processos patológicos como artropatias crônicas, inflamação crônica, psoríase, retinopatia diabética, degeneração macular, angiofibroma, hemangioma, glaucoma vascular, crescimento tumoral, disseminação metastática e desenvolvimento de placa de ateroma (HANAHAHAN& FOLKMAN, 1996; VILLE, 1995, FOLKMAN, 1971, 1976).

O modo como os agentes etiopatogênicos agredem o nosso organismo e os sistemas naturais de defesa reagem de algumas doenças são determinadas pela resposta angiogênica persistente. Isso ocorre devido a uma deficiência dos inibidores da angiogênese, ou um aumento significativo dos mediadores angiogênicos, como por exemplo: neoplasias, metástases, psoríase e artrite reumatoide, entre outras (VAN, 1993; JOHNSON, 2001; BLAAUWGEERS, 1999).

Algumas situações a angiogênese é regulada com períodos de ativação e inibição. Algumas doenças oculares como a RD (Retinopatia Diabética), o glaucoma neovascular, as oclusões vasculares, a retinopatia da prematuridade e a degeneração macular relacionada à idade também apresentam alteração da angiogênese (SENGER, 1983; SHIMA, 1995).

Folkman, em 1971, sugeriu que o controle da angiogênese poderia ser útil no controle do crescimento tumoral. Esse conceito de antiangiogênese foi aplicado a outras doenças e vem sendo estudado extensivamente nos últimos anos.

A ruptura da integridade vascular, o endotélio disponibiliza vários fatores, entre eles o Von Willebrand, as prostaglandinas e as citocininas, gera a ativação da angiogênese. O Von Willebrand tem a função de ativar as plaquetas, que por sua

vez liberam o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fatores de transformação do crescimento alfa e beta (TGF α e TGF β), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento dos fibroblastos (FCF), que ativam a angiogênese e a via intrínseca da coagulação. Outro fator importante para ativação de célula endoteliais como os neutrófilos, monócitos, linfócitos, fibroblastos e células endoteliais. São as prostaglandinas que são liberadas pelo endotélio vascular. Os neutrófilos iniciam a ação fagocitária com intuito de destruir bactérias e elementos estranhos. Os monócitos já são responsáveis pela ativação dos linfócitos, responsáveis pela liberação de citocininas TGF β , interleucina-II e interferon gama. Já a responsabilidade desíntese de colágeno fica por fibroblastos. Um grande destaque da ativação da angiogênese está na formação de novos vasos sanguíneos, que reconstituem o fluxo sanguíneo local e propiciam o transporte de nutrientes para o tecido (VARGAS *et al.*, 2007; NAGAI, 2002).

A angiogênese (figura 6) é um processo biológico que envolve grande intercomunicação entre as células, fatores solúveis e componentes da matriz extracelular (LIEKENS *et al.*, 2001). Processo este é controlado pelo balanço entre a produção e a secreção de moléculas que possuem atividade regulatória positiva (fatores angiogênicos) e negativa (fatores anti-angiogênicos) (PEPPER, 1983). A estabilidade entre a produção de substâncias endógenas pró e anti-angiogênicas pode ser quebrada por fatores químicos e físicos (injúria tissular, hipóxia, liberação de citocinas) ou mecânicos (alterações no fluxo sanguíneo e no formato celular) (INGBER, 1998).

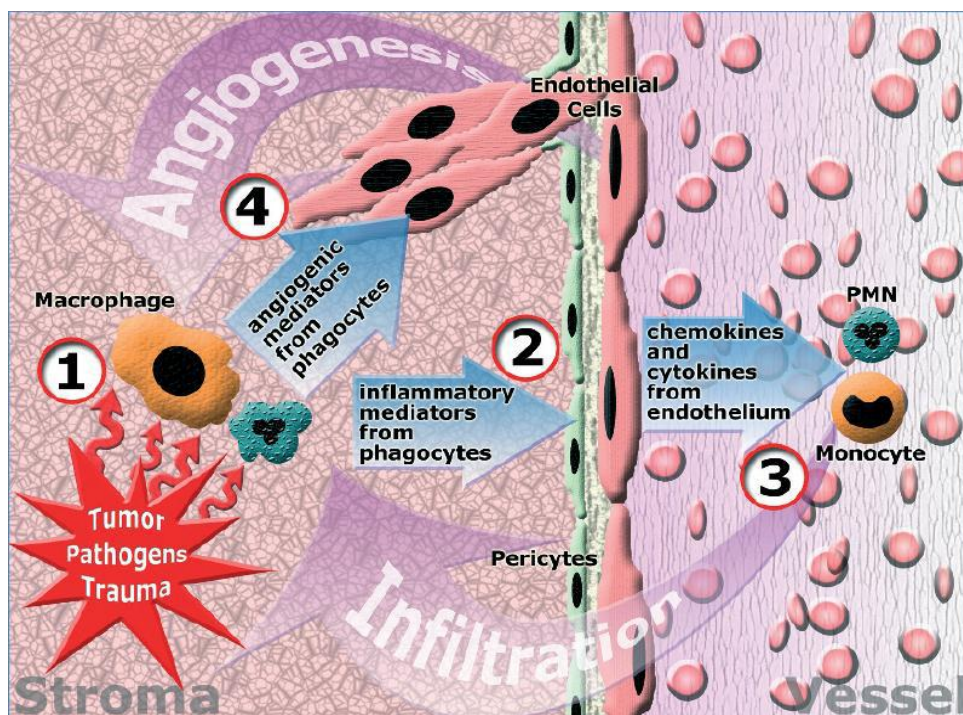


Figura 6: Inter-relações entre angiogênese e inflamação. (1) Diferentes estímulos (proliferação de células tumorais, necrose e apoptose) causam ativação de macrófagos residentes e outros fagócitos causando a liberação de mediadores pró-inflamatórios. (2) Estes fatores derivados de fagócitos estimulam as células endoteliais a produzirem moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas. (3) Moléculas de adesão e fatores solúveis do endotélio ativado recrutam e estimulam fagócitos circulantes que aumentam o infiltrado de células. (4) Fagócitos ativados estimulam a remodelação tecidual, liberando fatores que provêm o crescimento e migração de células endoteliais para a formação de novos vasos.

Fonte: (Castro 2012 p.6 apud ALBINI, 2005).

A desregulação na angiogênese está associada ao crescimento de tumores e em doenças angioproliferativas (FOLKMAN, 1995; PANDYA *et al.*, 2006). No entanto, o estímulo farmacológico da angiogênese pode ser benéfico em situações clínicas na qual a ativação da angiogênese é terapeuticamente necessária, tais como na reparação de feridas e na isquemia (DETILLIEUX *et al.*, 2003; SARLON *et al.*, 2011).

O estímulo da angiogênese (figura 7) por fármacos pode ser usado para acelerar cicatrização e o reparo tecidual, promovendo o crescimento de vasos sanguíneos nos tecidos isquêmicos (HEILMANN *et al.*, 2002; DETILLIEUX *et al.*, 2003). Neste estudo foi investigado o efeito pró-angiogênico e anti-angiogênico do extrato de barbatimão no modelo da CAM, pois estudos recentes da angiogênese utilizando a MCA de ovo de galinha para o barbatimão não foram encontrados na literatura.

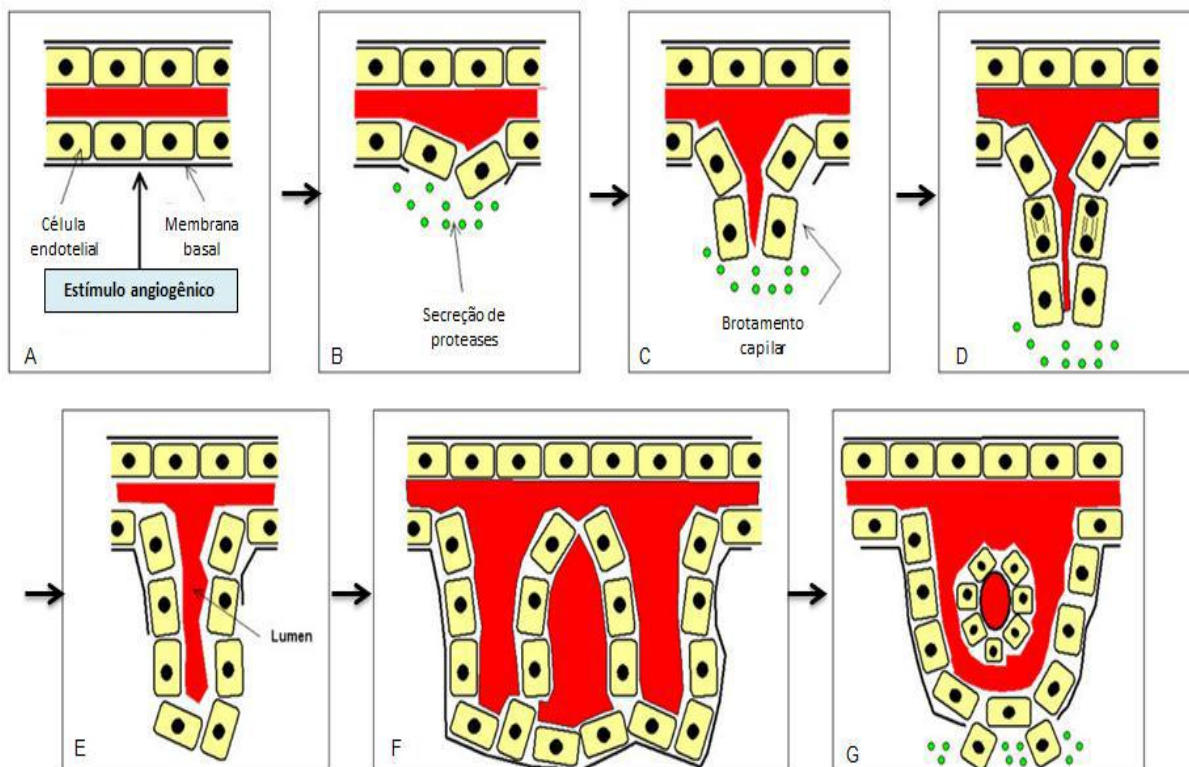


Figura 7: Etapas do processo angiogênico. (A) Ativação de células endoteliais por um estímulo pró-angiogênico. (B) As células endoteliais secretam proteases que degradam a membrana basal e matriz extracelular. (C) Um broto capilar é formado como resultado de uma migração celular direcionada. (D) O crescimento do vaso ocorre por meio de mitoses e migração de células endoteliais. (E) Um lúmen é formado, bem como uma nova membrana basal. (F) Dois brotos se unem para formar uma alça capilar. (G) Uma segunda geração de brotos capilares começa a se formar.

Fonte: (CASTRO, 2012 apud Grizzi et al., 2005).

2.5 Testes do Micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*

Micronúcleos são pequenas quantidades de cromatina originada de restos cromossômicos ou cromossomos inteiros, que são abortados durante a anáfase na divisão celular, devido aos eventos clastogênicos ou aneugênicos, estes podem ser formados por ações externas como: agentes químicos, físicos e biológicos com estrutura não genômicas, que causam alterações na maquinaria mitótica e falha no desmembramento dos cromossomos. Os micronúcleos se originam a partir da ação dos agentes, um ou vários por célula, que resultam fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos que se retardam em relação aos demais em migração para os polos da célula durante a anáfase (SCHIMID, 1975; RABELLO-GAY, 1991; AL-SABTI, 1995; FENECH, 2000; SOUZA & FONTANELLI, 2006).

O FDA (*Food and Drug Administration*) órgão governamental dos Estados Unidos da América responsável por testes e estudos minuciosos a novos fármacos

antes de terem a sua comercialização aprovada, possuem uma cartilha para regulamentação de testes de genotoxicidade para a indústria farmacêutica norte-americana (*Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals*), a qual define Micronúcleo (figura 8) como: partícula microscopicamente detectável contendo DNA nuclear, podendo conter parte ou todo um cromossomo (FDA, 2014).

O teste do micronúcleo é abundantemente utilizado pra o acompanhamento de danos genotóxicos em populações expostas a substâncias mutagênicas e carcinogênicas. A frequência de MN analisada em um determinado momento pode ser apontada complexa entre a atividade genotóxica e a eficiência do mecanismo fisiológico de defesa do organismo teste (MERSCH *et al.*,1996).

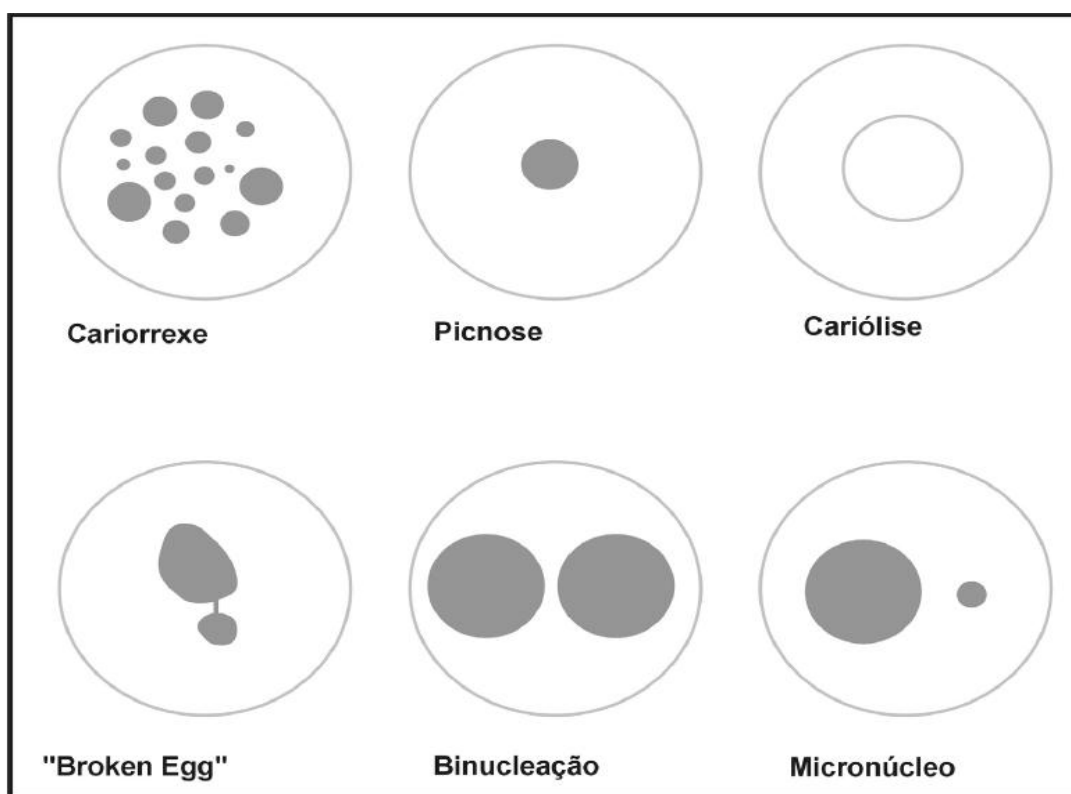


Figura 8:Desenho esquemático destacando o aspecto morfológico das alterações metanucleares.
Fonte: (CARRARD, 2007)

Uma importante explicação para danos que um agente do meio ambiente pode estar causando no processo de divisão celular do tecido acometido pode ser a presença de micronúcleo(figura 9) nas células, afetando o DNA tecidual, e consequentemente predeterminando ao desenvolvimento de câncer (VINE, 1990). Sendo assim, podemos utilizar o Teste de Micronúcleos para avaliarmos e identificarmos vários fatores que possam trazer danos ao DNA de diferentes tecidos,

se transformando em doenças de difícil tratamento, tendo a melhor escolha: a exclusão dos fatores que se predisõem a isso.

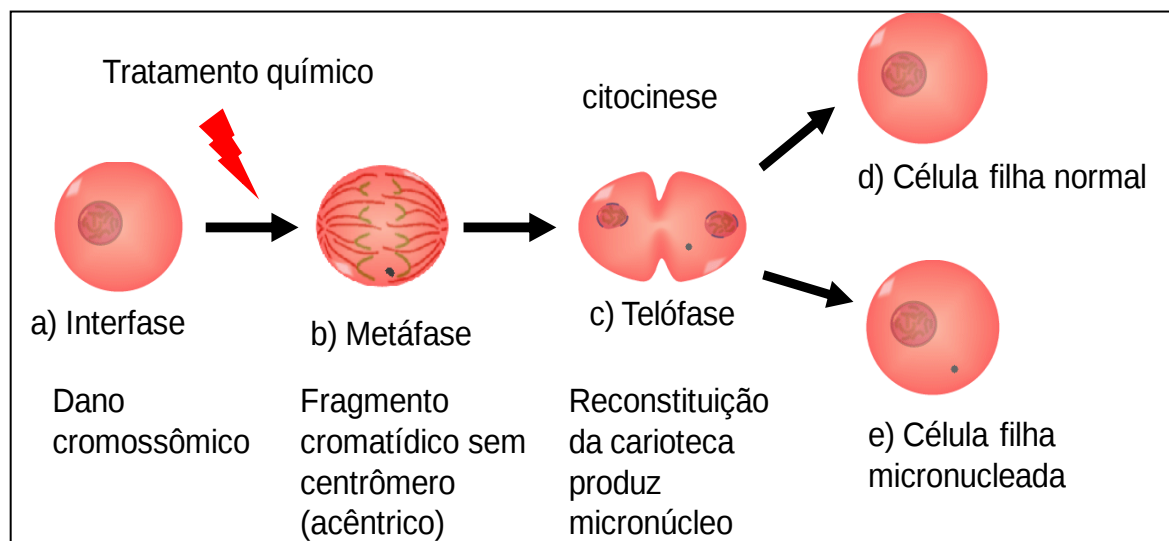


Figura 9: Formação da célula micronucleada contendo um fragmento cromatídico acêntrico. A indução ao dano estrutura cromossômico na interfase, (a) resultando na formação de um fragmento cromatídico sem centrômero (acêntrico), pode ser visualizado quando os cromossomos são condensados na metáfase (b) da mitose. A reconstituição da membrana nuclear ao redor do fragmento cromatídico produz um micronúcleo (c), o qual pode ser quantificado na célula filha formada após a divisão (e).

Fonte: Esquema desenvolvido segundo Ribeiro *et al.* (2003), em PowerPoint® 2007, da Microsoft®.

O objetivo do teste do micronúcleo em medula óssea, MO, de camundongos é detectar e quantificar a ação de substâncias indutoras de mutagênese e/ou antimutagênese. Em todo o mundo, o teste de MN tem sido amplamente utilizado na análise do potencial genotóxico de agentes físicos e químicos (DING *et al.*, 2003, CHUNG *et al.*, 2002) no biomonitoramento de populações humanas ocupacionalmente expostas a agentes mutagênicos (BOLOGNESI *et al.*, 2004) em estudos de compostos inibidores de carcinogênese (ROY *et al.*, 2003) e em estudos ecotoxicológicos (LORENT *et al.*, 2002). Por ser um método de baixo custo e bastante eficaz, vários pesquisadores do mundo utilizam-no em grande escala (ROSEFORT *et al.*, 2004).

O teste do micronúcleo é bastante utilizado para a realização de teste genotóxicos utilizando eritrócitos, células do fígado e células dos tecidos das brânquias de peixes. O teste de MN está sendo muito utilizado em peixes para indicar o índice de contaminação existente nas bacias hidrográficas em geral (MANNA e SADHUKHAN, 1986; Al-SABTI & MECALFE, 1995; MINISSI *et al.*, 1996;

AYLLÓN& GARCIA-VAZQUEZ, 2001; GRISOLIA, 2002; CAVAS& ERGENE-GOZUKARA, 2003).

Kim & Hyun (2006) chama para o perigo de alguns experimentos onde o fato de a deficiência de folato e vitamina B12 provocarem um aumento da formação de MN.

Devido a uma gama de investimentos da indústria farmacêutica, que agrega custo e benefício em pesquisas de plantas medicinais, há um crescente aumento de fitoterápicos pelas populações, em virtude de suas propriedades farmacológicas e biológicas, algumas já descritas na literatura, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos e antígenotóxicos da solução aquosa do barbatimão.

2.6 Atividade Genotóxica de Plantas Medicinais

Toda informação genética dos organismos vivos se encontra armazenada nos ácidos nucleicos (DNA e RNA), sendo especificada pela sequência de bases nitrogenadas. Esta informação é repassada de célula a célula durante o desenvolvimento e de geração a geração durante a reprodução, pela grande precisão do processo de replicação. Por não ser um fenômeno estático, essa transmissão ocasionalmente sofre mudança ou mutações, produzindo uma variabilidade genética, que fornece a matéria prima para a evolução (SNUSTAD & SIMMONS, 2001).

A fixação do material genético de geração para geração origina-se da conservação das taxas de mutação em níveis mínimos. Constantemente os organismos vivos são expostos a agentes ambientais que podem causar modificações químicas tanto ao nível celular quanto molecular. Sendo que estas lesões podem ser induzidas por agentes físicos, químicos ou biológicos, totalmente prejudiciais às células, sendo que afetam processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica, conseguindo causar alterações permanentes no DNA (mutações) e aberrações cromossômicas, os quais levam a processos cancerosos e morte celular (WATSON *et al.*, 2006).

Durante o processo de evolução, as plantas acrescentaram recursos naturais que lhes garantem defesa, como exemplo a produção de substâncias químicas, tóxicas e genotóxicas contra ataques de bactérias, fungos, insetos e animais

predadores (CASTRO *et al.*, 2004). Chás e infusões de determinadas plantas medicinais apresentam substâncias tóxicas de efeitos mutagênicos. Entretanto o consumo dos mesmos pode reduzir efeitos de agentes mutagênicos que estejam atuando sobre o organismo humano. (BAGATINI *et al.*, 2007).

Referentes a propriedades de plantas medicinais sabe-se que várias substâncias foram descritas na literatura como mutagênicas e carcinogênicas. Dentre elas estão as hidrazinas, flavonoides, furocumarinas, quinonas, alcalóides de pirrolozidina, glicosídeos cardiotônicos e teobrominas (KHAN *et al.*, 2005; MEI *et al.*, 2005). Entretanto, algumas substâncias, como os alcaloides, apesar de sua conhecida genotoxicidade, apresentam alto potencial farmacológico através de atividades antimicrobiana, antiplasmodial e antitumoral (FREDERICH *et al.*, 1999).

A maioria dos compostos antígenotóxicos presentes em alimentos, têm como função antioxidante agindo no sequestro de radicais livres de oxigênio (COSTA, 2012; GUTERRES, 2008).

Estudos recentes demonstram que a queda no consumo de frutas está ligada ao aparecimento de lesões no DNA, pois a redução de compostos naturais, como a vitamina C, influencia na predisposição de reparo do DNA causando o aparecimento dessas lesões (SLYSKOVA *et al.*, 2014).

Um composto é dado como mutagênico quando tem o potencial de aumentar a taxa de mutação em um organismo além da espontânea. Podemos definir uma mutação como uma variação estável e herdável numa sequência nucleotídica do DNA, de modo que estas variações podem ser cromossômicas ou gênicas. As mudanças cromossômicas podem estar relacionadas à estrutura cromossômica, com resultados de deleções, duplicações, inversões e translocações maiores, ou ao número de cromossomos, devido a falhas na citocinese. As mutações gênicas são consequências devidas à substituição de bases (transições e transversões); frameshifts (mudança no quadro de leitura); ou inserções, deleções e translocações. (GATEHOUSE *et al.*, 1990).

A grande influência que os agentes genotóxicos exercem sobre as mutações das células somáticas e/ou germinativas são inúmeras, podendo acelerar ou aumentar o processo. Para que isso ocorra, o agente deve ser transportado e ter contato com a célula, a fim de ser capaz de ativar metabólitos e danificar o DNA. Contrariando este processo as células de um organismo pluricelular reagem ao dano provocado, numa tentativa de corrigir as agressões sofridas. Mecanismo este

conhecido por processo de reparo ao DNA. Entretanto, se o dano for retirado antes da divisão, a célula restabelece a integridade do DNA e as funções são preservadas. Se a divisão celular acontecer antes do processo de reparo, o DNA replicará, podendo haver proliferação celular com as modificações, neste exemplo, a mutação será incorporada permanentemente na sequência do DNA (BROWN *et al.*, 1994).

Sendo assim, os agentes que causam mutações são denominados genotóxicos, apesar de nem todos os agentes genotóxicos serem mutagênicos (VOGEL, 1989).

Os agentes genotóxicos e/ou mutagênicos possuem uma grande relevância na avaliação do potencial carcinogênico, pois os mecanismos de mutagênese e carcinogênese, pois estão intrinsecamente relacionados (RIBEIRO *et al.*, 2003).

A carcinogênese compreende a mutação sequencial de genes controladores de crescimento, expansão clonal e progressão das células, resultando em células pré-neoplásicas e neoplásicas. A mutação normalmente é adquirida através do contato do indivíduo com mutagenos. Esta exposição é constante e compreende mutagenos endógenos e exógenos ou ambientais (MOUSTACCHI, 2000).

A principal via de porta de entrada de mutágenos para as substâncias originadas das plantas medicinais é a via oral, através de chás, infusões e outros preparados. Entretanto, a maioria destas substâncias ainda não foram estudadas, no que se refere ao potencial citotóxico e mutagênicos, sendo necessário conhecer as propriedades e atividades biológicas das plantas de uso medicinal, garantindo o uso de plantas medicinais com segurança (BAGATINI *et al.*, 2007).

Vários testes são realizados para prevenir o efeito adverso em plantas medicinais pela triagem de seu potencial genotóxico. São eles testes rápidos, realizados especialmente com bactérias, drosófila, camundongos (teste de micronúcleo) e cultura de células (CUNHA, 1995).

Anualmente, aproximadamente 12,7 milhões de indivíduos são diagnosticados com câncer em todo o mundo sendo que 59,8% (7,6 milhões) vão a óbito. No Brasil, são esperados 576.580 novos casos de câncer para 2014, sendo 17,06% (98.420) casos novos de câncer de pele e 11,9% (688000) casos de câncer de próstata (INCA 2014). Dados da União Internacional contra o Câncer – UICC, estima-se um total de 26 milhões de novos casos e aproximadamente 65,3% (17 milhões de mortes até 2030 sendo que uma porcentagem maior é esperada para os países em desenvolvimento (UICC, 2008).

Sendo que certas plantas utilizadas pela população podem apresentar atividades genotóxicas, é oportuno a realização de pesquisas inovando o conhecer sobre genotoxicidade dessas plantas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar as atividades angiogênica, antiangiogênica, genotóxica e antigenotóxica da solução aquosa da casca do barbatimão(*Stryphnodendron adstringens*).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade angiogênica da solução aquosa da casca do barbatimão utilizando como modelo experimental a membrana corioalantoide de ovo embrionado de galinha (*Gallus domesticus*).
- Avaliar a atividade antiangiogênica da solução aquosa da casca do barbatimão utilizando como modelo experimental a membrana corioalantoide de ovo embrionado de galinha (*Gallus domesticus*).
- Avaliar a atividade genotóxica da solução aquosa da casca do barbatimão, utilizando como modelo experimental o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos.
- Avaliar a atividade antigenotóxica da solução aquosa da casca do barbatimão, pelo tratamento simultâneo do extrato da planta e de composto sabidamente genotóxico Mitomicina C (MMC), utilizando-se o teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Avaliação da atividade angiogênica na MCA

4.1.1 Solução aquosa da Casca do barbatimão

A casca de Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) foi adquirida na cidade de Goiânia-GO, no Império das Raízes, Av. Tocantins n:840, Setor Central, lote: 22112, data de fracionamento: 12/2013. Validade: 12 meses.

Solução aquosa de barbatimão para a avaliação da atividade angiogênica na MCA foi preparada no Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos-MCAS-PUC Goiás. Foi usada 30g da casca triturada para um litro de água. Para a realização dos testes, a SAB foi utilizada na concentração de 30mg mL^{-1} .

4.1.2 Ovos embrionados de galinha

Foram utilizados 100 ovos férteis de galinha (*Gallus domesticus*) linhagem Rhoss, adquiridos em uma granja: (Chácara São Domingos), Vale das Pombas, estrada velha para Bela Vista km 9, Aparecida de Goiânia.

Sendo um número de 14 ovos para o controle positivo (Regederm), 14 ovos para o controle negativo (água), 14 ovos para a SAB e 14 ovos para o controle inibidor (dexametasona), totalizando um número de 56 ovos, e tendo assim um descarte de 44 ovos, os quais se apresentaram danificados antes do 16º dia.

4.1.3 Controles e reagentes (Angiogênese)

- a) Controle negativo –Água para injeção conteúdo 10mL, Eurofarma. Lote: 329981.
- b) Controle inibidor - Solução de dexametasona 4mg.mL^{-1} – ($\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{FO}_5$) - Aché Laboratórios Farmacêuticos, Lote nº 2.668.
- c) Controle positivo: Regederm, lote: 00085925, Fab: 05/2013, Val: 05/2015.
- d) Formaldeído 37% - Rioquímica Ltda – Lote n. 0402296.

4.1.4 Procedimento Experimental (Atividade angiogênica)

A atividade angiogênica da solução aquosa do barbatimão foi analisada na membrana corioalantoide (CAM) do ovo embrionado de galinha (figura 10) nos meses de abril de 2014 e maio de 2014 no Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos, do Mestrado de Ciências Ambientais e Saúde, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Os ovos foram incubados em estufa automática durante os cinco dias a 37° C ($\pm 1^\circ$ C) e com umidade entre 60 e 70% para a formação da MCA (RIBATTI *et al*, 1996). No quinto dia de incubação foi realizada na casca do ovo em sua base maior, uma abertura circular de 1,0 cm de diâmetro, com auxílio de um micro retífica “Dremel”. Posteriormente, foi retirada a membrana da casca com o objetivo de expor a MCA e os ovos novamente incubados nas mesmas condições. Na figura 1, mostra a forma da abertura na casca do ovo.

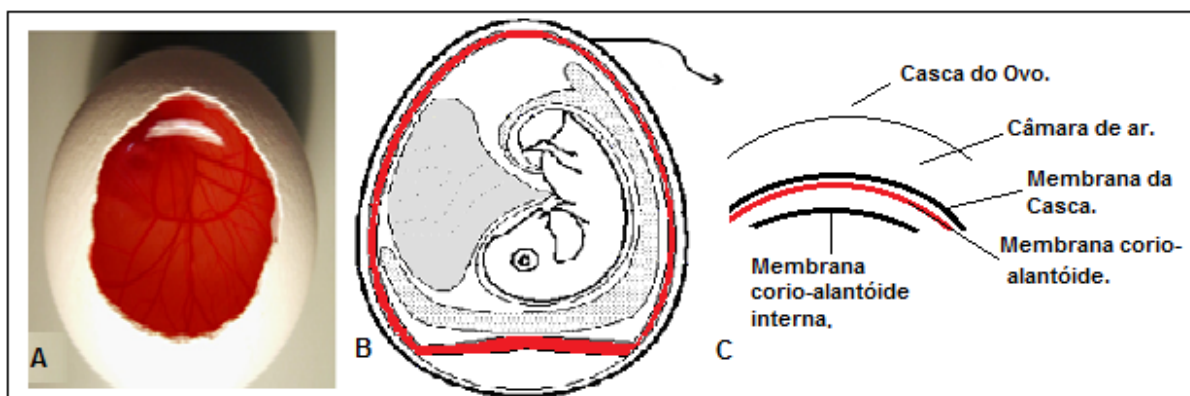


Figura 10: Membrana corioalantoide do ovo embrionado de galinha. A figura A apresenta imagem da abertura da casca do ovo de galinha e exibe a CAM vascularizada. A figura B apresenta em vermelho a extensão da CAM no ovo embrionado e a Figura C, esquema ilustrativo das membranas que constituem o ovo embrionado de galinha.

Fonte: As Figuras B e C foram elaboradas em PowerPoint 2007 (Microsoft), de acordo com informações de Vargaset *al.*, (2007).

No quinto dia de incubação foi realizada, na casca do ovo, em sua base maior, uma abertura circular de 1,0 cm de diâmetro, com auxílio de uma micro retífica Dremel. Posteriormente, foi retirada a membrana da casca com o objetivo de expor a MCA e os ovos novamente incubados nas mesmas condições, segundo técnica de ensaio recomendada (RIBATTI *et al*, 1996).

Ao final do 13° dia de incubação, 14 discos de papel de filtro estéreis, com diâmetro 5 mm cada, foram embebidos com de solução aquosa de barbatimão na

concentração de 30g.ml^{-1} , juntamente com controles positivo (Regederm), negativo (água) e inibidor (dexametasona). Os materiais (teste e controles) foram colocadas diretamente sobre a membrana corioalantoide, permanecendo até o 16° dia.

No 16° dia, as MCAs foram fixadas em solução de formol (3,7 % v/v) por 10 minutos, cortadas detalhadamente e mantidas em placa de Petri com solução de formol.

4.1.5 Obtenção da imagem e mensuração automatizada da rede vascular

As membranas corioalantóide foram fotografadas sobre um fundo azul claro, em tamanho 640X480 pixels e formato de RGB 24 *bites*, padronizados com objetivo de analisar e quantificar a rede vascular formada.

A imagem capturada foi analisada e a da rede vascular neoformada foi quantificação. A quantificação da rede vascular foi realizada por meio da determinação da área percentual de cada ensaio. Foram utilizados os programas *Gimp for Windows (version 2.8)* e *Imagem J (versão 1.49)*. As imagens foram preparadas de forma que a saturação, brilho e contraste permitiram uma melhor resolução dos vasos sanguíneos que foram quantificados em *pixels* correspondentes.

4.1.6 Análise estatística

Para analisar a atividade angiogênica da solução aquosa do barbatimão as percentagens das áreas obtidas da MCA dos grupos tratados e controles foram comparados por Krushal-Wallis (análise de variância) e, posteriormente por comparação múltipla (Tukey Test). A diferença entre as médias foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$).

4.2 Teste do micronúcleo

4.2.1 Solução aquosa da Casca do barbatimão.

A casca de Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) foi adquirida na cidade de Goiânia-GO, no Império das Raízes, Av. Tocantins n:840, Setor Central, lote: 22112, data de fracionamento: 12/2013. Validade: 12 meses.

Solução aquosa de barbatimão utilizada para o teste do micronúcleo foi preparada no Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos-MCAS-PUC Goiás. Foi usada 30g da casca triturada para um litro de água. Para a realização dos testes, a SAB foi utilizada na concentração de 30mg mL⁻¹.

4.2.2 Animais da experimentação

Para realizar o teste do micronúcleo foram utilizados 20 camundongos, saudáveis, oriundos do Biotério Pontifícia Universidade Católica de Goiás, apresentando peso corpóreo entre de 25,0 ± 2,5 g e faixa etária entre 50 e 70 dias, na data do experimento. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de polipropileno, com piso sólido, forradas com maravalha esterilizada, conforme padrões internacionais. Os animais foram acomodados em ambiente com temperatura média de 24±2°C e umidade relativa de 55±5%; com ciclo de claro-escuro de 12 horas e tiveram água e alimentação *ad libitum*.

Foi utilizada a mitomicina C (MMC) como controle positivo.

4.2.3 Aprovação em Comitê de Ética

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, protocolo nº 003-1.

4.2.4 Controles e reagentes (Teste do micronúcleo).

Reagentes e Soluções (Teste do micronúcleo).

- *Solubilização das células*

- Soro fetal bovino de Laborclin Produtos para Laboratórios.

- *Corante*

- Corante para células hematológicas segundo Leishman (eosina, azul de metileno), preparados no LAS-CBB.

- *Controles*

Controle positivo

- Mitomicina C (MMC), Bristol-Myers Squibb

Solução de Mitomicina C

Mitomicina C 5mg

- Lote nº360.170.2
- Fabricação: 26/03/2013
- Validade: 28/02/2015

Controle negativo

- Água destilada estéril

4.2.5 Procedimento Experimental (Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongo).

Os camundongos foram divididos em grupos de cinco animais cada. Foram tratados, intraperitoneal, com solução aquosa de barbatimão na concentração de 30 mg.ml⁻¹, no tempo de 24 horas. O grupo controle negativo foi tratado com água destilada estéril, enquanto que o grupo controle positivo recebeu dose única intraperitoneal de 4 mg.kg⁻¹ correspondendo a 80% da DL⁵⁰ de mitomicina C. Para a avaliação da antigenotoxicidade, foram administradas as doses de 30 mg.ml⁻¹ de solução aquosa de barbatimão concomitantemente com dose de 4 mg.kg⁻¹ de MMC, intraperitoneal (HEDDLE, 1983, 1991).

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os fêmures retirados. As epífises do fêmur foram cortadas e a medula óssea lavada com 1 ml de soro fetal bovino. Após homogeneização da medula no soro, esta foi centrifugada a 300 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi parcialmente descartado. O precipitado de células foi homogeneizado e uma gota de suspensão celular foi transferida para a lâmina de vidro onde foi confeccionado o esfregaço celular. Após secagem das lâminas, estas foram fixadas em metanol absoluto durante 5 minutos e coradas em solução corante de Leishman, por um período de 15 minutos (HEDDLE, 1973). Após este período, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar em temperatura ambiente. As contagens dos esfregaços foram realizadas pelo procedimento “duplo-cego”.

4.2.6 Análise Citogenética

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de luz comum Nikon, com a finalidade de se detectar possíveis alterações e/ou perdas cromossômicas (micronúcleos) nos eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. As células foram visualizadas em objetiva de imersão (100x) e ocular (10x), usando duas lâminas para cada animal, avaliando-se 1000 EPC por lâmina. Foi utilizada a média de duas lâminas como resultados. Para a avaliação da citotoxicidade, foram contados até 1.000 eritrócitos normocromáticos (ENC), e a razão EPC/ENC foi determinada conforme (SCHMID, 1975).

4.2.7 Análise estatística

As frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em 1.000 EPC de cada grupo foram comparadas em relação ao grupo controle negativo ou positivo pelo teste de ANOVA e todos os pares foram comparados pelo teste de Friedman. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

As frequências de EPC e ENC de cada grupo tratado com a solução aquosa foram comparadas com o grupo controle negativo ou positivo pelo teste Método de *Student-Newman-Keulse* foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Atividade angiogênica

Os resultados obtidos da porcentagem de vascularização na CAM após o tratamento com a solução aquosa de barbatimão juntamente com os controles negativo, indutor e inibidor estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 2: Porcentagem de vascularização obtida com tratamento de solução aquosa de barbatimão e controles.

Identificação numérica das CAM's	Contrôle Positivo – Regederm	Contrôle Negativo H ₂ O	Contrôle inibidor Dexametasona	S.A de Barbatimão
1	49,6	33,4	9,6	51,3
2	52,2	32,1	15,3	54,7
3	56,5	40,1	14,8	50,2
4	59,4	33,9	12,8	49,5
5	55,6	29,4	11,5	45,1
6	52,5	37,6	11,9	48,2
7	60,1	28,3	10,8	47,4
8	54,9	35,9	14,2	52,8
9	56,4	32,3	10,2	50,9
10	48,5	30,7	11,9	51,7
11	48,6	29,4	14,5	50,9
12	48,9	29,3	12,1	49,7
13	50,2	32,1	11,3	48,9
14	47,2	36,2	9,2	54,3
Média	52,9%	32,9%	12,2%	50,4%
DP*	4,2	3,5	1,9	2,6

* DP = Desvio Padrão

Observou-se que a solução aquosa de barbatimão apresentou aumento da porcentagem da rede vascular formada (atividade angiogênica) em relação ao controle negativo ($p < 0,05$) e também do inibidor ($p < 0,05$) (figura 11). Entretanto, quando comparado ao controle positivo não foram constatadas diferenças significativas entre as porcentagens da rede vascular (figura 11) formada entre o extrato de barbatimão. Portanto, a solução aquosa de barbatimão e o controle positivo apresentaram aumento significativo da área porcentagem da rede vascular formada quanto comparadas ao controle negativo e inibidor. Observou-se também

que o controle inibidorapresentou significativa redução da vascularização da MCA em relação ao controle negativo ($p<0,005$). As imagens apresentadas na figura 11 mostram a formação da rede vascular nos controles e no tratamento com solução aquosa de barbatimão.

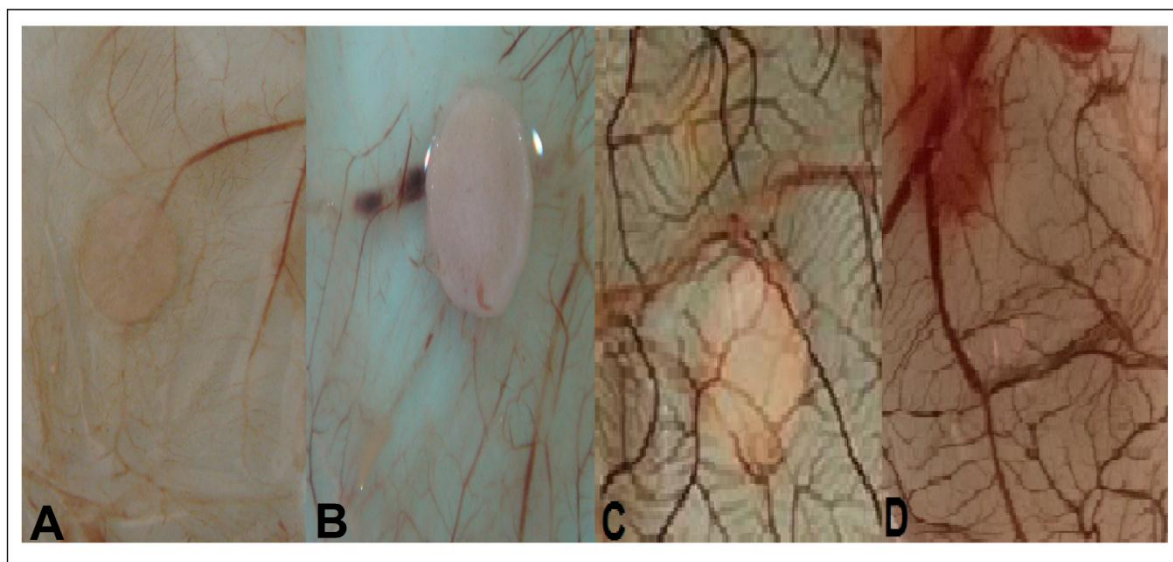


Figura 11: Situação da rede vascular formada na CAM após o tratamento, com solução aquosa de barbatimão juntamente com os controles: A – Controle inibidor. B - Controle negativo. C – Controle positivo (Regederm). D – Teste (Solução aquosa do Barbatimão).

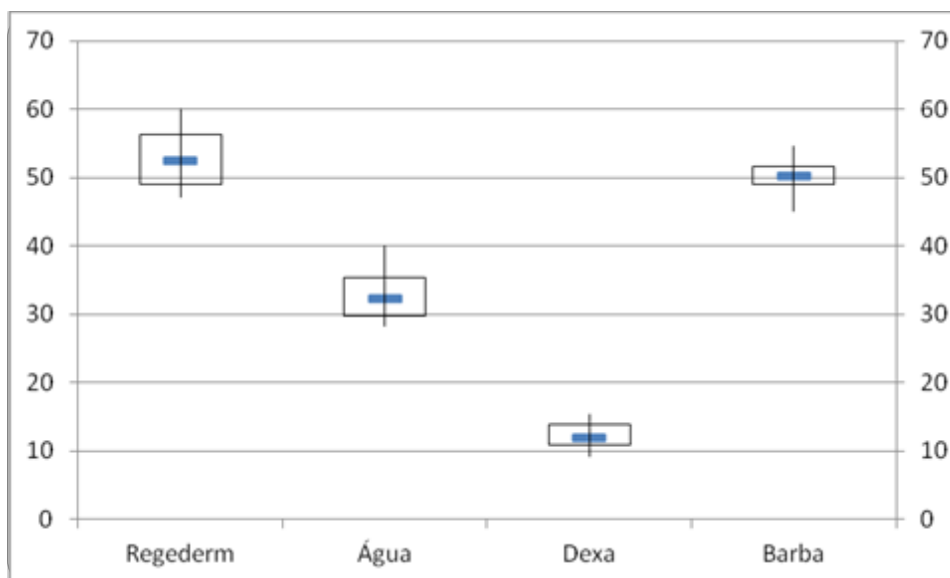


Gráfico 1: Gráfico Boxplot, com respectivos valores da membrana corioalantóide após tratamento com a solução aquosa de barbatimão e controles.

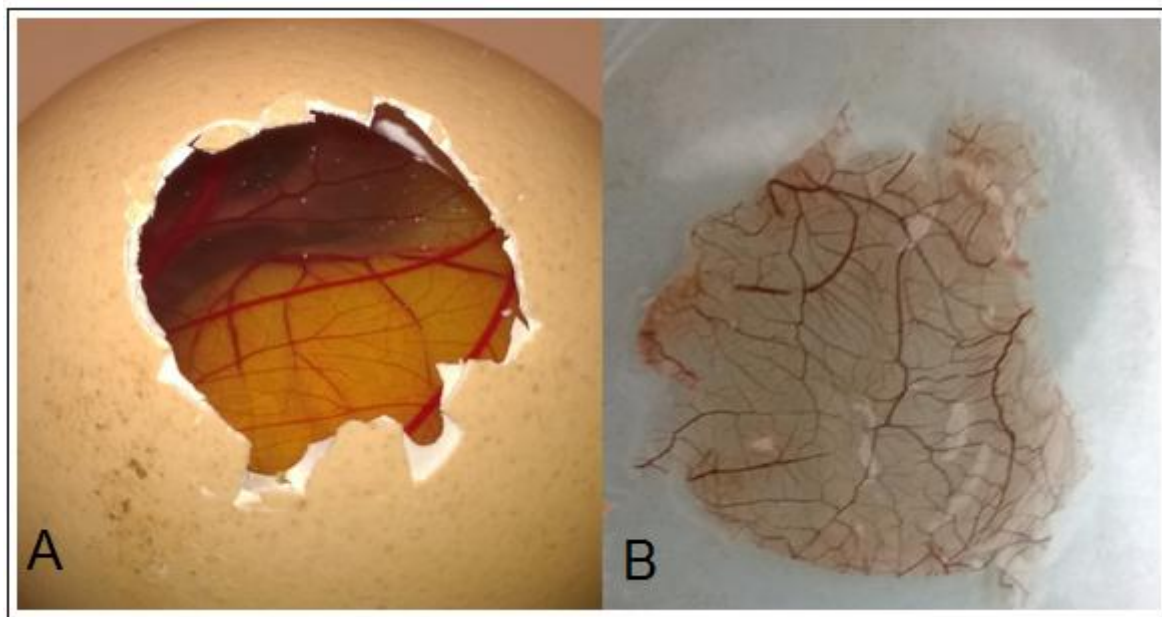


Figura 12

A: Detalhes da abertura de 1,0 cm de diâmetro na casca do ovo, apresentação da CAM vascularizada
B: Visão da rede vascular da CAM no 16º dia desenvolvimento da SAB.

5.1.1 Análises histológicas

As imagens da análise histológica são expressas na Figura 13. A figura apresenta uma formação de rede vascular em diferentes grupos controles (inibidor e positivo) e no grupo do tratamento com SAB na concentração de 30mg mL^{-1} .

Observa-se a presença de tecido conjuntivo, elementos inflamatórios e vasos sanguíneos bem formados que exibem na luz vascular eritroblastos (Figura:14).

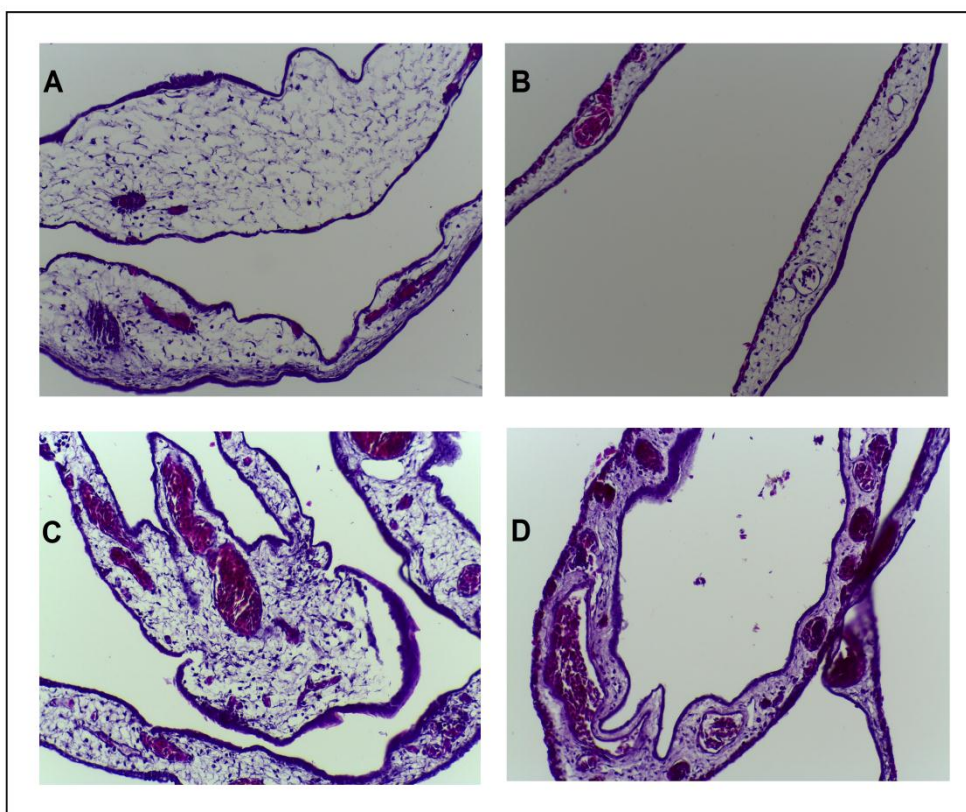


Figura13: As secções de parafina corados com hematoxilina-eosina. Controle inibidor (dexametasona) mostra poucas células do tecido conjuntivo e também poucos vasos sanguíneos (A). Controle negativo (B). Controle positivo (Regederm) mostra vasos sanguíneos recém-formados e elementos inflamatórios (C). SAB mostra vasos sanguíneos formados e muitos eritrócitos nucleados (D). (A,B,C e D, microscópio aumento 20x).

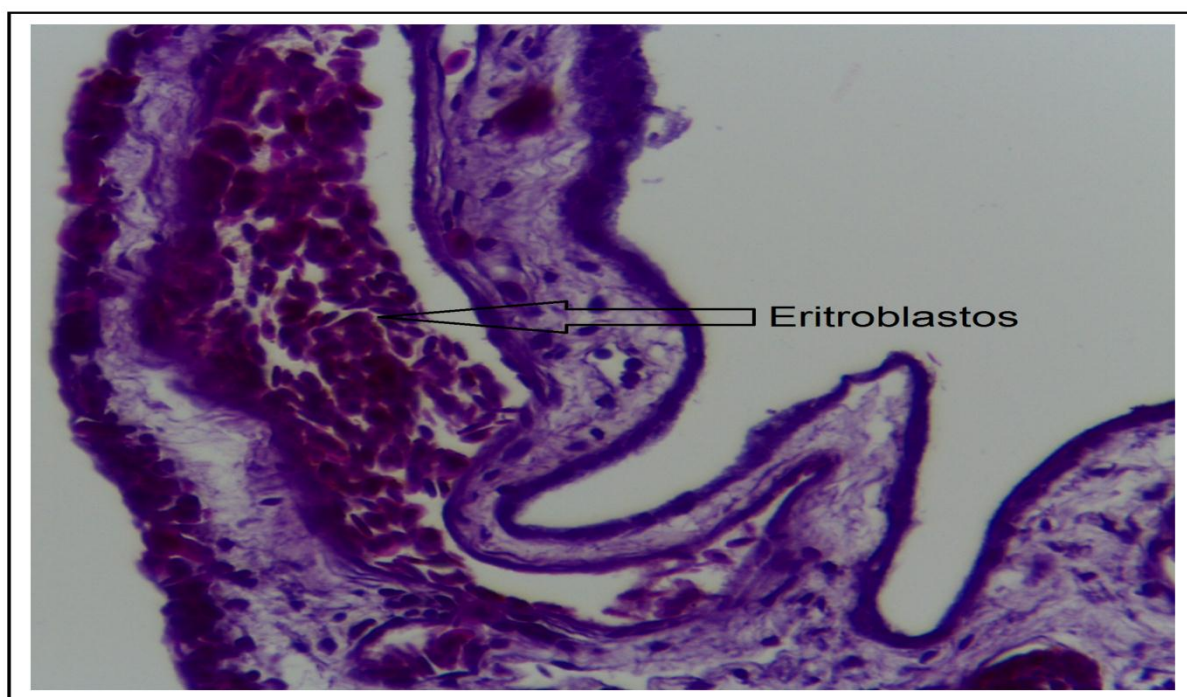


Figura 14: O tratamento com a SAB mostra vasos bem organizado, repleto de eritroblastos e elementos inflamatórios (E): ms ec = ectoderma = mesoderme en = endoderme. (Microscópio aumento 40x).

5.2 Atividade genotóxica e antigenotóxica

Para a avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica da SAB foram realizadas pelo teste de micronúcleo na medula óssea hematopoiética de camundongos. Os resultados da frequência de MNEPC, média, desvio padrão e relação EPC/ENC para a atividade genotóxica e antigenotóxica estão representados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Na tabela 3 observa-se que houve atividade genotóxica da SAB. A dose da solução da *casca de barbatimão* (30 mg.ml⁻¹ peso corporal) analisada apresentou diferença ($p < 0,05$) na frequência de EPCMN em relação ao grupo controle negativo. Em relação ao grupo controle positivo as diferenças também foram significativas ($p < 0,05$).

Tabela 3: Frequência de MNEPCe relação entre EPC/ENC após 24 horas do tratamento com solução aquosa de barbatimão e controles.

	Nº de animais	Eritrócitos policromáticos micronucleados (MNEPC)			
		Dados Individuais MN /1000EPC	%	Média $\pm$ DP MN/1000EPC	Relação EPC/ENC
SAB *	5	7-5-8-7-8	0,7	7 $\pm$ 1,09 ^a	0,77 ^a
H ₂ O (CN) **	5	2-3-3-5-4	0,34	3,4 $\pm$ 1,01 ^b	0,89 ^b
MMC (CP) ***	5	19-17-15-17-16	1,68	16,8 $\pm$ 1,32	0,57 ^c

^{a,b,c} $p < 0,05$ Todos os resultados (teste e controle positivo Eritrócitos policromáticos Micronucleados. (MNEPC) foram comparados com o grupo controle negativo.

O valor de P abaixo de 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados indicativos de significância.

* Solução aquosa de barbatimão; ** Controle negativo: água destilada; *** Controle Positivo: MMC (4mg. kg⁻¹ peso corporal).

Já na tabela 4 observa-se que não houve uma atividade antigenotóxica da SAB administrada concomitantemente com dose de mitomicina C. Comparando a frequência de EPCMN da dose do tratamento de SAB+MMC simultâneo com o controle positivo, não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Já em relação ao grupo controle negativo as diferenças foram significativas ($p < 0,05$).

Tabela 4: Frequência de MNEPC e relação entre EPC/ENC após tratamento simultâneo com MMC e da solução aquosa do barbatimão.

	Nº animais	de	Eritrócitos policromáticos micronucleados (MNEPC)				Relação EPC/ENC
			Dados Individuais /1000EPC	MN	%	Média $\pm$ DP MN/1000EPC	
SAB + MMC *	5		15-13-10-12-11		1,22	12,2 $\pm$ 1,72 ^a	0,61 ^a
H ₂ O (CN) **	5		2-3-3-5-4		0,34	3,4 $\pm$ 1,01	0,89 ^b
MMC (CP) ***	5		19-17-15-17-16		1,68	16,8 $\pm$ 1,32 ^a	0,57 ^a

^ap>0,05. ^bp<0,05. Todos os resultados (teste e controle negativo) foram comparados com o grupo controle positivo. O valor de P abaixo de 0,05 (p<0,05) foram considerados indicativos de significância.

* Solução aquosa de barbatimão + MMC; ** Controle negativo: água destilada; *** Controle Positivo: MMC (4mg. kg⁻¹ peso corporal).

6 DISCUSSÃO

6.1 Atividade Angiogênica

Dados dos estudos recentes da angiogênese utilizando a MCA de ovo de galinha para o barbatimão não foram encontrados na literatura, sendo assim este estudo poderá fornecer subsídio para pesquisas futuras, tendo em vista o interesse do Ministério da Saúde em plantas medicinais, pois o barbatimão faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). O RENISUS é de suma importância pois tem em sua composição várias espécies vegetais com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar novos produtos de importância para o Ministério da Saúde do Brasil (SUS MS, 2014).

Os resultados inovadores encontrados neste estudo indicaram que os testes realizados com a solução aquosa de barbatimão na concentração de 30 mg. mL⁻¹ aumentou a área vascular na MCA do ovo embrionado de galinha, quando comparando aos grupos de controle negativo e de inibidor ($p < 0,05$). Quando comparado com o controle positivo, não houve diferença ($p > 0,05$). Não foram encontrados outros estudos envolvendo a MCA do ovo de galinha e o barbatimão.

Vários fármacos de soluções aquosas podem promover o aumento da área vascular na membrana corioalantoidea do ovo embrionado de galinha. A solução aquosa do barbatimão de acordo com: (tabela 2, gráfico 1) induziu o aumento da rede vascular do ovo embrionado de galinha (50,4%). Já dexametasona (figura 11, A) apresentou diminuição da rede vascular, o que é esperado para esse fármaco. De fato, Melo-Reis *et al* (2010) e Almeida *et al* (2014) trabalharam com solução aquosa do látex da *Synadenium umbellatum* e *Hancornia speciosa*, respectivamente, encontraram aumento considerável da rede vascular.

Na medicina popular o barbatimão possui várias finalidades farmacêuticas descritas na literatura, entre seus principais efeitos medicinais atribuídos a este fitoterápico destaca-se a propriedade cicatrizante (EURIDES *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 2009; HERNANDES *et al.*, 2010; LIMA, 2010). Este trabalho mostra pela primeira vez a ação angiogênica da SAB comprovada devido ao alto índice de vascularização encontrado na MCA (figura 12). O estímulo da angiogênese por fármacos pode ser usado para acelerar a cicatrização e o reparo tecidual promovendo o crescimento de

vasos sanguíneos nos tecidos isquêmicos (HEILMANN *et al.*, 2002; DETILLIEUX *et al.*, 2003). A característica terapêutica predominante para que o barbatimão seja cicatrizante é atribuída principalmente ao grupo dos taninos condensados, os quais são constituídos por unidades de flavonol: flavan-3-ols (catequina) ou flavan 3,4-diols (leucoantocianidinas). Possui uma estruturação complexa, pode conter de duas a 50 unidades flavonóides, são resistentes a hidrólise, porém podem ser solúveis em solventes orgânicos aquoso, levando em conta a sua estrutura química (LIMA, 2010).

O barbatimão já foi testado em vários experimentos cicatrizantes e em diferentes espécies, como, camundongos (EURIDES *et al.*, 1996), ratos (HERNANDES *et al.*, 2010), coelhos (LIMA, 2010), bovinos (SILVA *et al.*, 2009), equinos (MARTINS *et al.*, 2003), ovinos (MENDONÇA *et al.*, 2008), cães (RABELO *et al.*, 2006), gatos (SILVA, 2006) e no ser humano (MINATEL *et al.*, 2010), por ter atividade angiogênica, comprovada neste trabalho pelo teste da MCA em ovo de galinha.

A cicatrização está relacionada a estímulos angiogênicos (HEILMANN *et al.*, 2002; DETILLIEUX *et al.*, 2003). O trabalho comprovou a atividade angiogênica do barbatimão pelo alto índice de vascularização da MCA (figura 12, B). Isto explica o porquê de vários trabalhos sobre o barbatimão estão relacionados ao seu poder cicatrizante, entre eles podemos citar: segundo Minatel *et al.* (2010) em seus estudos em seres humanos, usando no tratamento de úlceras de decúbito em diferentes graus de lesão. No total foram analisados um total de 27 pacientes, total de 51 lesões de decúbito. Os resultados foram satisfatórios, mais de 70% dos pacientes apresentaram suas feridas totalmente cicatrizadas, onde a área da ferida teve uma redução de 30% em média, com o tratamento da pomada a 3% após a primeira semana.

6.2 Teste do micronúcleo

Os produtos fitoterápicos exercem efeitos que podem ser adversos, tóxicos a quem faz o uso de suas propriedades devido aos diferentes compostos naturais derivados do metabolismo primário e secundário da planta, os quais são responsáveis pelos efeitos terapêuticos (ALMEIDA *et al.*, 2009). Os órgãos responsáveis pela entrada de novos fitoterápicos no mercado a Anvisa, o FDA (*Food*

and Drug Administration) órgão governamental dos Estados Unidos da América responsável por testes e estudos minuciosos a novos fármacos, exigem que a normatização de medicamentos fitoterápicos seja válida, permitindo a população a comprovação da eficácia e segurança do produto que derivam de plantas medicinais. Mesmo o uso de medicamentos a base de plantas medicinais tenha o uso frequente pela população, os ensaios que possam avaliar a toxicidade de tais princípios ativos são poucos realizados (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006).

A solução aquosa de barbatimão apresentou atividade genotóxica na dose 30 mg ml⁻¹ testada de acordo com a tabela 3 pois a dose analisada foi encontrada uma diferença ($p < 0,05$) na frequência de EPCMN em relação ao grupo controle negativo. Em relação ao grupo controle positivo as diferenças também foram significativas ($p < 0,05$). Nas pesquisas de Costa (2010) encontraram os seguintes resultados: por meio de ensaio MN, o extrato de barbatimão usado, não foi encontrado efeito mutagênico em células da medula óssea de camundongos quando testados nas referidas doses 750, 1500, 2250 mg/kg.

Na tabela 4 deste trabalho não foi constatado uma ação antígenotóxica pois a média de micronúcleo encontrada quando tratados com apenas MMC foi de: 16,8. Já quando tratados com a mesma SAB+MMC a média de micronúcleo caiu apenas para: 12,2 não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$). Já em relação ao grupo controle negativo as diferenças foram significativas ($p < 0,05$).

Analisando novamente as pesquisas de Costa (2010) foram encontradas os seguintes dados estatísticos sobre a atividade mutagênica: encontraram efeito antimutagênico sendo que quando administrado na dose de 40mg/kg juntamente com a ciclofosfamida (fármaco indutor de mutagênese, efeito semelhante ao da MMC) a quantidade eritrócitos policromáticos micronucleados (MN) teve uma porcentagem inferior ao grupo que recebeu a ciclofosfamida isoladamente, e já não apresentaram diferença estatística quando analisado ao grupo negativo para mutagênese, representado neste trabalho pela água.

Os estudos realizados neste trabalho mostraram que o barbatimão apresentou atividade genotóxica (tabela 3) e não apresentou uma atividade antígenotóxica (tabela 4) no momento em que diminuiu a quantidade de MN aplicando Mitomicina+barbatimão. Analisando os estudos Vilar *et al.* (2010), os estudos foram feitos em cultura de *Escherichia coli*, por meio de testes *in vitro*: SOS cromoteste e SOS-inducteste, mostraram que o extrato etanólico da casca de

barbatimão usando doses: 0,0, 0,25, 0,5, 1,0, 5,0 e 10 mg/placa ou tubo de cultura, mostrou efeito genotóxico (semelhantes aos achados deste trabalho), apesar de não possuírem atividade mutagênica. E com a metabolização do extrato na pesquisa de Vilar *et al* o barbatimão conseguiu diminuir suas atividades genotóxicas e citotóxicas. Analisando o conjunto em si, concluíram que os resultados alcançados não foram concludentes e seriam necessários mais experimentos para esclarecer seus mecanismos de ação e sendo assim concluir melhor o seu risco para o consumo humano. (VILLAR *et al.*, 2010).

Tendo obtido estas características sobre o barbatimão neste trabalho, sugere-se que deve se iniciar pesquisas complementares a fim de que se possa tornar sua viabilidade como novos fármacos, diferente do que se tem hoje disponível no mercado farmacêutico, e principalmente direcionar estas novas pesquisas do barbatimão juntamente com mais princípios ativos, trabalhando o barbatimão em conjunto com outras plantas, potencializando ou não as suas atividades angiogênica, genotóxica e não antigenotóxica, todas estas comprovadas neste estudo.

7 CONCLUSÕES

O extrato da casca do barbatimão apresentou atividade angiogênica na MCA, apresentou atividade genotóxica porém não apresentou atividade antigenotóxica.

As perspectivas de criação de novos fármacos através do barbatimão são grandes tendo em vista os ótimos resultados apresentados neste trabalho. O barbatimão como fármaco sozinho ou junto com outras plantas (dois ou mais princípios ativos) poderão ter uma grande influência na difícil cicatrização de feridas geradas por algumas doenças, principalmente a diabetes. Com resultados de estudos valiosos como este e outros, poderemos ter em mãos uma maior viabilidade a luta contra estes fatores gerados por estas doenças as quais dificultam a cicatrização. Tudo isso graças ao alto índice de atividade angiogênica do barbatimão comprovada neste trabalho.

8 BIBLIOGRAFIA

ACCORSI, WALTER RADAMÉS. **Programa de Plantas Medicinais e Fitoterapia: Medicina Popular e Fitoterapia**. Edição Cursos Agrozootécnicos ESALQ-USP. Piracicaba. São Paulo. 81p. 1994.

ALBINI, A. et al. **Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention**. Cancer Research, v.65, n.23: p. 10637-41, 2005.

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, Santa Maria, v.40, n.1, p. 200-203, 2009.

ALMEIDA, LUCIANE. et al. **Hancornia speciosa latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity**. Springer Science+Business Media New York 2014, 19 December 2013 / Accepted: 9 June 2014.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D.; **Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water**. Mutation research, v. 343: p. 121-135. 1995.

AMES, B.M., SHIGENA, M.K. and HAGEN, T.M. 1993. **Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging**. Proc . Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: p. 7915-7922.

AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. **Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss***. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 49, p. 221-225, 2001.

BADKE, M.R. et al. **Plantas Medicinais: O saber sustentado na Prática do Cotidiano Popular**. Esc. Anna Nery (impr.), 2011 jan-mar; 15 (1): p. 132-139, 2011.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F da.; TEDESCO, S. B. **Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.17, n.3, p. 444-447, 2007.

BARRACA, ANTONIO SERGIO. **Manejo e Produção de Plantas Medicinais e Aromáticas**. Piracicaba. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Departamento de Produção Vegetal, Julho de 1999.

BARROSO, J. E. M. et al. **Comparação entre os efeitos de diferentes tratamentos na cicatrização de pele por segunda intenção em ovinos.** Acta Veterinaria Brasilica, Mossoró, v. 4, n. 4, p. 298-302, 2010.

BELIËN JAM et al. **Standardization of counting micronuclei:** definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. Carcinogenesis. 16 (10): p.2395-4000, 1995.

BENNER SE. et al. **Micronuclei, a biomarker for chemoprevention trials:** results of a randomized study in oral premalignancy. Eur. J Cancer B Oral Oncol. 59 (4):457-9, 1994.

BLAAUWGEERS HG. et al. **Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris.** Evidence for a trophic paracrine relation. Am J Pathol. 155 (2): 421-8, 1999.

BOLOGNESI, C. et al. **Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy:** micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe. 557: 109-117, 2004.

BROWN, K.. et al. **Importance of genetic alterations in tumour development.** Arch. Toxicol. 16 (Suppl.): p. 253-260, 1994.

CARRARD, Vinicius Coelho. et al. **Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal,** R. Fac. Odontol. Porto Alegre, Porto Alegre, v. 48, n. 1/3, p. 77-81, jan./dez. 2007.

CASTRO, V.L. Aspectos **da exposição ambiental aos agroquímicos no desenvolvimento animal.** Cadernos de Ciência de Tecnologia, v.21, p. 469-497, 2004.

CASTRO, Pollyana Ribeiro. **Cinética da Angiogênese Inflamatória Induzida por Implante de Esponja na Musculatura Abdominal em Camundongos.** Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, 2012.

ÇAVAS T AND ERGENE-GOZUKARA S. **Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in Oreochromis niloticus exposed to textile mill effluent.** Mutat Res 534: p. 93-99, 2003.

CHUNG, H.W.; KANG, S.J.; KIM, S.Y.A. **A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol.** Mutat. Res., 516: p. 49-56, 2002.

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. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 45-51, 2010.

COSTA, M. A.. et al. **Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) for use as a pharmacological agent.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, Duluth, v. 58, p. 330–335, 2010.

COSTA, G. L de. **A. Avaliação do Potencial Mutagênico, Antimutagênico e Antioxidante do Óleo da Polpa de *Acrocomia aculeata* (Arecaceae).** 67f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, 2012.

COUTINHO, L. M. O conceito de Cerrado. **Revista brasileira de Botânica**, 1:17-23, 1978.

CUNHA, K.S. et al. **Tanic Acid is not Mutagenic in Germ Cells but Weakly Genotoxic in Somatic Cells of *D. Melanogaster*.** Mutagenis. V.10, n.4, p.291-95, 1995.

CUNHA, K.S. *et al.* **Tanic Acid is not Mutagenic in Germ Cells but Weakly Genotoxic in Somatic Cells of *D. Melanogaster*.** Mutagenis. v.10, n.4, p.291-95, 1995.

DETILLIEUX, K.A. et al. **Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium.** Cardiovasc Res. 57, 8–19, 2003.

DIAS, L.E.; VENEGAS, V.H.A. **Introdução à fertilidade do solo.** Apostila da disciplina, SOL 375-Fertilidade do Solo, v.1. Departamento de Solos da UFV, p.10-28, 1996.

DING, G.R.; NAKAHARA, T.; MIYAKOSHI, J. **Induction of kinetochore-positive and kinetochore-negative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-rays.** Mutagenesis, 18: p. 439-443, 2003.

EURIDES, D. et al. Morfologia e morfometria da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com solução aquosa de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Martius). **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 2/3, n. 1, p. 30-40, 1996.

FDA Disponível em:<<http://www.fda.gov>> Acesso em: 15 abr. 2014.

FELFILI, J.M. *et al.* **Composição florística e fitossociologia do cerrado sentido restrito no município de Água Boa, MT.** Acta Botanica Brasilica 16(1): p. 103-112, 2002.

FELFILI, J.M. **The in vitro micronucleus technique.** Mutation Research, Amsterdam v. 455: p. 81-95. 2000.

FELFILI. *et al.* **Extrativismo racional da casca do barbatimão (*Styphnodendron adstringens* (Mart.) Coville).** Brasília: Universidade de Brasília, DF.p. 31, 2004.

FENECH, M. *et al.* The Human Micronucleus Project – an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat. Res.**, v. 428, p. 271-283, 1999.

FITOTERÁPICOS (VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/poster_fitoterapicos.pdf> Acesso em : 20 abril 2014.

FOLKMAN J. **Tumor angiogenesis:** therapeutic implications. New England Journal of Medicine. 285: p. 1182-1186, 1971.

FOLKMAN J. **The Vascularization of Tumors.** Sci Am. 234(5): p. 58-64, 1976.

FOLKMAN, S., LAZARUS, R.S., PIMLEY, D., & NOVACEK, J. **Age differences in stress and coping processes.** Psychology and Aging, 2, 171-184, 1987.

FOLKMAN J. **Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.** Nat Med1: p. 27–31, 1995A.

FOLKMAN J. **Clinical applications of research on angiogenesis.** N Engl J Med 333: p. 1757–1763, 1995B.

FREDERICH, M. *et al.* **Vitro activities of Strychnos alkaloids and extracts against Plasmodium falciparum.** Antimicrob Agents Chemother., v.43, p.2328-331,1999.

GATEHOUSE DG. *et al.* **Basic mutagenicity tests:** UKEMS recommended procedures. New York, Ed. Cambridge University Press, Cap. 2, p.13-61, 1990.

GONÇALVES, D. C. M. *et al.* **Aspectos mercadológicos dos produtos não madeireiros na economia de Santarém-Pará, Brasil.** Floresta e Ambiente, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 9-16, 2012.

GRISOLIA, C.K.; CORDEIRO, C.M.T. **Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Gentetics and Molecular Biology***, v. 23, p. 235-239, 2000.

GRISOLIA, C.K. **A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides.** *Mutation Research*. Nº 518. p. p. 145-150, 2002.

GRIZZI, F. *et al* **Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complexity: the surfac fractal dimension.** *BMC Cancer*, 5:14, 2005.

GUTERRES, Z. da. R. **Investigação das atividades Mutagênica, Antimutagênica e Antioxidante de extratos etonólicos de Aoiueatrinervis, Nectandracissiflora, Ocoteaminarum (Lauraceae) e dos AlcalóidesTryptofol, Ocoteína e Dicentrina.** 2009. 239f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2008.

HANAHAN D, Folkman J. **Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.** *Cell*;86 (3):353, 1996.

HASLAM, E. **Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs:** possible modes of action. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v. 59, p. 205-215, 1996.

HEDDLE, J.A. **A rapid in vivo test for chromosomal damage.** *Mutation. Res.* 18: 187-190, 1973.

HEDDLE, J. A. *et al*. **The introduction of micronuclei as a measure of genotoxicity.** A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res*, v. 123, p. 118, 1983.

HEDDLE, J.A. *et al*. **Micronuclei as an index of cytogenetic damage:** pasta, present and future. *Environ. Mol. Mutagen.* 18: 277-291, 1991.

HEILMANN, C., BEYERSDORF, F., Lutter, G. **Collateral growth:** cells arrive at the construction site. *Cardiovasc Surg.* 10, p. 570–578, 2002.

HELLSTON M. *et al*. **Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis.** *J Cell Biol.* 153 (3):546-53, 2001.

HERNANDES, L. *et al*. **Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat** ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, N.16; p. 2011599 3, skin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 431- 436, 2010.

INGBER, D. **In: search of cellular control: signal transduction in context.** Journal of Cellular Biochemistry, v. 30, n. 31: p. 232-237, 1998.

JOHNSON LV. *et al.* **Activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration.** Exp Eye Res. 2001;73 (6):887-96, 2001.

LIEKENS, S.; DE CLERCK, E.; NEYTS, J. **Angiogenesis: regulators and clinical applications.** Biochemical Pharmacology, v.61: p. 253-270, 2001.

KHAN, T. H. *et al.* **Soy isoflavones inhibits the genotoxicity of benzo(a)pyrene in Swiss albino mice.** Human & Experimental Toxicology. v. 24, p. 149-155, 2005.

KIM, I.Y.; HYUN, C.K. **Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 64, p. 288-297, 2006.

LIMA *et al.* **Reparação de feridas cutâneas incisionais em coelhos após o tratamento com barbatimão e quitosana.** 2010.104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

LORENT, M.T.; MARTOS, A.; CASTAÑO, A. **Detection of Cytogenetic Alterations and Blood Cell Changes in Natural Populations of Carp.** Ecotoxicology, 11: 27-34, 2002.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. São Paulo: Nova Odesa, p. 352, 1992.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 370, 2000.

LORENZI *et al.* **Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas.** Nova Odessa (SP): Instituto Plantarum, p. 544, 2008.

MANNA, GK.; SADHUKHAN, A. **Use of cells of gill and kidney of Tilapia fish in micronucleus test (MNT).** Curr. Sci, v. 55, p. 498-501, 1986.

MARTINS, ERNANE RONIE. *et al.* **Plantas Medicinais.** Edição Imprensa Universitária - UFV. Viçosa. Minas Gerais. p. 220, 1995.

MARTINS, C. C. *et al.* **Acta Scientiarum Agronomic,** Maringá, v. 30, n. 3, p. 381-385, 2008.

MARTINS, P. S. *et al.* **A. Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em eqüinos.** Archives of Veterinary Science, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 1-7, 2003.

MARTINS. **Natureza, Doenças, Medicina e Remédios dos Índios Brasileiros,** 1844.

MEI, N. *et al.* **Mutagenicity of comfrey (Symphytumofficinale) in rat liver.** British Journal of Cancer. v.92, p. 873-5, 2005.

MEIRA, Messulan Rodrigues *et al.* **Barbatimão:** Ecologia, produção de tanino e potencial sócio econômico na região norte mineira. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 9, n. 16; p. 2013.

MELO-REIS. *et al.* **Angiogenic activity of Synadenium umbellatum Pax látex.** Braz. J. Biol., v. 70, n. 1, p. 189-194, 2010.

MENDONÇA, *et al.* **Laser As-Ga-Al de baixa potência associado com solução aquosa de barbatimão (Stryphnodendron barbatiman Martius) na reparação tecidual de ferida cutânea séptica de ovino.** In: Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão, Goiânia. Anais...Goiânia: UFG, 2008.

MERSCH, J.; BEAUVAIS, M-N; NAGEL, P. **Induction of micronucleus in haemocytes and gill cell of zebra mussels, Dressena polymorpha, exposed to clastogens.** Mutation Research, 371: p. 47-55, 1996.

MINATEL, D.G. *et al.* Estudo clínico para validação da eficácia de pomada contendo barbatimão (Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville)* na cicatrização de úlceras de decúbito. **Revista Brasileira de Medicina,** São Paulo, v. 67, n. 7, 2010.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. **Micronucleus test in erythrocytes of Barbus plebejus (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater.** Mutation Research, v. 367, p. 245-251, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos,** Brasília-DF, 2006.

MOREIRA, T.M.S.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L. **O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais.** Revista Brasileira de Farmacognosia, Jul. 2010.

MOUSTACCHI, E. 2000. **DNA damage and repair:** consequences on dose-responses. Mutat. Res., 464:35-40.

NAGAI, M. K.; EMBIL, J. M **Becaplermin**: recombinant platelet derived growth factor, a new treatment for healing diabetic foot ulcers. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2(2), p. 211-218, 2002.

OCCHIONI, E. M. L. **Considerações taxonômicas no gênero Stryphnodendron Mart.** (Leguminosae-Mimosoideae) e distribuição geográfica das espécies. *Acta Botânica Brasilica*, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 153-158, 1990.

PANDYA, N.M., DHALLA, N.S., SANTANI, D.D., **Angiogenesis--a new target for future therapy.** *Vascul Pharmacol.* 44, (5):265-274, 2006.

PELE NOVA. **Regedem® e Biocure, Pele Nova Tecnologia S.A.** Disponível em: <<http://www.pelenova.com.br/site.>>Acesso em: 12 ago. 2014.

PEPPER, M.S. **Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis and vessel wall integrity.** *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 8: p. 21-43, 1983.

PEREIRA, B. A. da S. Flora Nativa. In: **Alternativas de Desenvolvimento dos Cerrados: Manejo e Conservação dos Recursos Naturais Renováveis.** Fundação Pró-Natureza. Brasília, Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), p. 53-57, 1992.

PPCerrado - **Plano de Ação para Prevenção e Controle do Desmatamento e das Queimadas no Cerrado**, Brasília 2009.

RABELLO-GAY, M. N. **Teste de micronúcleo em medula óssea.** In: *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação.* Sociedade Brasileira de Genética (ed) p 83- 90, 1991.

RABELO, R. E. *et al.* **Uso do barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas iatrogênicas em cães.** In: *Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG – CONPEEX*, 3., 2006, Goiânia. Anais... Goiânia: UFG, 2006.

RATES, S. M. K (2001). **Plants as source of drugs.** *Toxicon*, Amsterdam, 39, p. 603-613, 2001.

RIBATTI, R. *et al.* **Chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo Research on angiogenesis.** *Int. J. Dev. Biol.*, v. 40, p. 1189-1197, 1996.

RIBEIRO, J. F. & WALTER, B. M. T. **As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado.** In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. *Cerrado: ecologia e flora.* Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, p. 1279, 2008.

RIBEIRO, L.R. **Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo.** In: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. *Mutagênese Ambiental*. Editora ULBRA, p. 173-200, 2003.

RISAU, W. **Mechanisms of angiogenesis.** *Nature*, v. 386: p. 671-74, 1997.

RIZZINI, C.T. **A flora do cerrado, análise florística das savanas Centrais.** In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO. São Paulo: Ed. da Universidade de São Paulo/Ed. Edgaard Blücher. p. 125-177, 1963.

RIZZINI, C. T. & MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira.** 2. Ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, p. 248, 1995.

ROCHA, MARCO AURÉLIO. **Fitoterapia.** Internet. 1998. Disponível em: <<http://www.geocities.com/Athens/Parthenon/5140/Substveg.htm>>. Acessado em 03 de março de 2014.

ROSEFORT, C.; FAUTH, E.; ZANKL, H. **Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay.** *Mutagenesis*, 19: p. 277-284, 2004.

ROY, M. *et al.* **Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a Green tea polyphenol.** *Mutation Research*, 523-524: p. 33-41, 2003.

SANO, E. E. *et al.* **Mapeamento de Cobertura Vegetal do Bioma Cerrado: estratégias e resultados.** Embrapa Cerrados, Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 33 p. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/download/1204/t>>.

SANO *et al.* **Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado.** *Pesquisa agropecuária brasileira*. Brasília, v. 43, n. 1, jan. p.153-156, 2008.

SARLON, G. *et al.* **Therapeutic Effect of Fucoidan-Stimulated Endothelial Colony-Forming Cells in Peripherallischemia.** *J Thromb Haemost.* Accepted manuscript online: 8 nov. 2011.

SCHMID, W. **The micronucleus test.** *Mutatio Research*, 31: p. 9-15. 1975.

SENGER DR. *et al.* **Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.** *Science*. 219 (4587): p. 983-5, 1983.

SHIMA DT. *et al.* **Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen.** *Mol Med.* (2): p. 182-93, 1995.

SILVA, E. A. **O extrato aquoso do barbatimão como cicatrizante em feridas cirúrgicas do tecido cutâneo em gatos.** 2006. 34 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais) – Pós-Graduação Lato Sensu, Universidade Castelo Branco, Campo Grande, 2006.

SILVA, L. A. F. *et al.* **Extrato da casca do barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman Martius*) associado ao tratamento cirúrgico e toailete dos cascos na recuperação de bovinos da raça nelore com dermatite digital.** *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, s. 1, p. 373-378, 2009.

SILVA *et al.* **Uso popular do barbatimão.** In: SILVA, L. A. F.; EURIDES, D.; PAULA, J. R.; LIMA, C. R. O.; MOURA, M. I. *Manual do barbatimão.* Goiânia: Kelps, p. 79-85, 2010.

SILVEIRA, JH. **Uso da biodiversidade para produção de medicamentos.** *Gazeta Mercantil*, São Paulo, 25 jun., 2003.

SILVEIRA, P.F. da.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. **Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade.** *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SLYSKOVA, J. *et al.* **Both genetic and dietary factors underlie individual differences in dna damage levels and dna repair capacity.** *DNA Repair*, v. 16, p. 66-73, 2014.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos de genética.** 2º ed. Rio de Janeiro: guanabara Kogan, 2001.

SOARES, Gomes Darly; COSENZA, Gustavo Pereira. **Ensinando sobre plantas medicinais na escola.** Museu de História Natural e Jardim Botânico da UFMG, Belo Horizonte 2011.

SOUZA, T. Da S.; FONTANELLI, C.S. **Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluents.** *Mutation Research*, 605: p. 87-93, 2006.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. **Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil.** *Acta Botânica Brasílica*, Brasília-DF, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

STICH, HF, Rosin M. **Quatitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on uman buccal mucosa cells.** *Inst. J Cancer*. 1983;31(3):305-8.

STICH et al. **Reduction with vitamin A and beta-carotene administration of proportion of micronucleated buccal mucosa cells in Asian betel nut and tobacco chewers.** Lancet. 1984; 1 (8388): p. 1204-06.

SUS MS, 2014. Disponível em: <<http://www.plantasmedicinaisefitoterapia.com/plantas-medicinais-do-sus.html>> Acesso em 22 jul. 2014.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

UICC, disponível em: <http://www.uicc.org/>> Acesso em 01 jan 2014.

VAN der Schaft TL. et al. **Early stages of age-related macular degeneration: an immunofluorescence and electron microscopy study.** Br J Ophthalmol. 1993;77(10):657-61.

VARGAS, A. et al. **The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems.** Advanced Drug Delivery Reviews, 59, 1162-1176, 2007.

VIEIRA. et al. **Identificação de plantas medicinais irradiadas através da ressonância paramagnética eletrônica.** Brazilian Journal of Food Technology, Campinas, v. 10, n. 1, p. 63-69, 2007.

VIGILÂNCIA SANITARIA, **Fitoterápicos.** Disponível em:<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/poster_fitoterapicos.pdf> Acesso em: 05 abr. 2014.

VILAR, J. B. et al. **Cytotoxic and genotoxic investigation on barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, (1910) extract.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 687-694, 2010.

VILE, R. G. **Cancer Metastasis: From Mechanisms to Therapies.** John Wiley & Sons, England, 1995.

VINE M. F. **Micronuclei.** In: HULKA B. S.; WILCOSKY T. C.; GRIFFITH J. D. Biological markers in epidemiology. New York : Oxford Univ, 1990.

VOGEL EM. **Introduction into Basic Principles of Genetic Toxicology.** Netherlands: Leiden, 1989.

WANG, S. *et al.* **Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts.** Life Sci. 74: p. 2467-2478, 2004.

WATSON JD. *et al.* **Mutabilidade e Reparo de DNA.** In: _____. Biologia Molecular do Gene. 5 ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2006.

ZHANG, K. *et al.* **Baicalin increases VEGF expression and angiogenesis by activation the ERR α /PGC-1 α pathway.** Cardiovasc Research, v. 89, p. 426-435, 2011.