



Universidade
Estadual de Goiás



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CAMPUS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS APLICADAS
A PRODUTOS PARA SAÚDE

KÁSSIA ROBERTA XAVIER DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS CASCAS DE
Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville EM DIFERENTES
MODELOS**

Anápolis

2019

KÁSSIA ROBERTA XAVIER DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS CASCAS DE
Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville EM DIFERENTES MODELOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (nível mestrado) da Universidade Estadual de Goiás para obtenção do título de mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres

Co-orientadora: Profa. Dra. Andréia Juliana Rodrigues Caldeira

Anápolis- GO

2019

BANCA EXAMINADORA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde do *Campus* Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo, da Universidade Estadual de Goiás, como requisito necessário para obtenção do título de mestre.

Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres (UEG)
Orientador

Profa. Dra. Joelma Abadia Marciano de Paula (UEG)
Examinadora Titular Interna ao PPGCAPS

Profa. Dra. Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão (UEG)
Examinadora Titular Externa ao PPGCAPS

Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro (UEG)
Examinadora Suplente Interna ao PPGCAPS

Profa. Dra. Josana de Castro Peixoto (UEG)
Examinadora Suplente Externa ao PPGCAPS

DEDICO

Aos meus pais, Maria Valdeci e Edimar Pereira, ao meu irmão Marcos Paulo e ao meu esposo, Paulo Henrique pelo amor, apoio e por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me permitido chegar até aqui.

Aos meus pais, Edimar Pereira e Maria Valdeci, ao meu irmão Marcos Paulo, e ao meu esposo Paulo Henrique pela compreensão, companheirismo e incentivo de sempre. Amo vocês.

Ao Prof. Dr. Flávio Ayres, por ter confiado em mim, por ter abraçado esse projeto, pelas contribuições oferecidas, pela liberdade que me deu para trabalhar e por contribuir para o meu crescimento.

À Profa. Dra. Elisa Flávia, por aceitar ser minha parceira nessa caminhada. Obrigada pelo apoio, incentivo e por todas as vezes que precisei e sempre esteve disposta a ajudar. Sua colaboração foi de extrema importância para o nosso projeto.

À Profa. Dra. Andréia Juliana, por ceder os dados da sua pesquisa no Hospital Araújo Jorge para que nós pudéssemos selecionar a espécie de estudo.

Ao Prof. Dr. Leonardo Luiz, por estar disposto a ajudar e esclarecer minhas dúvidas sempre que precisei.

À Profa. Dra. Joelma de Paula, pelas diversas sugestões para a melhoria desse trabalho.

À equipe dos laboratórios: Pesquisa em Genética (LPG), Biotecnologia, Microbiologia e Biodiversidade, por terem me recebido tão bem.

À técnica, Dona Neuza por estar sempre disponível a me ajudar na padronização da técnica *A. cepa* e por tudo que fez e faz pelos que passam pelo LPG.

Ao Me. Lucas Leonardo pelas inúmeras contribuições e disponibilidade em ajudar sempre que precisei e pelos conselhos amigos a mim ofertados!

Aos amigos que fiz nessa jornada e que contribuíram para que a caminhada fosse mais leve, Yasmim Queiroz, Rafaela Noleto, Gercí Neto e Sara Almeida.

À secretária do CAPS, Divina Leila por me atender tão prontamente sempre que precisei.

À CAPES/ FAPEG pelo apoio financeiro.

“Desistir?”

Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério.
É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas,
mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus olhos,
mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

RESUMO

Stryphnodendron adstringens (Mart) Coville (Fabaceae) é uma planta pertencente ao bioma Cerrado, popularmente conhecida como barbatimão, e amplamente utilizada na cultura popular como planta medicinal. O presente estudo investigou a atividade biológica do decocto das cascas de *Stryphnodendron adstringens* cujo uso foi citado por pacientes diagnosticados com câncer. As cascas de *S. adstringens*, foram coletadas em Janeiro de 2018 na Reserva Ecológica, Trilha do Tatu da Universidade Estadual de Goiás- *Campus* Henrique Santillo. O decocto das cascas de *S. adstringens* foi liofilizado para análise do teor de sólidos, rendimento do método extrativo e para o cálculo das concentrações do decocto utilizados nos ensaios, expressos em relação à matéria seca extraída: 0,008, 0,016, 0,031 e 0,062 g/mL. A perda por dessecação no pó das cascas de *S. adstringens* foi calculada para quantificação dos teores de fenóis totais, taninos e flavonoides no decocto. O potencial antimicrobiano foi testado pelo método de disco-difusão com cinco cepas bacterianas: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecales*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. O teste em *Artemia salina* foi o utilizado para a avaliação da toxicidade preliminar, enquanto o teste do *Allium cepa* avaliou o potencial citogenotóxico e mutagênico. A perda por dessecação no pó das cascas de *S. adstringens* foi de 11,34%. O teor de sólidos encontrado no decocto foi de 6,2% e o rendimento de extração foi de 31%. O teor de fenóis totais, taninos e flavonoides foram, respectivamente, 13,8%, 8,5% e 0,75%. O decocto das cascas de *S. adstringens* apresentou potencial antimicrobiano frente às cepas de *E. faecales*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. E não apresentou toxicidade em *A. salina*, $CL_{50} = 14.625,000 \mu\text{g/mL}$. No teste com *A. cepa*, o decocto apresentou atividade citotóxica pela parada do ciclo mitótico, enquanto as atividades genotóxica e mutagênica não foram detectadas nas concentrações testadas.

Palavras-chave: barbatimão, planta medicinal, potencial antimicrobiano, teste de *Allium cepa*, citotoxicidade.

ABSTRACT

Stryphnodendron adstringens (Mart) Coville (Fabaceae) is a plant belonging to the Cerrado biome, popularly known as barbatimão, and widely used in popular culture as a medicinal plant. The present study investigated the biological activity of the decoction of the bark of *Stryphnodendron adstringens* whose use was cited by patients diagnosed with cancer. The barks of *S. adstringens* were collected in January 2018 in the Ecological Reserve, Tatu Trail of the State University of Goiás - Campus Henrique Santillo. The decoction of the bark of *S. adstringens* was lyophilized for analysis of the solids content, yield of the extractive method and for the calculation of the decoct concentrations used in the tests, expressed in relation to dry matter extracted: 0,008, 0,016, 0,031 and 0,062 g/mL. The loss by desiccation in the powder of the *S. adstringens* barks was calculated for the quantification of the total phenol, tannin and flavonoid contents in the decoction. The antimicrobial potential was tested by the disc-diffusion method with five bacterial strains: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The test in *Artemia salina* was used for the evaluation of preliminary toxicity, while the *Allium cepa* test evaluated the cytogenotoxic and mutagenic potential. The loss by desiccation in the powder of *S. adstringens* was 11.34%. The solids content found in the decoction was 6,2% and the extraction yield was 31%. The content of total phenols, tannins and flavonoids were, respectively, 13,8%, 8,5% and 0,75%. The decoction the bark of *S. astringens* showed antimicrobial potential against strains of *E. faecales*, *S. aureus* and *S. epidermidis*. And had no toxicity in *A. salina*, $LC_{50}=14,625,000 \mu\text{g/mL}$. In the *A. strain* strain, the decoction showed cytotoxic activity due to the stop of the mitotic cycle, whereas the genotoxic and mutagenic activities were not detected in the tested concentrations.

Key words: barbatimão, medicinal plant, antimicrobial potential, *Allium cepa* test, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Visão geral dos componentes celulares e as etapas que compõem o ciclo celular.....	21
Figura 2- Diagrama do ciclo celular, ilustrando a ordem dos pontos de checagem (<i>checkpoint</i>) e as ciclina/CDKs envolvidas.....	21
Figura 3- Aspectos gerais do barbatimão (<i>S. adstringens</i>). A- planta inteira, B- corte longitudinal no caule do barbatimão, evidenciando a coloração avermelhada, em função da quantidade de taninos C- estrutura foliar do barbatimão, D- inflorescência do barbatimão (seta), E- Frutos do barbatimão.....	31
Figura 4- Fórmulas estruturais do ácido gálico e ácido elágico, ambos, produtos da hidrólise.....	34
Figura 5- Fórmulas estruturais da catequina e epicatequina, ambos, taninos condensados.....	35
Figura 6- Área de estudo. Mapa do estado de Goiás com enfoque na “Reserva Ecológica” Trilha do Tatu, localizada no <i>Campus</i> de Ciências Exatas e Tecnológicas- Universidade Estadual de Goiás, Anápolis.....	42
Figura 7- Etapas que compõe o teste <i>A. cepa</i> . A - Os bulbos antes do preparo para o teste; B - Bulbos sem os catafilos externos; C – Bulbo após a remoção das raízes secas; D - Bulbos expostos a água mineral para germinar; E - Bulbos expostos aos tratamentos.....	50
Figura 8- Curva de calibração construída para fenóis totais utilizando o ácido tânico nas seguintes diluições: 0,15, 0,20, 0,25, 0,30 e 0,35 mg/mL.....	55

Figura 9- Curva de calibração construída para taninos totais utilizando o ácido tânico nas seguintes diluições: 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 e 0,50 mg/mL.....	56
Figura 10 - Curva de calibração construída para flavonoides utilizando a rutina nas seguintes diluições: 0,01; 0,02, 0,03, 0,04 e 0,05 mg/mL.....	57
Figura 11- Relação entre a concentração do decocto das cascas de <i>S. adstringens</i> e halos de inibição das cepas bacterianas investigadas.....	59
Figura 12- Células em divisão nas raízes de <i>A. cepa</i> . A- célula em interfase (controle negativo); B - célula em prófase (0,062 g/mL); C- células em metáfase (controle negativo); D- células em anáfase (controle negativo); E- célula em telófase (controle negativo); F- C-metáfase (0,016 g/mL); G- célula binucleada (0,031 g/mL); H- aderência cromossômica (0,008 g/mL).....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentração do decocto da casca do barbatimão antes e pós o processo de liofilização.....	53
Tabela 2- Frequência (%) de náuplios mortos após 24 h de exposição a quatro concentrações do decocto das cascas de <i>S. adstringens</i>	61
Tabela 3- Total de células analisadas por tratamento, seguida da quantidade de células em processo mitótico nas raízes de <i>A. cepa</i> . Média e DP, do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico para <i>S. adstringens</i> no teste de <i>A. cepa</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ACCG-	Associação de Combate ao Câncer de Goiás
AN-	Anormalidade Nuclear
ATCC-	<i>American Type Culture Collection</i>
BOD-	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CDK-	Ciclinas Dependentes de Quinase
CLSI-	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CNS-	Conselho Nacional de Saúde
CMI-	Concentração Mínima Inibitória
cm-	Centímetros
Cl ₅₀ -	Concentração Letal
DI ₅₀ -	Dose Letal
DNA-	Ácido Desoxirribonucléico
HCL-	Ácido Clorídrico
IM-	Índice Mitótico
MS-	Ministério da Saúde
g-	Gramas
Km-	Quilômetro
Kg	Quilograma
MN-	Micronúcleo

mm-	Milímetros
MSE-	Metano Sulfonato de Etila
m-	Mililitro
MH-	Muller Hinton
µl-	Microlitros
µg-	Microgramas
mg-	Miligrama
M-	Molar
nm-	Nanômetro
p-	Peso
RDC-	Resolução da Diretoria Colegiada
RPM-	Rotação por Minuto
SUS-	Sistema Único de Saúde
TCLE-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC-	Unidade Formadora de Colônia
V-	Volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. REFERÊNCIAL TEÓRICO	19
3.1 Câncer	19
3.2 Ciclo celular.....	19
3.3 Terapias complementares.....	23
3.4 Histórico de utilização de plantas medicinais	24
3.5 Cerrado como fonte de plantas medicinais	27
3.5.1 <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville.....	29
3.6 Teste de disco difusão	36
3.7 Toxicidade em <i>Artemia salina</i> Leach	37
3.8 Teste do <i>Allium cepa</i> L.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Seleção da espécie para o estudo	41
4.2 Coleta da espécie selecionada	42
4.3 Preparo do decocto.....	43
4.4 Caracterização Físico-Química do decocto.....	43
4.4.1 Teor de sólidos e rendimento do método extrativo utilizado	43
4.4.2 Determinação da perda por dessecação.....	44
4.4.3 Doseamento de Fenóis Totais	44
4.4.4 Doseamento de Taninos Totais por Precipitação de Proteínas	45
4.4.5 Doseamento de Flavonoides Totais (Fv).....	46
4.5 Investigação da atividade antimicrobiana	47

4.6	Investigação preliminar da toxicidade em <i>Artemia salina</i> Leach	48
4.7	Testes com <i>Allium cepa</i> L.	49
4.7.1	Índice mitótico	51
4.7.2	Análise da genotoxicidade e mutagenicidade	51
4.8	Análise de dados.....	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1	Caracterização Físico-Química do decocto.....	53
5.1.1	Teor de sólidos e rendimento de extração do decocto.....	53
5.1.2	Perda de voláteis por dessecação na droga vegetal.....	54
5.1.3	Doseamento de fenóis totais.....	54
5.1.4	Doseamento de taninos totais.....	55
5.1.5	Doseamento de flavonoides.....	56
5.2	Atividade antimicrobiana	58
5.3	Toxicidade em <i>Artemia salina</i> Leach	61
5.4	Teste de <i>Allium cepa</i> L.....	62
6.	CONCLUSÕES	69
7.	PERSPECTIVAS.....	70
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXOS	91

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, com mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025 (INCA, 2016). A explicação para este crescimento está na exposição dos indivíduos a fatores de riscos e a redefinição dos padrões de vida, nutrição e consumo desencadeados pelo processo global de industrialização. As alterações demográficas, com redução das taxas de mortalidade e natalidade, indicam o prolongamento da expectativa de vida e o envelhecimento populacional, levando ao aumento de doenças crônico-degenerativas, como o câncer (GUERRA et al., 2005; INCA, 2006; TORRE et al., 2016).

Tais mudanças no cotidiano das pessoas fazem com que o genoma esteja constantemente sujeito a danos, por fatores externos em função da constante exposição a diferentes agentes ambientais de natureza química, física ou biológica. Ademais, há fatores endógenos que causam danos espontâneos ao DNA. O potencial mutagênico de um agente pode provocar danos ao material genético, induzindo mutações nas células somáticas e/ou germinativas (SLOCZYŃSKA et al., 2014; DIAZ; SAITO; CHAMMAS, 2015). Mutações estáveis e em células germinativas são transmitidas para a prole, enquanto as mutações somáticas não são herdáveis (SLOCZYŃSKA et al., 2014; DIAZ; SAITO; CHAMMAS, 2015).

O acúmulo de mutações em um ou mais genes, bem com a perda de integridade do genoma por instabilidade genômica, promovem a perda do controle do ciclo celular e a progressão neoplásica (INCA, 2006; ALBERTS et al., 2010; KAWAKAMI; LIU; DMITROVSKY, 2018). Receber o diagnóstico neoplásico é um choque tanto para os pacientes como para os familiares, que se vêem obrigados a defrontar-se com a gravidade da doença. O sentimento de ansiedade advindo da confirmação desse evento patológico faz com que muitos pacientes busquem suporte físico e emocional de diversas formas. Entretanto, a esperança de cura pelo tratamento convencional é acompanhada por possíveis efeitos adversos ao organismo. Isso tem incentivado a procura de outras medidas terapêuticas como o uso de plantas medicinais a fim de auxiliar a terapêutica convencional e minimizar os efeitos colaterais (JACONODINO; AMESTOY; THOFEHRN, 2008).

Os motivos pelos quais as pessoas optam pelas plantas medicinais como tratamento complementar são diversos, dentre eles, destacam-se a fácil aquisição e baixo custo dos remédios caseiros. Além disso, o uso de plantas medicinais é um costume praticado no âmbito familiar sendo indicado por pessoas do convívio diário dos pacientes como vizinhos, amigos e parentes (JACONODINO; AMESTOY; THOFEHRN, 2008). A utilização de plantas medicinais e o próprio conhecimento popular evidenciam a necessidade de pesquisas para o esclarecimento e confirmação das propriedades terapêuticas das plantas, visando minimizar os efeitos colaterais e toxicológicos que podem decorrer do uso dessas espécies, além de assegurar que a administração seja feita de modo confiável e seguro (FIRMO et al., 2011).

Stryphnodendron adstringens (Mart) Coville, uma planta pertencente ao bioma Cerrado, popularmente conhecida como barbatimão destaca-se neste cenário. As cascas, entrecascas e folhas dessa espécie são amplamente utilizadas na medicina popular para tratamento de diversos males como, infecções microbianas e parasitárias, infecções vaginais e uterinas, inflamação de garganta, complicações pulmonares, infecções respiratórias, hemorragias, úlceras de pele e estômago, diarreia, problemas circulatórios (FERREIRA; SILVA; SOUZA, 2013; BRASIL, 2014) e, mais recentemente, como um tratamento popular para os efeitos colaterais causados pela quimioterapia (OLIVEIRA; MACHADO; RODRIGUES, 2014). O uso dessa espécie para tratamentos diversos deixa evidente a necessidade de estudos que investiguem o potencial tóxico do barbatimão em diferentes modelos, contribuindo para o uso dessa espécie de forma segura.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade biológica do decocto das cascas de *Stryphnodendron adstringens* cujo uso foi citado por pacientes diagnosticados com câncer.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Obter e realizar a caracterização físico-química do material vegetal e do decocto das cascas de *S. adstringens*.
- II. Investigar o potencial antimicrobiano do decocto das cascas de *S. adstringens* por meio do teste de disco-difusão.
- III. Investigar o potencial tóxico do decocto das cascas de *S. adstringens* em *Artemia salina*.
- IV. Investigar as atividades citotóxica, genotóxica e mutagênica do decocto das cascas de *S. adstringens* pelo teste de *Allium cepa*.

3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1 Câncer

O câncer é caracterizado pela proliferação anormal e descontrolada de células que sofreram alteração no material genético, em algum momento do ciclo celular. As alterações que fazem com que uma célula normal adquira características do câncer advêm do acúmulo de sucessivas mutações no decorrer do tempo (ALBERTS et al., 2010; DIAZ; SAITO; CHAMMAS, 2015).

O câncer é uma doença genética, cujo fenótipo maligno resulta de uma alteração que é transmitida da célula alterada para as células filhas (NUSSBAUM; McINNES; WILLARD, 2016). O aparecimento e desenvolvimento de um clone de células tumorais é um evento relativamente raro. Isso porque a célula necessita romper uma série de barreiras fisiológicas para se tornar cancerígena, os chamados pontos de checagem do ciclo celular (KAWAKAMI; LIU; DMITROVSKY, 2018). Esses pontos de checagem correspondem a pontos de controle de qualidade, nos quais eventos moleculares sensíveis a lesões do material genético induzem cascatas de sinais relacionados com bloqueio da progressão do ciclo celular, ativação da maquinaria de reparo e/ou apoptose (FERREIRA; ROCHA, 2010). O conhecimento do ciclo celular e seus mecanismos de ponto de checagem são importantes para que haja a compreensão da etiologia do câncer (SALMON; KATZUNG, 1998).

3.2 Ciclo celular

Denomina-se ciclo celular, o processo pelo qual as células duplicam o material genético e se dividem em duas (mitose) ou quatro (meiose) células-filhas. Durante a mitose, constitui-se um elaborado aparelho para garantir que cada uma das células-filhas receba um conjunto completo de informações genéticas. Este resultado é obtido por meio de um mecanismo que distribui uma cromátide de cada cromossomo para cada célula filha (NUSSBAUM; McINNES; WILLARD, 2016).

Os mecanismos de vigilância do ciclo celular, pontos de checagem, são os responsáveis por garantir que as células filhas recebam um conjunto completo de informações genéticas ao fim do ciclo celular. Esses pontos de checagem postergam

o início de cada etapa do ciclo celular até que a fase anterior seja finalizada com a correção dos erros que ocorreram durante o processo. As mutações que causam inativação ou alteração do funcionamento normal dos pontos de checagem contribuem para o surgimento de células cancerosas, pois resultam em acúmulo de rearranjos cromossômicos e números de cromossomos anormais, mutações gênicas e alterações na expressão gênica (LODISH et al., 2014; JUSTMAN, 2017).

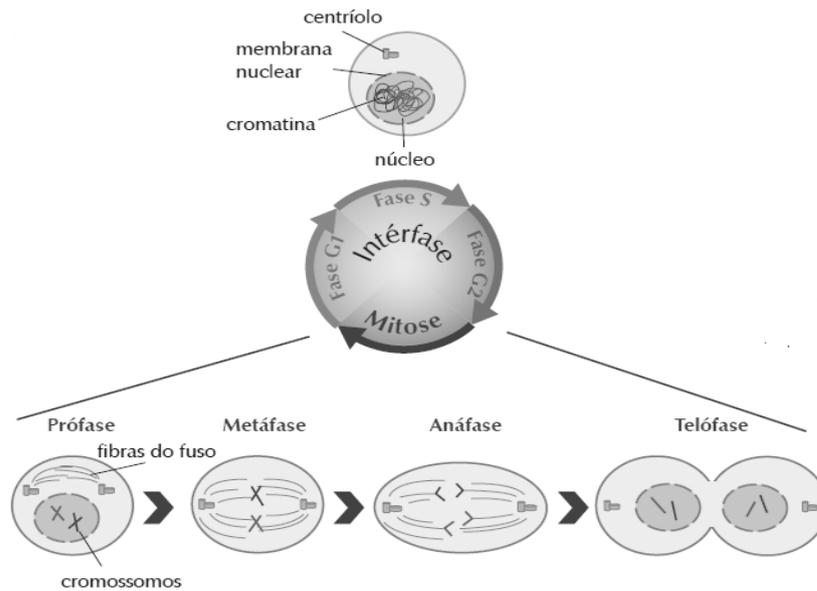
A entrada no ciclo celular é geralmente controlada pelas condições ambientais da célula, que podem gerar sinais de estímulo ou de inibição. Esse controle externo é de extrema importância por diversas razões. Por exemplo, as células não devem iniciar o ciclo celular quando os recursos necessários para completar o ciclo não estão disponíveis. Igualmente prejudicial seria se as células estivessem continuamente se dividindo, independente da atividade das células adjacentes. Os organismos são comunidades de células cooperantes, e esta cooperação inclui controles estritos sobre quando as células se dividem (ALBERTS, 2010; LODISH et al., 2014; LIMA, 2016).

A progressão do ciclo celular (Figura 2) é controlada por uma série de proteínas chamadas “quinases dependentes de ciclinas” (CDKs). Essas proteínas (CDKs) são assim denominadas, pois necessitam de uma ciclina parceira para serem ativadas e, posteriormente, reconhecer e fosforilar (adicionar um grupo fosfato $-PO_4$) proteínas-alvo, envolvidas em eventos do ciclo celular (POLUHA et al., 1996). Caso não ocorra a ligação da ciclina específica, as CDKS permanecerão inativas (QUIRK et al., 2013; OVEJERO et al., 2018).

O complexo ciclinas/CDKs compõe um sistema responsável por manter a homeostase da célula eucariótica pelo controle do ciclo celular. Esse sistema controlador atua como um relógio fazendo com que cada evento do ciclo celular tenha um tempo determinado e limitado para ocorrer. O mecanismo em questão mantém a ordem dos eventos e assegura o sucesso da operação por meio da supervisão do desempenho do ciclo celular em pontos de checagem (Figura 2) já estabelecidos onde são verificadas a qualidade do DNA e as condições do meio para a progressão normal do ciclo, dentre outros (DIAZ; SAITO; CHAMMAS, 2015). Dessa maneira, a atuação das ciclinas e CDKs se dá em fases específicas do ciclo

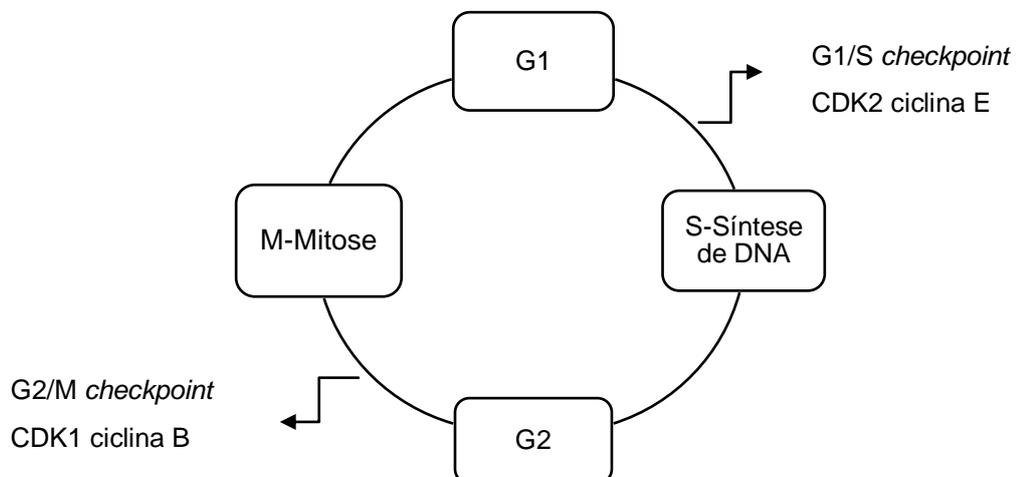
celular como nas transições das fases, G1 para S (ciclina E; CDK2) e de G2 para M (mitose) (ciclina B; CDK1) (JORDÃO; ANDRADE, 2012).

Figura 1- Visão geral dos componentes celulares e as etapas que compõem o ciclo celular.



Fonte: (RIBEIRO; ZANATTA; STRAUSS, 2015).

Figura 2- Diagrama do ciclo celular, ilustrando a ordem dos pontos de checagem (*checkpoint*) e as ciclina/CDKs envolvidas.



Fonte: Modificado de Diaz; Saito; Chammas (2015).

O tempo de duração da fase G1 pode variar imensamente dependendo das condições internas e dos sinais extracelulares de outras células. Em G1, há a preparação da célula para a multiplicação, com a produção de constituintes celulares que serão essenciais para a nova célula que será gerada, além da preparação para a síntese de DNA, que ocorrerá na fase S (LODISH et al., 2014; JUSTMAN, 2017).

Nas fases G1 e S, existem diversos mecanismos reguladores que irão afetar a multiplicação celular. Os fatores de proliferação, como os produtos de oncogenes, ativam a multiplicação celular, enquanto que os controles de retroalimentação (“*feedback*”) são inibidores da multiplicação celular. Estes controles são, por exemplo, genes supressores tumorais, que detém a replicação celular quando há dano no DNA, para que ele seja reparado. Outro mecanismo regulador é a apoptose que promove a morte de células desnecessárias ou perigosas ao organismo (SALMON; KATZUNG, 1998).

Os eventos que precedem a divisão celular ocorrem na fase G2/M, que se caracteriza como o segundo ponto de checagem do ciclo celular. Nesta fase, o sistema de controle celular desencadeia eventos mitóticos iniciais que levam ao alinhamento dos cromossomos no fuso metafásico (ALBERTS, et al., 2010). Em seguida, tem-se início a fase M, mitose, em que ocorrerá divisão do material nuclear e do conteúdo citoplasmático, dando origem a duas células filhas, com organelas e demais constituintes celulares, finalizando o ciclo de replicação celular e retornando à fase G0 (ALMEIDA et al., 2005; DIAZ; SAITO; CHAMMAS, 2015; LIMA, 2016).

A célula tumoral não finaliza o ciclo de replicação celular, ou seja, não retorna à fase G0, assim passa da fase M para nova fase G1 (ALMEIDA et al., 2005). O mau funcionamento do sistema de reparo durante o ciclo celular pode resultar no acúmulo de lesões tais como: translocação cromossômica, amplificação gênica e mutação pontual e os demais processos que estão diretamente ligados à carcinogênese (FERREIRA; ROCHA, 2010).

3.3 Terapias complementares

Existem, atualmente, cinco possíveis formas de abordagem no tratamento de uma neoplasia maligna: excisão cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e a fototerapia dinâmica. Dentre essas, a quimioterapia é a mais utilizada para o tratamento da doença. Porém, ela ocasiona diversos efeitos adversos ao paciente. A quimioterapia consiste no emprego de substâncias químicas que atuarão diretamente nas células, interferindo no ciclo celular. Esta opção terapêutica pode levar a remissão completa da neoplasia. No entanto, ainda é considerável o número de pacientes que não respondem bem a este tipo de tratamento (OLIVEIRA; ALVES, 2002; FUKUMASU et al., 2008; REIS et al., 2008; PESSÔA et al., 2016).

As limitações no tratamento do câncer com quimioterapia incluem: incapacidade dos fármacos de acederem às células hipóxicas de tumores sólidos; agressão às células saudáveis por falta de especificidade dos agentes antineoplásicos, em especial as células gastrointestinais e hematológicas, causando inúmeros efeitos adversos no organismo. Dentre esses efeitos pode-se destacar: náuseas, vômito, constipação, anorexia, mucosite, diarreia, neutropenia, fadiga, alterações nas unhas, hiperpigmentação da pele e alopecia (SANTOS; ELISABETSKY, 1999; OLIVEIRA; ALVES, 2002; SOUZA et al., 2017). Esses são alguns dos motivos que levam muitos pacientes com câncer a recorrer a terapias complementares e alternativas como tratamento adjuvante aos convencionais, como o uso de plantas medicinais (CASSILETH; DENG, 2004; ALMEIDA et al., 2005).

Algumas plantas apresentam efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos promissores (FUKUMASU et al., 2008). Desse modo, alguns compostos encontrados nas plantas medicinais podem amenizar eficientemente os efeitos colaterais advindos do tratamento de doenças graves, como o câncer (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2014). Entretanto, o principal problema ocorre quando plantas são consumidas sem o acompanhamento médico, simultaneamente com medicamentos convencionais, podendo ocorrer interações medicamentosas perigosas. Deste modo, é importante a análise dos aspectos químicos e bioquímicos dessas espécies com potencial quimioterápico (FUKUMASU et al., 2008; MARTINS et al., 2017).

3.4 Histórico de utilização de plantas medicinais

As plantas são fonte de moléculas com uma ampla variedade de aplicações, e a humanidade aprendeu a aproveitar seus benefícios e reconhecer seus efeitos tóxicos ao longo da história (SOUZA-MOREIRA; QUEIROZ-FERNANDES; PIETRO, 2018). Neste cenário, e não menos importante, temos os remédios caseiros advindos de diferentes espécies de plantas e utilizados para tratar uma ampla gama de doenças (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Os primeiros registros sobre a utilização de plantas medicinais datam de 2.600 a.C. e relatam a existência de um sofisticado sistema medicinal na Mesopotâmia com aproximadamente 1.000 substâncias derivadas de plantas. A medicina egípcia remonta de 2.900 a.C., mas o registro mais útil preservado é o "*Papiro Ebers*" de cerca de 1.550 a.C., contendo mais de 700 drogas, principalmente de origem vegetal (BORCHARDT, 2002, DUARTE, 2006, CRAGG; NEWMAN, 2013). Algumas espécies citadas nesses manuscritos [*Glycyrrhiza glabra* L. (*alcaçuz*); *Cupressus sempervirens* L. (ciprestre) e *Papaver somniferum* L. (*papoila dormideira*)] continuam sendo usadas nos dias atuais (DUARTE, 2006; CRAGG; NEWMAN, 2013).

O conhecimento de plantas com potencial terapêutico tem sido transmitido ao longo das gerações e permanece até os dias atuais (ANTONIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2014). Há um forte sincretismo entre práticas africanas e indígenas quando falamos do modo de uso e preparo de espécies vegetais utilizadas nas práticas terapêuticas. Práticas essas, que teriam sido originadas a partir da associação entre o conhecimento, crenças e as concepções derivadas de um vasto campo de experimentação empírica ao longo dos anos (MONTELES; PINHEIRO, 2007).

A comercialização das plantas medicinais é feita principalmente por "raizeiros", conhecedores tradicionais, responsáveis por identificar a planta medicinal, coletar a parte a ser utilizada, preparar e indicar o remédio caseiro. Os locais de atendimento desses "raizeiros" são diversos, podendo ocorrer no domicílio em que residem ou ainda em bancas nas ruas, feiras livres e mercados (DIAS; LAUREANO, 2010). Porém, a partir da ampla divulgação algumas plantas medicinais também passaram a ser comercializadas em farmácias e lojas de produtos naturais. Nesse caso, as

preparações de plantas medicinais são adquiridas com rotulagem industrializada regulamentada de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 26/2014, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ARAÚJO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007; BRASIL, 2014).

O uso de plantas como recurso terapêutico aumentou de modo acentuado com o passar dos anos (RODRIGUES et al., 2017). Muitos fatores contribuem para esse aumento, tais como: alto custo de medicamentos alopáticos, o difícil acesso da população à assistência médica, bem como a tendência o uso de produtos de origem natural (COELHO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2017). Desse modo, a complementação terapêutica com plantas medicinais é um fenômeno social inter-relacionado com fatores biológicos, sociais, culturais e econômicos (BAGATINI et al., 2009; SANTOS et al., 2011; MENEGUELLI et al., 2017). Muitas das espécies nativas utilizadas pela população para fins medicinais são cultivadas domesticamente, o que reduz ou elimina os gastos com medicamentos sintéticos, gastos que oneram o orçamento doméstico de muitas famílias brasileiras principalmente quando se tem crianças ou idosos (CALIXTO; RIBEIRO, 2004).

Esse crescimento no mercado botânico desperta o interesse de empresas farmacêuticas, estimula o surgimento de estudos farmacológicos, pré-clínicos e clínicos randomizados bem controlados, a fim de comprovar a eficiência e segurança da espécie estudada. Revistas científicas dedicam-se a publicar estudos científicos tanto de abordagens básicas como clínicas sobre fitoterápicos, com objetivo de fornecer subsídios futuros, para a prescrição médica dos fitoterápicos. Apesar disso, até o momento, as informações disponíveis sobre os fitoconstituintes e as propriedades biológicas de uma ampla variedade de plantas endêmicas em biomas pouco estudados permanecem não identificados e não caracterizados (CALIXTO, 2000; FONSECA; PEREIRA, 2004; BALDIVIA et al., 2018).

Com relação à biodiversidade, o Brasil é o país com a maior biodiversidade do planeta, associada a uma rica diversidade étnica e cultural da qual advém um vasto conhecimento tradicional com relação ao uso de plantas medicinais. Esses fatores contribuem para o desenvolvimento de pesquisas com resultados promissores no âmbito tecnológico e terapêutico (BRASIL, 2006). É indiscutível a importância das plantas medicinais em nosso país, onde raízes culturais contribuem

para a sobrevivência do uso de plantas como remédio, o que preconiza a necessidade de debates sobre segurança, eficácia e legitimidade dessas práticas terapêuticas (ELGORASHI et al., 2003; SPADACIO; BARROS, 2008; SANTOS et al., 2011; MENEGUELLI et al., 2017).

3.4.1 Metabolismo de Xenobióticos

A planta medicinal possui compostos que podem agir como xenobióticos, ou seja, compostos estranhos ao organismo humano que podem se tornar tóxicos pelo processo de biotransformação. Os efeitos advindos da biotransformação nem sempre são imediatos e facilmente correlacionados com a ingestão, podem ocorrer efeitos que se instalam por longo prazo de forma assintomática, podendo causar quadro clínico severo, algumas vezes fatal (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

A biotransformação ocorre principalmente no fígado em duas fases distintas, por meio de um grupo de isoenzimas denominadas citocromo 450. A fase I é caracterizada por reações de oxidação/redução, transformando os compostos em metabolitos mais hidrofílicos através da adição de grupos funcionais polares como hidroxila (-OH) ou amina (-NH₂) na cadeia do composto xenobiótico (OLIVEIRA, 2008; TANIGUCHI; GUENGERICH, 2014; BANDEIRA et al., 2014; PAIXÃO et al., 2016). Caso o metabólito não seja facilmente excretado, ocorre então a fase II, caracterizada por reações de conjugação/ hidrólise. As reações de conjugação promovem a modificação dos compostos por ligações de grupos hidrofílicos como o ácido glicurônico, tornando os conjugados mais polares e fáceis de serem excretados pelos rins na urina (TANIGUCHI; GUENGERICH, 2014).

Para que haja compreensão dos efeitos desses xenobióticos ao organismo, inicialmente, é necessário investigar a ação desses compostos em testes com modelo animal ou em cultura de células. Os resultados encontrados nessas investigações podem servir de subsídio para a conscientização de que algumas plantas medicinais apresentam compostos que podem causar efeitos tóxicos ao organismo (FUKUMASU et al., 2008). Já que a escassez de informações precisas e atualizadas sobre os riscos do uso indiscriminado de plantas medicinais pode ser

considerada um dos fatores que contribuem para a automedicação (MORAES; ALONSO; OLIVEIRA-FILHO, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam as plantas medicinais como a principal opção terapêutica (BRASIL, 2006). Entretanto, ainda faltam muitas informações a respeito do uso que as comunidades fazem das plantas, seja na tentativa de elucidar as fontes disponíveis desses recursos para a população, seja no intuito de entender melhor os valores culturais agregados ao uso de plantas por essas comunidades ou na formulação de apontamentos que priorizem a conservação e o uso sustentável desses recursos (GUARIM- NETO; MORAIS, 2003).

3.5 Cerrado como fonte de plantas medicinais

O Cerrado está localizado no Planalto Central do Brasil que, como área contínua, engloba os estados de Goiás, Tocantins e Distrito Federal, e parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo (VALENTE, 2006; BRASIL, 2018). Classificado como o segundo maior bioma no território nacional, o Cerrado ocupa 22% do território brasileiro, com cerca de 2.036.448 Km² (EMBRAPA, 2018). O clima dessa região é estacional, com duas estações bem definidas, o período chuvoso, que dura de outubro a março, e o período seco, de abril a setembro. A precipitação média anual é de 1.200 a 1.800 mm e as temperaturas são geralmente amenas ao longo do ano (KLINK; MACHADO, 2005; REATTO; MARTINS, 2005).

Esse bioma é considerado a última fronteira agrícola do planeta, cuja riqueza deve-se: a) a localização entre as florestas Amazônica, Atlântica e a Caatinga; b) as fitofisionomias que variam de campos abertos- o campo limpo, vegetação dominada por gramíneas, sem a presença dos elementos lenhosos como árvores e arbustos; c) matas de galeria, dispostas ao longo dos rios; d) cerradões e matas secas, com grande quantidade de árvores e aspecto florestal. No Cerrado encontramos ainda os campos rupestres, caracterizados pela vegetação que nasce no meio de pedras e as 'veredas' que são áreas muito úmidas, brejadas, onde predomina o buriti, e são procuradas pelos pássaros e os animais para se esconderem do calor nos dias

quentes (DIAS; LAUREANO, 2010; SOUZA-KANESHIMA, et al., 2016; EMBRAPA, 2018; BRASIL, 2018).

O bioma Cerrado possui uma das maiores floras vegetais do mundo, estimada entre 12.000 e 13.000 mil espécies, compondo um cenário de exuberante diversidade biológica, heterogeneidade de *habitats*, ampla variedade de recursos naturais e influente arcabouço cultural das populações que nele vivem (MENDONÇA; FELFINI; WALTER, 1998; SCARIOT; SOUSA-SILVA; FELFILI, 2005; FORZZA et al., 2010; BRASIL, 2018).

Considerado como um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade, o Cerrado apresenta extrema abundância de espécies endêmicas e sofre uma excepcional perda de *habitat* advinda da elevada pressão antrópica (MYERS et al., 2000; BRASIL, 2018). O termo *hotspots* foi criado em 1988, pelo ecólogo inglês Norman Myers, com objetivo de definir áreas prioritárias de conservação. O território brasileiro possui dois biomas inclusos nessa lista, sendo eles: Mata Atlântica e o Cerrado (TRISTÃO, 2017).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente, o Cerrado é o bioma brasileiro mais ameaçado em decorrência da conversão para usos alternativos de solo, tendo como consequência a perda de cobertura vegetal. A dinâmica de substituição inclui tanto o desmatamento quanto os incêndios florestais, fatores que favorecem: alteração da paisagem, fragmentação dos *habitats*, extinção de espécies, invasão de espécies exóticas, podendo acarretar ainda, erosão dos solos, poluição de aquíferos, assoreamento dos rios e desequilíbrio no ciclo do carbono (BRASIL, 2011).

Apesar da riqueza de espécies e importância ecológica, várias espécies do Cerrado foram inseridas na “Lista das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção” (MMA nº 6/2008). No total, 472 espécies são listadas, destas, 131 estão presentes no Cerrado. Por essas razões e principalmente pela alta biodiversidade, o Cerrado é considerado como um dos biomas mais ricos, mas também um dos mais ameaçados do mundo (BRASIL, 2011).

As espécies vegetais presentes no Cerrado são utilizadas pela população para diferentes fins, tais como: alimentício, ornamental, forrageiro, medicinal, dentre outros. As espécies com propriedades medicinais estão entre as mais procuradas,

evidenciando a importância socioeconômica para as populações que vivem em zona rural ou urbana (CALIXTO; RIBEIRO, 2004). Apesar de apresentar paisagens que à primeira vista possam parecer monótonas, o Cerrado é uma abundante fonte de plantas medicinais, com uma riqueza excepcional de ecossistemas, espécies e recursos genéticos (KLINK; MOREIRA; SOLBRIG, 1993). Desse modo, os estudos destinados a flora do Cerrado são importantes não só pelo conhecimento científico gerado, mas também como forma de conscientizar para a preservação da diversidade desse *hotspot*.

3.5.1 *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

O gênero *Stryphnodendron* Mart. pertence à Família Leguminosae ou Fabaceae, com 600 gêneros e 12.000 espécies compreendidas em três subfamílias: Cesalpinioideae, Faboideae e a Subfamília Mimosoideae, onde *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville se encontra (SOUZA-KANESHIMA et al., 2016). *S. adstringens* (Figura 3) é uma espécie medicinal nativa do Cerrado brasileiro, típica do cerrado *stricto sensu* (LEWIS, 1987; LEWIS et al., 2005).

S. adstringens tem como sinonímia: *Acacia astringens* Martius, *Mimosa barbadetiman* Velloso, *Mimosa virginalis* Arruda e *Stryphnodendron barbatimam* Mart (BRASIL, 2014). O nome *Stryphnodendron* vem do grego *Stryphnos*, que significa duro e *Dendron* significa árvore, enquanto o epíteto *adstringens* significa adstringente (PANIZZA et al., 1988). Popularmente, *S. adstringens* é conhecida como barbatimão. Entretanto, devido a variação regional, essa planta pode ser encontrada sob outras denominações, como: chorãozinho-roxo, casca da virgindade, *uabatimô*, abaramotemo, casca-da-mocidade, *ibatimô*, paricarana, faveiro e enche-cangalha (LORENZI, 2008; RODRIGUES, 2012).

As folhas do barbatimão (Figura 3-C) são bipinadas com seis a oito folíolos compostos e pecíolo medindo entre 6,5 a 9 cm (EURIDES et al., 2010; SOUZA-MOREIRA; QUEIROZ-FERNANDES; PIETRO, 2018) e foliólulos de tamanho entre 30 a 60 mm, com a mesma coloração em ambas as faces. As folhas dessa espécie não apresentam tricomas, estruturas que atuam contra a perda de água decorrente do excesso de transpiração foliar (RODRIGUES, et al., 2015).

A floração ocorre entre os meses de setembro a novembro. A inflorescência se dá por espigas laterais que brotam de nós desfolhados, com 100 flores de 6 mm de comprimento e de corola creme esverdeada (Figura 3-D). A frutificação acontece entre o período de novembro a junho, os frutos são vagens cilíndricas, indeiscentes, de 6-9 cm de comprimento, com inúmeras sementes de coloração verde, quando imaturos, e de cor parda, quando maduros (Figura 3-E) (TOKARNIA et al., 2000; LORENZI, 2008; EURIDES et al., 2010).

A maturação dos frutos ocorre durante o período de seca, pouco antes do início da estação chuvosa, o que aumenta as probabilidades de germinação e crescimento da plântula. Durante a estação chuvosa, há um aumento na umidade e abundância temporária de nutrientes em decorrência do processo de decomposição da serrapilheira acumulada no período de seca, permitindo o desenvolvimento de um sistema radicular profundo antes da próxima seca, o que aumenta as chances de sobrevivência de um novo indivíduo (FELFILI et al., 1999).

A espécie apresenta características pioneiras, produzindo grandes quantidades de sementes, sendo aproximadamente 13.100 unidades em um quilograma de sementes. Entretanto, poucas as sementes prosperam para a perpetuação da espécie (LORENZI, 2008; MEIRA et al., 2013). As sementes de *S. adstringens* são muito predadas por insetos, mesmo as vagens em processo de maturação apresentam vestígios de predação. A maturação dos frutos no período de seca pode ser uma estratégia que a planta adquiriu para evitar a predação, já que nesse período os insetos estão em níveis baixos (FELFILI et al., 1999).

O padrão de floração e frutificação anual agregada à grande fertilidade com as árvores frutificando todos os anos, quando não perturbadas pelas queimadas, contribui de forma significativa para a manutenção e abundância dessa planta na comunidade. Isto compensaria a desvantagem trazida do longo período de maturação dos frutos, quando ficam expostos ao ataque de insetos (FELFILI et al., 1999).

Figura 3- Aspectos gerais do barbatimão (*S. adstringens*). **A-** planta inteira, **B-** corte longitudinal no caule do barbatimão, evidenciando a coloração avermelhada, em função da quantidade de taninos **C-** estrutura foliar do barbatimão, **D-** inflorescência do barbatimão (seta), **E-** Frutos do barbatimão.



Fonte: própria autora.

Na fase adulta, o barbatimão pode atingir de quatro a seis metros de altura e o diâmetro do tronco varia entre 20 a 30 cm (Figura 3) (EURIDES et al., 2010). As cascas caulinares, quando secas, apresentam-se em fragmentos arqueados, com dimensões e formatos muito variados. Em secção transversal as cascas do barbatimão apresentam, em média, 0,6 mm de espessura quando secas, e de 10 mm a 12 mm de espessura quando hidratadas, tendo a região floemática, mais interna, coloração marrom clara, quando comparada à região do súber, mais externa

e de intensa coloração marrom-avermelhada. Nos caules jovens, o súber apresenta-se, em vista frontal, de coloração escura e aspecto granuloso, homogêneo, portando fissuras estreitas e profundas no sentido transversal. As porções caulinares antigas apresentam coloração marrom-escura ou marrom-acinzentada, quando na presença de líquens, sempre com profundas fendas, predominantes no sentido transversal, ou com cinturas consecutivas, desprendendo-se em placas de dimensões e formatos variados, irregulares, deixando depressões profundas no local. A fratura da casca é do tipo granulosa em relação à região do súber e fibrosa, estriada longitudinalmente, esquirolosa, na região floemática (BRASIL, 2010).

O barbatimão é bem conhecido pelas comunidades rurais, pois os produtos advindos dessa planta são fundamentais para a subsistência dessas comunidades, as quais fabricam, comercializam e consomem remédios caseiros dessa árvore e utilizam a madeira para a geração de energia doméstica. Além disso, o barbatimão também é utilizado por algumas empresas florestais no processo de recuperação de áreas degradadas. Outras atribuições em que a espécie é utilizada: curtimento de pele, fabricação de tintas e como planta ornamental (LORENZI, 2008; CHAVES et al., 2017).

Segundo Brandão et al. (2008), a segunda espécie mais frequentemente mencionada descrita pelos naturalistas do século XIX e descrita na 1ª edição da Farmacopeia é o *S. adstringens*, tradicionalmente usada como adstringente devido ao alto teor de taninos (aproximadamente 30%) nas cascas. O valor comercial e medicinal do barbatimão está relacionado a um grupo de compostos fenólicos denominados taninos.

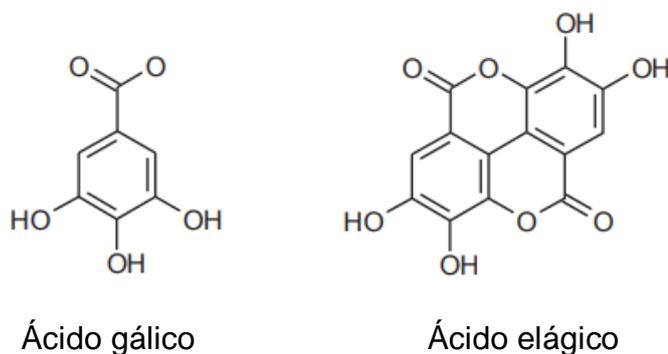
Os compostos fenólicos (polifenóis) são os metabólitos secundários mais abundantes no reino vegetal. Com mais de 8.000 estruturas fenólicas atualmente conhecidas, estruturas altamente diversificadas e massas moleculares variando de <100 Daltons para compostos fenólicos simples a >30.000 Daltons para estruturas altamente polimerizadas. Os polifenóis possuem uma estrutura comum compreendendo um anel benzênico aromático com um ou mais substituintes hidroxila (KY et al., 2016). Os taninos são um grupo heterogêneo de compostos polifenólicos solúveis em água com até 20 grupos hidroxila e estão presentes em plantas, alimentos e bebidas (JESUS et al., 2012).

O termo “taninos” é derivado da antiga raiz léxica celta “tann” que significa carvalho e foi usado pela primeira vez em 1976 em curtumes. Esta palavra também foi usada para designar a substância de origem vegetal capaz de transformar couro de animais em pele estável (BELE; JADHAV; KADAM, 2010; KY et al., 2016; HOYOS-MARTÍNEZ et al., 2019). Uma definição precisa e muito empregada atualmente para taninos foi dada por Bate-Smith e Swain (1962), segundo o qual o termo designa que: taninos são compostos fenólicos solúveis em água com pesos moleculares entre 500 e 3.000 Daltons, além de apresentarem as reações fenólicas usuais, possuem a capacidade de precipitar alcalóides, gelatina e outras proteínas (BATE-SMITH; SWAIN, 1962; SOUZA-KANESHIMA et al., 2016;).

A categorização dos taninos é feita com base nos aspectos estruturais e características químicas. Tradicionalmente, os taninos eram classificados em duas classes principais, sendo elas: taninos condensados (proantocianidinas) e hidrolisáveis. Entretanto, atualmente dois outros tipos são também considerados, isto é, taninos complexos (taninos hidrolisáveis e condensados) e florotaninos (presentes nas algas) (HOYOS-MARTÍNEZ et al., 2019). Os taninos têm diversas funções como: a) defesa contra ao ataque de herbívoros e patógenos; b) suporte mecânico; c) atração de polinizadores e dispersores; d) proteção contra raios ultravioleta e alelopatia (ALMEIDA et al., 2010; CHINI, 2013). Compostos tanantes podem ser encontrados em diferentes partes da planta como: raízes, flores, frutos, folhas, cascas e madeira (PAES et al., 2010).

Os taninos hidrolisáveis são compostos contendo um núcleo central de glicose ou outro poliol esterificado com ácido gálico, também chamado de galotaninos, ou com o ácido hexa-hidroxi-difênico, também chamado de elagitaninos (Figura 4) (MACÁKOVÁ et al., 2014; LADDHA; KULKARNI, 2019). Os taninos hidrolisáveis podem ser hidrolisados por ácidos/bases fracos para produzir carboidratos e ácidos fenólicos (HAGERMAN, 2002; LADDHA; KULKARNI, 2019). Algumas espécies de plantas contêm galotaninos ou elagitaninos e outras contêm tanto taninos hidrolisáveis quanto condensados (SHIRMOHAMMADLI; EFHAMISISI; PIZZI, 2018). Geralmente, os taninos hidrolisáveis são menos abundante em madeiras do que os taninos condensados (QUEIROZ; MORAES; NASCIMENTO, 2002).

Figura 4- Fórmulas estruturais do ácido gálico e ácido elágico, ambos, produtos da hidrólise.

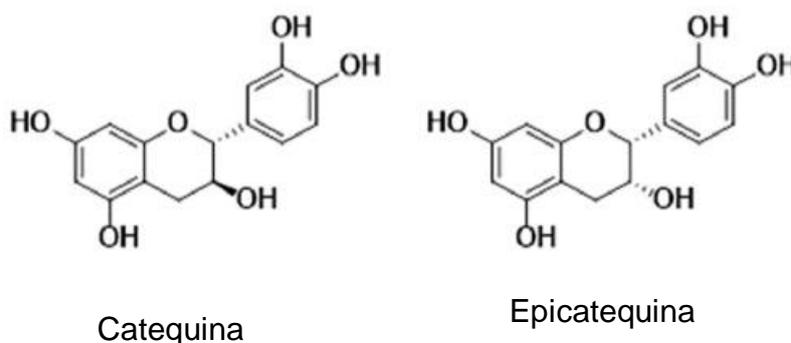


Fonte: (AMAROWICZ; JANIAK, 2018).

Os taninos condensados são os compostos fenólicos à base de flavonoides que consistem especificamente em polímeros e oligômeros das subunidades flavan-3-ol e flavan 3,4-diol. Catequina e epicatequina (Figura 5) são os constituintes flavan-3-ol, já a leucoantocianidinas é um exemplo de flavan-3,4-diol. Outro tipo importante de tanino condensado são as proantocianidinas, um polímero contendo 2-50 ou mais unidades de flavonoides articuladas por ligações carbono-carbono (LADDHA; KULKARNI, 2019). A estrutura das proantocianidinas oligoméricas e poliméricas são formadas pela ligação do carbono-4 de uma catequina (flavan-3-ol) com o carbono-8 ou carbono-6 da catequina monomérica seguinte (SIENIAWSKA; BAJ, 2017). Estes tipos de ligações conduzem à formação das denominadas proantocianidinas do tipo B. As proantocianidinas tipo-A são caracterizadas por uma ligação adicional éter entre os carbonos 2 e 7 das unidades de flavan-3-ol (SMERIGLIO et al., 2017; BOURVELLEC; RENARD, 2018).

Os taninos condensados apresentam maior reatividade em função do caráter fortemente nucleofílico do anel A e, conseqüentemente, possuem maior capacidade de policondensação de aldeídos ou, até mesmo, a autocondensação, sem necessidade de qualquer outro agente catalisador externo. Esses taninos perfazem, aproximadamente, a metade da matéria seca da casca de muitas árvores (CHAVES, 2018; LADDHA; KULKARNI, 2019).

Figura 5- Fórmulas estruturais da catequina e epicatequina, ambos, taninos condensados.



Fonte: (LADDHA; KULKARNI, 2019).

As atividades farmacológicas do barbatimão estão diretamente relacionadas aos teores de taninos condensados, uma vez que tais substâncias possuem atividade no sequestro de radicais livres, ação antioxidante e formação de complexos com outras substâncias, a exemplo de proteínas, polissacarídeos e íons metálicos. Além dos taninos presentes na casca, esse vegetal também apresenta alcaloides, flavonoides, terpenos, estilbenos e esteroides e inibidores de proteases como a tripsina (FERREIRA; SILVA; SOUZA, 2013; BALDIVIA et al., 2018).

Na medicina popular, as pessoas utilizam as cascas, entrecascas, caules, folhas, flores, favas, raízes, frutos e sementes do barbatimão para tratar diferentes males (BRASIL, 2014). Entretanto, a casca é a parte da planta comercializada por apresentar uma alta concentração de substâncias tanantes. Por diversas formas de uso dessa planta, a eficácia terapêutica ficou comprovada pelo conhecimento empírico. E, desde 2009, a espécie passou a fazer parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS, 2009).

O decocto e o infuso das cascas do barbatimão são usados na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, na cicatrização de feridas, como anti-inflamatório, antimicrobiano, fungicida, antioxidante e também para tratar doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) (MINATEL et al., 2010; RICARDO, et

al., 2018; DANTAS et al., 2018). A atividade do extrato das cascas sobre outros distúrbios como dor, diabetes, pressão arterial e como diurético foram avaliados, mas os resultados obtidos foram insuficientes para comprovar cientificamente a utilidade para essas indicações. Outras atividades não correlacionadas às aplicações etnofarmacológicas, como antiprotozoários e antivirais (não contra influenza), também foram analisadas com resultados preliminares promissores (SOUZA-MOREIRA; QUEIROZ-FERNANDES; PIETRO, 2018).

O uso, bem como, a eficácia e segurança dos remédios caseiros podem ser validados por meio de estudos clínicos formulados de acordo com a preparação tradicional ou extratos padronizados. Do ponto de vista farmacológico, nem sempre a eficácia clínica de uma dada planta é explicada pela presença de um único composto ativo. Geralmente, o uso de preparações tradicionais como a decocção e a infusão, corresponde à ingestão de misturas complexas de compostos naturais que potencialmente, podem ter ações em múltiplos alvos (GERTSCH 2011; DAVID; WOLFENDER; DIAS 2014).

A ampla utilização do barbatimão na cultura popular deixa evidente a necessidade de se investigar o potencial dessa espécie. Nesse cenário, temos diversos testes simples, rápidos, baratos e que nos permitem avaliar parâmetros de toxicidade, ação antimicrobiana, potencial citogenotóxico e mutagênico. A análise desses parâmetros visa contribuir, para a comprovação da eficácia do barbatimão e/ou conscientizar sobre os perigos do uso indiscriminado dessa espécie.

3.6 Teste de disco difusão

A avaliação do potencial antimicrobiano de plantas utilizadas para fins medicinais é muito relevante em decorrência do crescente problema de resistência bacteriana aos antimicrobianos em uso na terapêutica (SILVEIRA et al., 2009; SOUZA et al., 2017). O teste de disco difusão apresenta-se como o método mais empregado no *screening* de plantas medicinais com propriedades antimicrobiana, devido à simplicidade de execução e baixo custo (OSTROSKY et al., 2008).

O método de disco-difusão foi criado em 1966 por Bauer e Kirby (BRASIL, 2018). Apesar de ser uma das abordagens mais antigas para realização de testes de

sensibilidade antimicrobiana, o teste é adequado para testar vários patógenos bacterianos, incluindo bactérias fastidiosas mais comuns além de apresentar versatilidade em relação a uma gama de agentes antimicrobianos a serem testados e não requer equipamento especial (BrCAST, 2016).

O teste de disco-difusão tem como princípio a utilização de uma placa de Petri, na qual é aplicado um disco de papel filtro contendo o antimicrobiano a superfície do ágar onde o microrganismo a ser testado foi inoculado. O resultado do teste é a formação de um halo de inibição, e o diâmetro desse halo é o parâmetro utilizado para classificar se a amostra bacteriana é suscetível ou resistente ao antimicrobiano (COSTA, 2016).

Alguns estudos atribuem à propriedade antimicrobiana de plantas medicinais aos produtos do metabolismo secundário, tais como, compostos fenólicos como os taninos (SOUZA et al., 2007). O barbatimão é uma espécie rica em tanino deixando evidente a importância de se investigar a propriedade antimicrobiana do decocto dessa espécie já que uma das formas de preparo na medicina tradicional.

3.7 Toxicidade em *Artemia salina* Leach

A investigação da toxicidade preliminar de espécies medicinais é importante, pois as plantas podem apresentar compostos que causam malefícios ao organismo. O potencial tóxico de plantas medicinais pode ser avaliado por meio de ensaios biológicos simples. Dentre esses temos, a toxicidade sobre *Artemia salina* Leach, um microcrustáceo da ordem Anostraca, encontrados em água salgada e comumente usados para alimentar peixes (NASCIMENTO et al., 2008). Trata-se de um teste simples, rápido, de fácil manuseio e baixo custo, favorecendo sua utilização em diversos estudos, além do que, os ensaios de letalidade são muito usados em análises preliminares de toxicidade geral (LUNA et al., 2005, AMARANTE et al., 2011).

No teste de toxicidade aguda o organismo teste fica em contato com a substância a ser testada por um período de 24 a 96 horas. Posteriormente, o potencial tóxico da substância analisada é medida pela resposta da população de *A. salina* decorrente ao estímulo químico da substância teste. A toxicidade é dada pelo

número de indivíduos mortos na população do microcrustáceo ou alguma outra manifestação do organismo que a antecede como, por exemplo, o estado de mobilidade (COSTA et al., 2008).

3.8 Teste do *Allium cepa* L.

O sistema teste vegetal de *Allium cepa* Lineu- Liliaceae é um excelente bioindicador para o *screening* da citogenotoxicidade de plantas medicinais, devido ao baixo custo, confiabilidade e concordância com testes em mamíferos, auxiliando os estudos de prevenção de danos à saúde humana (TEIXEIRA, 2003; BAGATINI et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Esse teste é muito utilizado para testar diferentes compostos com potencial tóxico (PRAJITHA; THOPPIL, 2016; MANGALAMPALLI; DUMALA; GROVE, 2017; SOUSA et al., 2018; SILVA et al., 2018). Os valores de índice mitótico (IM), alterações cromossômicas (AC) e alterações nucleares (AN) refletem os possíveis danos causados no organismo-teste (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Em casos de IMs com valores expressivamente abaixo ao observado no grupo controle significa diminuição no processo de divisão celular, o que indica que a substância testada pode ter acarretado danos ao organismo-teste (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Já em IMs significativamente superiores ao grupo controle, conclui-se sobre aumento na proliferação celular, provavelmente, devido a algum estímulo causado pela substância testada ao organismo-teste (LEME; MARIN-MORALES, 2009; TEIXEIRA, 2014).

Genotoxicidade refere-se ao estudo dos diferentes efeitos provocados por agentes físicos e químicos ao material genético celular, e a subsequente expressão dessas mudanças. Os agentes que provocam alteração na sequência do DNA são considerados “tóxicos” para o gene sendo então classificados como genotóxico. A genotoxicidade tem sido estudada utilizando plantas que respondem às alterações ambientais, exibindo altas frequências de anormalidades celulares que, geralmente, estão associadas à instabilidade genética em função da exposição a condições desfavoráveis (BEZRUKOV; LAZARENKO, 2002; TEIXEIRA, 2014). Para possibilitar

a avaliação dos efeitos ou danos que agentes mutagênicos podem causar, faz-se necessário que a amostra esteja em constante divisão mitótica, objetivando identificar os efeitos tóxicos e alterações ocorridas ao longo de um ciclo celular, e o teste de *Allium cepa* tem sido amplamente empregado com esse propósito (SILVA et al., 2018).

A espécie *A. cepa* é um bom organismo para identificação de danos cromossômicos e distúrbios no ciclo mitótico em decorrência das características cromossômicas, tais como: crescimento rápido das raízes, elevado proliferação celular, cromossomos grandes e em número reduzido ($2n=16$) bem como a disponibilidade durante o ano todo e fácil manuseio (FISKESJO, 1985; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Além disso, as plantas e outros eucariotos compartilham mecanismos reguladores comuns para controlar a maquinaria básica do ciclo celular (KOMAKI; SUGIMOTO, 2012).

O teste de *A. cepa* foi introduzido por Levan (1938) pela primeira vez para examinar o efeito das colchicinas nos fusos mitóticos e tem sido frequentemente utilizado desde então. Na preparação do ensaio, os bulbos das cebolas tinham os catafilos secos removidos e posteriormente germinavam em água destilada à temperatura ambiente. Quando as pontas das raízes atingiam 1-2 cm de comprimento na água, as cebolas eram expostas a tratamentos específicos seguidos por observações macroscópicas e microscópicas após certo período (KHANNA; SHARMA, 2013).

O sistema de teste de *Allium cepa* é bem aceito para o estudo de efeitos de citogenotoxicidade de plantas medicinais porque as raízes ficam em contato direto com a substância testada, permitindo a avaliação de concentrações diferentes. As alterações cromossômicas e de divisão nas células meristemáticas da raiz de cebola são frequentemente usados para alertar a população sobre o consumo do produto testado (VICENTINI et al., 2001). O teste foi validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS, Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) e Programa Internacional de Bioquímicos Vegetais (IPPB) (BAGATINI et al., 2007; 2009; KHANNA; SHARMA, 2013).

Para os chás de plantas medicinais, esse teste é um bioindicador ideal de rastreamento de citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade e anti-

mutagenicidade. Os parâmetros utilizados para análise envolvem, por exemplo, padrões nucleolares atípicos, quebra de cromossomos e o aparecimento de micronúcleos (BAGATINI et al., 2007; 2009).

O presente estudo visa investigar o potencial tóxico, citogenotóxico e antimicrobiano do barbatimão a fim de contribuir na promoção da saúde dos indivíduos que fazem uso dessa planta. A avaliação do potencial antimicrobiano de espécies medicinais tem se mostrado de grande importância, já que a resistência de cepas bacterianas a fármacos já conhecidos tornou se um problema de saúde pública.

A análise do potencial citogenotóxico e mutagênico de espécies medicinais como o barbatimão é importante na promoção da saúde coletiva já que muitas das espécies utilizadas como medicinais apresentam toxicidade celular. Muitas pessoas acreditam que as plantas medicinais não apresentam toxicidade ao organismo por serem de origem natural, porém, isso não é verdade. As plantas podem ser danosas a saúde e em casos de indivíduos com saúde debilitada, como pacientes em tratamento oncológico o dano a saúde pode ser ainda mais desastroso.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção da espécie para o estudo

A escolha da planta deu-se a partir do levantamento das plantas medicinais utilizadas por pacientes em tratamento oncológico. A investigação foi realizada na unidade de quimioterapia do Hospital Araújo Jorge (Associação de Combate ao Câncer em Goiás, ACCG), localizado na rua 237, nº 143, setor Universitário, Goiânia-GO. Os procedimentos da pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa da ACCG (Parecer nº 002/2011, datado de 14 de março de 2011), de acordo com as exigências do Conselho Nacional de Saúde (Anexo 1). Esses dados foram cedidos por colaboradores associados a esse projeto.

Os dados foram coletados pela aplicação de questionários (Anexo 2) no período entre os meses de fevereiro de 2014 a fevereiro de 2015. Durante as entrevistas, os pacientes citaram as espécies medicinais utilizadas por eles concomitantemente ao tratamento contra o câncer, bem como o modo de uso, a frequência com que eles as utilizavam e se perceberam melhoras com o uso da planta. Todos os voluntários foram esclarecidos e consentiram livremente em participar do estudo, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 3). Sigilo, privacidade, anonimato e a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou comunidade foram assegurados, conforme a Resolução CNS/MS 196/96 (revogada e substituída pela atual Resolução CNS/MS 466/12).

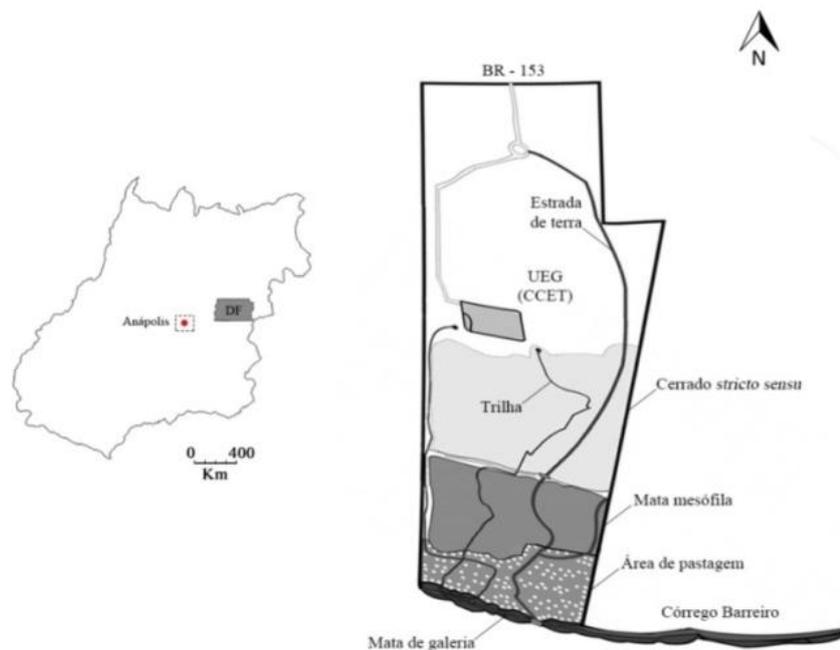
A partir de uma lista geral, contendo 76 espécies, foram selecionadas aquelas citadas especificamente para o tratamento contra o câncer e que fossem nativas do bioma Cerrado. Desta forma, fez-se a seleção inicial de quatro espécies, a saber: *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellfeld- Bignoniaceae (catuaba), *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilger- Bixaceae (algodão-do-cerrado), *Hymenaea stigonocarpa* (Mart.) Hayne- Fabaceae (jatobá-do-cerrado) e *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville- Fabaceae (barbatimão). Dentre essas espécies, *S. adstringens* (barbatimão) foi escolhida por ser uma espécie muito difundida tanto entre os pacientes oncológicos, como na medicina popular, tendo o uso atribuído à cura de diversas enfermidades. Ademais, poucos estudos para verificar a citogenotoxicidade do decocto da casca dessa espécie foram realizados,

e não foram encontrados estudos na literatura que investiguem as potencialidades do barbatimão pelo teste de *Allium cepa*.

4.2 Coleta da espécie selecionada

Amostras das cascas de *S. adstringens* foram coletadas na Reserva Ecológica, Trilha do Tatu da Universidade Estadual de Goiás (UEG) - *Campus* Henrique Santillo - (Figura 6). A coleta ocorreu no mês de janeiro de 2018 nas coordenadas: 16° 22' 53" de latitude sul e 48° 56' 43" de longitude oeste. A espécie foi devidamente identificada pela Dra. Mirley Luciene dos Santos e uma amostra testemunha (exsicata) foi arquivada sob o número de registro 11679 no Herbário da Universidade Estadual de Goiás - HUEG.

Figura 6- Área de estudo. Mapa do estado de Goiás com enfoque na “Reserva Ecológica” Trilha do Tatu, localizada no *Campus* de Ciências Exatas e Tecnológicas- Universidade Estadual de Goiás, Anápolis.



Fonte: Adaptado de Barreto; Angelini (2003); Leonardo-Silva et al., (2018)

Na medicina tradicional, as pessoas geralmente usam decocções e infusões para tratar os pacientes. Por essa razão, o presente estudo optou, como técnica de preparo, pelo decocto baseado na RDC N° 26, de 13 de maio de 2014 do Ministério da Saúde, uma vez que a decocção é método indicado para as partes de drogas vegetais com consistência rígida, como as cascas do barbatimão utilizadas no presente estudo. O decocto consiste na ebulição da droga vegetal em água potável por um determinado período (BRASIL, 2014).

4.3 Preparo do decocto

As cascas de *S. adstringens* foram cortadas manualmente em pedaços menores com auxílio de uma faca e colocadas em estufa com ventilação forçada (Solab®, SL-102/1540) por quatro dias, a 39 °C para secagem. Posteriormente, o material foi triturado em um moinho de martelo (SPLabor®) para obtenção de um pó homogêneo que foi usado no preparo do decocto. Para o preparo inicial do decocto, 20 g de pó de *S. adstringens* foram pesados e adicionados a 100 mL de água destilada, conforme descrito por Coelho et al., (2010) adaptado. A mistura foi levada a fogo baixo por 20 min. Em seguida, o decocto foi filtrado em papel filtro e resfriado a temperatura ambiente. Após o resfriamento, a solução mãe foi utilizada na proporção de 0,2 g/mL e em outras três diluições (0,1, 0,05 e 0,02 g/mL).

4.4 Caracterização Físico-Química do decocto

4.4.1 Teor de sólidos e rendimento do método extrativo utilizado

O decocto das cascas do barbatimão foi liofilizado para determinação da concentração dos extratos (decocto) em relação à quantidade de material extraído (teor de sólidos) e também para verificar o rendimento da extração no método utilizado. Para a liofilização, 100 mL do decocto do barbatimão na proporção de 0,2 g/mL foram inicialmente congelados e colocados no liofilizador (LS 3000, Terroni) para o processo de secagem. Posteriormente, o material liofilizado foi pesado tendo um rendimento de 6,2 g. O rendimento do método extrativo utilizado foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$RE = \frac{\text{Massa do decocto liofilizado}}{\text{g de material vegetal inicial}} \times 100$$

Para a realização dos testes, o decocto liofilizado não foi utilizado. Entretanto, a liofilização foi feita para calcular a quantidade de material vegetal extraído na decocção.

4.4.2 Determinação da perda por dessecação

Para determinar a perda de voláteis por dessecação no pó das cascas de *S. adstringens*, utilizou-se o método de aquecimento alógeno conforme proposto na Farmacopeia Brasileira (2010). Para a quantificação dos voláteis, 1 g do pó das cascas do *S. adstringens* foi adicionado a um coletor de alumínio na balança com aquecimento alógeno (Shimadzu-Uni bloc) e mantido a 105 °C, por aproximadamente sete minutos para que todos os voláteis da amostra fossem retirados e o valor percentual da umidade estabilizasse no *display* do aparelho. O teste foi realizado em triplicata e a média de perda por dessecação foi calculada.

4.4.3 Doseamento de Fenóis Totais

Para a determinação quantitativa dos compostos fenólicos totais presentes no decocto da casca de *S. adstringens*, utilizou-se o método de Hagerman e Butler (WATERMAN; MOLE, 1987a). No método em questão, a reação de complexação dos compostos fenólicos presentes na amostra com uma solução de cloreto férrico (FeCl_3) produz coloração que pode ser medida no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 510 nm.

O decocto da casca do barbatimão foi previamente preparado na concentração de 0,062 g/mL, posteriormente, o extrato aquoso foi filtrado e 1 mL do decocto foi diluído em balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água destilada (v/v). Uma alíquota de 1 mL do decocto já diluído foi transferido para um tubo de ensaio. Ao tubo, 2 mL de solução de Lauril Sulfato de Sódio LSS [1% (p/v)]/Trietanolamina [5% (v/v)] e 1 mL de solução de FeCl_3 foram acrescentados.

Após 15 min de repouso a temperatura ambiente, a leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro a 510 nm.

O “branco” foi composto por 2 mL de solução de LSS/Trietanolamina, 1 mL de solução de FeCl₃ e 1 mL de água destilada. A curva padrão foi preparada com ácido tânico nas seguintes diluições: 0,15, 0,20, 0,25, 0,30 e 0,35 mg/mL. Cada ponto da curva foi feito em triplicata. A partir da equação obtida pela curva padrão, a concentração (mg/mL) e o teor fenóis totais no decocto das cascas de *S. adstringens* foi calculada utilizando as seguintes equações:

$$C = \frac{ABS-A}{B} \times FD$$

$$FT (\%) = C \times \frac{100}{g} \times 100$$

Em que:

A = Coeficiente linear

C = Concentração de fenóis totais

ABS = Absorbância

FT = Fenóis totais

B = Coeficiente angular

g = grama do pó dessecado,
considerando a perda por
dessecação

FD = Fator de diluição (100)

4.4.4 Doseamento de Taninos Totais por Precipitação de Proteínas

Para o doseamento de taninos totais presentes no decocto das cascas de *S. adstringens*, utilizou-se o método de Hagerman e Butler (WATERMAN; MOLE 1987b). Essa técnica está baseada na capacidade dos taninos formarem complexos insolúveis em água com proteínas.

Preparo das amostras: o decocto das cascas do barbatimão foi previamente preparado na concentração 0,062 g/mL (item 4.3 e 4.4), posteriormente, o extrato aquoso foi filtrado e 1 mL do decocto foi diluído em balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água destilada (v/v). Uma alíquota de 1 mL do decocto foi acrescentado a um tubo cônico de centrífuga com 2 mL de solução de albumina bovina sérica [1mg/mL], preparada em solução tampão de acetato [0,2 M], pH= 4,9,

contendo cloreto de sódio [0,17 M]. Após 15 min em repouso a temperatura ambiente, a amostra foi centrifugada a 3.000 rpm durante 15 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado dissolvido com 4 mL de solução de LSS [1% p/v] /Trietanolamina [5% v/v] e 1 mL da solução de cloreto férrico foi adicionada. Depois de 15 min, a leitura da absorbância a 510 nm foi realizada. Cada amostra foi preparada em triplicata.

O “branco” foi preparado com a seguinte composição: 4 mL de lauril sulfato de sódio/trietanolamina e 1 mL da solução de cloreto férrico (FeCl₃). A curva padrão foi preparada com ácido tânico utilizando as seguintes diluições: 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 e 0,50 mg/mL. A Curva de Calibração Padrão Absorbância x Concentração foi construída. Cada ponto da curva foi preparado em triplicata.

$$C = \frac{ABS-A}{B} \times FD$$

$$T (\%) = C \times \frac{100}{g} \times 100$$

Em que:

A = Coeficiente linear

C = Concentração de taninos totais

ABS = Absorbância

T = Taninos totais

B = Coeficiente angular

g = grama do pó dessecado,
considerando a perda por
dessecação

FD = Fator de diluição (100)

4.4.5 Doseamento de Flavonoides Totais (Fv)

O método adaptado de Rolim et al. (2005) foi utilizado para a determinação quantitativa de flavonoides totais presentes no decocto das cascas de *S. adstringens*. Essa técnica está baseada na capacidade dos flavonoides absorverem radiação eletromagnética no comprimento de onda de 361 nm.

O decocto da casca do barbatimão na concentração de 0,062 g/mL foi utilizado para o doseamento de flavonoides totais da amostra. Posteriormente, o extrato aquoso foi filtrado e 1 mL do decocto foi diluído com solução de metanol: ácido

acético 0,02 M (99:1) em balão volumétrico de 40 mL, completando o volume com água destilada (v/v). Em um tubo foram acrescentados: uma alíquota de 2 mL do decocto de *S. adstringens*, amostra foi realizada em espectrofotômetro a 361 nm.

A curva padrão foi preparada utilizando a rotina nas seguintes diluições: 0,01; 0,02, 0,03, 0,04 e 0,05 mg/mL. Cada ponto da curva foi feito em triplicata. A concentração (mg/mL) e o teor (%) de flavonoides foi calculada pela equação obtida na curva padrão, a partir das seguintes fórmulas:

$$C = \frac{ABS-A}{B} \times FD$$

$$Fv (\%) = C \times \frac{100}{g} \times 100$$

Em que:

A = Coeficiente linear

C = Concentração de flavonoides

ABS = Absorbância

Fv = Flavonoides totais

B = Coeficiente angular

g = grama do pó dessecado,

FD = Fator de diluição (40)

considerando a perda por dessecação

4.5 Investigação da atividade antimicrobiana

O potencial antimicrobiano do decocto de *S. adstringens* foi investigado pelo método de disco-difusão conforme proposto por *Clinical and Laboratory Standard Institute- CLSI* (2015). Duas cepas bacterianas gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC- *American Type Culture Collection* 25312 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27953) e três gram-positivas (*Enterococcus faecales* ATCC 19433, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228), proveniente do banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da UEG/CCET, foram utilizadas para realização do teste.

As cepas selecionadas para o teste foram semeadas em ágar Müller Hinton (MH) (Kasvi®) e incubadas por 24 h a 37 °C em estufa de cultura. Posteriormente, transferiu-se de 3 a 5 colônias isoladas para um tubo contendo 5 mL de solução

fisiológica a 0,9% e verificou-se a turvação correspondente 0,5 da escala de McFarland (10^6 UFC mL⁻¹). Para o teste, cada cepa foi inoculada no meio MH com auxílio de *swab* estéril de forma a distribuir o inóculo uniformemente sobre a superfície do ágar. As placas foram divididas em quatro setores, sendo depositado um disco de papel de filtro de 5 mm de diâmetro, previamente esterilizado, em cada setor. Cada disco foi embebido em 3 µL do decocto de *S. adstringens* nas seguintes concentrações relativas ao material extraído: 0,062, 0,031, 0,016 e 0,008 g/mL. Os discos utilizados como controle positivo foram preparados em uma concentração de 30 µg de cloranfenicol para as cepas gram-negativas e gram-positivas. As placas de Petri foram vedadas e incubadas em estufa BOD-*Biochemical Oxygen Demand*, (FANEM®) a 37 °C, por 24 h e então, verificou-se a formação de halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco. Os resultados encontrados a partir dos diâmetros dos halos de inibição foram expressos em média e desvio padrão.

4.6 Investigação preliminar da toxicidade em *Artemia salina* Leach

A toxicidade do decocto de *S. adstringens* foi determinada conforme o método descrito por Meyer et al. (1982), que constitui um bioensaio utilizado para a investigação preliminar da atividade de produtos naturais. Esse método permite se determinar a concentração letal 50% (CL₅₀) de componentes ativos e extratos em meio salino, manifestada pela toxicidade de componentes ativos, frações ou extratos de produtos naturais frente a larvas (náuplios) do microcrustáceo marinho *Artemia salina* Leach.

Para eclosão dos cistos, o meio de água marinha sintética foi preparado pela dissolução de sal marinho em água destilada 36% (p/v), suplementado com extrato de leveduras (6g L⁻¹) e esterilizado em autoclave. *A. salina* comercialmente disponível foi encubada em funil de separação na proporção de 0,250 g de cistos para 1 litro de água marinha sintética. A incubação ocorreu em ambiente com oxigenação constante e controle de temperatura (25 °C). Após 36 h de incubação, os náuplios que eclodiram foram coletados para realização do ensaio.

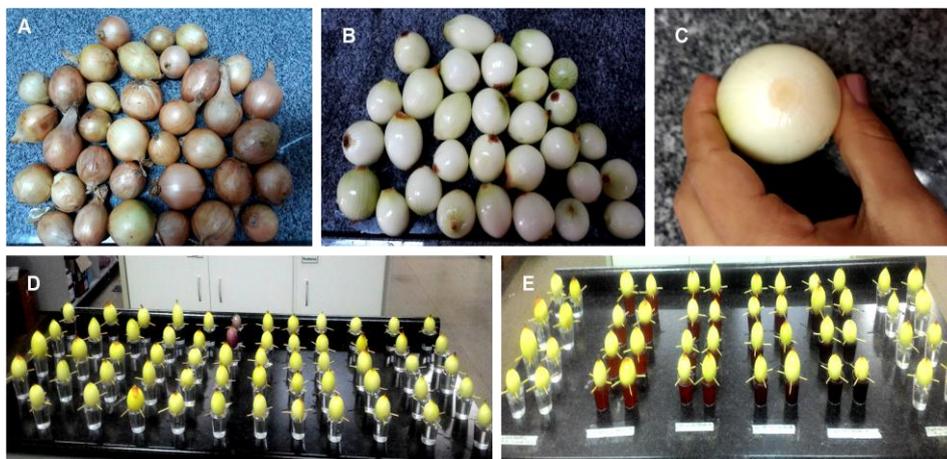
Os náuplios de *A. salina* foram expostos, em microplaca de poliestireno de 96 poços. Os decoctos foram preparados de modo que cada poço ficasse com

concentração final de: 0,062, 0,031, 0,016 e 0,008 g/mL. Dez náuplios, 100 μ L de solução salina e 100 μ L da diluição correspondente foram colocados em cada um dos poços. A solução marinha sintética foi utilizada como controle negativo. O controle positivo foi feito com Dicromato de Potássio na concentração de 12,5 mg/mL. A mortalidade foi avaliada após 24 h de exposição com auxílio de estereoscópio (Bel). O teste foi realizado em triplicatas e a toxicidade foi expressa como concentração letal de 50% da população (CL_{50}), por meio da análise de PROBIT, no software STATISTICA®.

4.7 Testes com *Allium cepa* L.

Para o teste de citogenotoxicidade e mutagenicidade, cebolas obtidas em estabelecimento comercial com bulbo de aproximadamente 5 a 6 cm de diâmetro foram utilizadas. Os catáfilos externos e as raízes antigas das cebolas foram removidos com ajuda de um estilete, com cuidado para não danificar o bulbo e o disco basal (Figura 7). Após esse processo, as cebolas foram lavadas em água destilada para reduzir o efeito de possíveis inibidores de crescimento e secas com papel toalha a fim de evitar que os bulbos apodreçam durante o teste (LEAVAN, 1938; FISKESJO, 1985; GUERRA; SOUZA, 2002). Os bulbos foram colocados em água mineral por 48 h para que as raízes crescessem até atingir de 1 a 2 cm de comprimento, essa etapa ocorreu com iluminação indireta e trocas diárias da água (GUERRA; SOUZA, 2002).

Figura 7- Etapas que compõe o teste *A. cepa*. **A** - Os bulbos antes do preparo para o teste; **B** - Bulbos sem os catafilos externos; **C** – Bulbo após a remoção das raízes secas; **D** - Bulbos expostos a água mineral para germinar; **E** - Bulbos expostos aos tratamentos.



Fonte: própria autora

Para cada tratamento, oito bulbos foram expostos a 25 mL das diferentes concentrações do decocto (0,062, 0,031, 0,016 e 0,008 g/mL) de *S. adstringens* por 24 h. O controle negativo foi feito apenas em água mineral e para controle positivo foi utilizada uma solução de 166 µg/mL de Metano Sulfonato de Etila (MSE) (FISKEJO 1985; BAGATINI et al., 2007; PING et al., 2012).

Após cada tratamento, de 2 a 2,5 cm do meristema apical das raízes foram removidos dos bulbos e fixados em solução de Carnoy (etanol e ácido acético glacial 3:1, v/v) por 24 h. Em seguida, as raízes foram colocadas em etanol 70% e conservadas a temperatura de 4 °C até a confecção das lâminas histológicas. Para o preparo das lâminas a partir das pontas das raízes, os seguintes passos foram seguidos: a) retirada das raízes do etanol 70%; b) lavagem em água destilada por 5 min (2x); c) hidrólise em HCl 1N por 10 min; d) lavagem em água destilada (2x); e) fragmentação do meristema com ajuda de uma lâmina de barbear; e f) coloração das células meristemáticas com carmim acético a 2% (GUERRA; SOUZA, 2002). Para cada lâmina confeccionada foram utilizados quatro meristemas.

A porção meristemática das raízes, já trituradas, foi prensada com auxílio de lamínula. Um *squash* foi feito com o dedo polegar pressionando a lamínula contra a lâmina com cuidado para que o material não saísse do local e para que não

quebrasse a lamínula. As bordas das lamínulas foram seladas com esmalte incolor para conservação do material (GUERRA; SOUZA, 2002).

As lâminas foram analisadas com objetivas de 40x e 100x ao microscópio óptico Primo Star Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado a um sistema de captura de imagens Axiocam 105. Mil células foram analisadas por bulbo, totalizando 6.000 células para cada tratamento e controle (positivo e negativo). As lâminas foram avaliadas quanto à organização dos cromossomos, bem como quanto ao número de células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. O índice mitótico (IM) foi determinado como indicador de proliferação celular (GOMES et al., 2015).

4.7.1 Índice mitótico

Para análise de citotoxicidade, foram avaliadas alterações no índice mitótico (IM) dos tratamentos em relação aos controles (água mineral e MSE). O IM corresponde à percentagem de células em divisão no total de células analisadas (LEME; MARIN-MORALES, 2009; BAGATINI et al., 2009). Para o cálculo de IM, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{IM (\%)} = \frac{\text{Número total de células em divisão} \times 100}{\text{Total de células avaliadas}}$$

4.7.2 Análise da genotoxicidade e mutagenicidade

A análise de genotoxicidade foi realizada com base na frequência de anormalidades nas diferentes fases do ciclo celular. As anormalidades foram organizadas em categorias: (a) alterações cromossômicas (AC) em que estão incluídas, as aderências cromossômicas (*stickness*), C-metáfase, perda cromossômica, quebra cromossômica, ponte cromossômica; (b) alterações nucleares (AN) que correspondem a brotos nucleares, núcleo lobulado e células binucleadas e (c) frequência de micronúcleos (MN). A frequência de AC, AN e MN foram calculadas utilizando as seguintes fórmulas (TEIXEIRA, 2014):

$$\text{AC (\%)} = \frac{\text{Número de alteração cromossômica observada}}{\text{Total de células avaliadas}} \times 100$$

$$\text{AN (\%)} = \frac{\text{Número de alteração nuclear observada}}{\text{Total de células avaliadas}} \times 100$$

$$\text{MN (\%)} = \frac{\text{Número de micronúcleo}}{\text{Total de células avaliadas}} \times 100$$

4.8 Análise de dados

Os resultados do teste de citogenotoxicidade e mutagenicidade foram expressos como média e desvio padrão (DP). Antes da aplicação de um teste paramétrico, os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados utilizando o *software* PAST 3.0 com o método de raiz quadrada. A comparação de média dos tratamentos foi feita usando a Análise de Variância *one-way* (ANOVA), com um nível de significância de $p \leq 0,05$ seguida do teste de Tukey.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização Físico-Química do decocto

5.1.1 Teor de sólidos e rendimento de extração do decocto

Um teor de sólidos de 6,2% (6,2 g em 100 mL do extrato aquoso) foi obtido para o decocto a partir da proporção 0,2 g/mL de material vegetal/água. A partir desse valor o teor de sólido foi estimado para as demais concentrações investigadas (Tabela 1). O rendimento da extração do método utilizado foi de 31% (6,2 g de sólidos extraídos a partir dos 20 g iniciais de material vegetal).

Tabela 1- Concentração do decocto da casca do barbatimão antes e pós o processo de liofilização.

Proporção (p/v) do material vegetal/água no decocto	Dados estimados a partir do decocto filtrado e liofilizado	
	Massa de material seco (para 100 mL de decocto)	Concentração (p/v) em relação ao material extraído
0,02 g/mL	0,8 g	0,008 g/mL
0,05 g/mL	1,6 g	0,016 g/mL
0,1 g/mL	3,1 g	0,031 g/mL
0,2 g/mL	6,2 g	0,062 g/mL

O solvente utilizado no preparo da amostra influencia diretamente no rendimento da extração, devido à natureza dos metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais. Neste cenário, o extrato preparado utilizando a água como solvente tem demonstrado um bom rendimento pela extração de diferentes compostos. Isso pode ser decorrente da solubilidade de muitos carboidratos e glicosídeos dos metabólitos secundários encontrados em espécies com propriedades terapêuticas (DIRAR et al., 2019). Outro fator que pode ter contribuído no rendimento da extração é a composição da amostra estudada. Já que *S. adstringens* é uma espécie rica em taninos, um composto solúvel em água (TANAKA; MATSUO; SAITO, 2018).

5.1.2 Perda de voláteis por dessecação na droga vegetal

A perda de voláteis por dessecação foi de 11,34% ($\pm 0,09$) no pó das cascas do barbatimão. Os nossos resultados estão de acordo com o padrão de qualidade estabelecido pela Farmacopeia Brasileira (monografia), cuja perda de voláteis na droga vegetal pode chegar até 14% (BRASIL, 2014). Esse percentual de perda corrobora que o processo de secagem, estabilização e armazenamento da droga vegetal foi eficiente na prevenção de deterioração dos constituintes da droga vegetal por ação de microorganismos e insetos (COUTO et al., 2009).

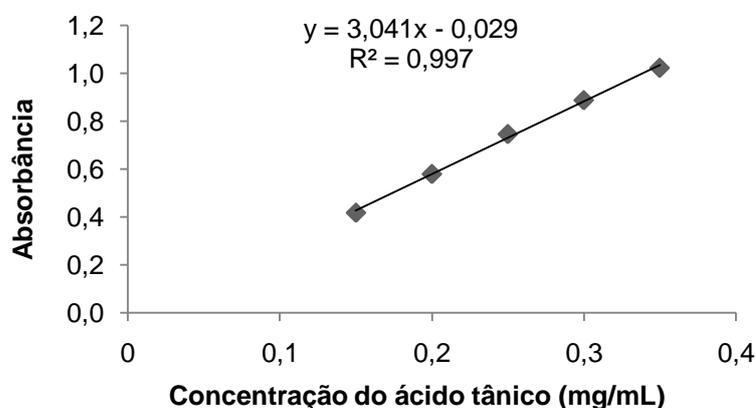
5.1.3 Doseamento de fenóis totais

A concentração de fenóis totais encontrados no decocto das cascas do barbatimão foi de 24,5 mg/mL ($\pm 1,5$). Considerando a perda por dessecação do material vegetal, constatou-se que o teor de fenóis totais em 0,062 g/mL de material extraídos é de 13,8%. A curva de calibração obtida para o ácido tânico gerou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,997 (Figura 8).

No presente estudo, o teor de fenóis totais do decocto das cascas do barbatimão está de acordo com os parâmetros estabelecido pela Farmacopeia Brasileira (monografia), cujo teor de fenóis totais na casca do barbatimão pode variar de 1,5 a 80% dependendo do extrato utilizado. Os maiores percentuais de compostos fenólicos (>70%) são encontrados em extratos hidroalcoólicos e hidroacetônicos (BRASIL, 2014).

O que pode ser devido à capacidade desses solventes extraírem uma variabilidade maior de compostos. A maior extração dos compostos fenólicos pela solução hidroalcoólica em comparação ao solvente puro, pode ser explicada pelo aumento da hidrólise das ligações interflavônicas e à abertura do anel heterocíclico dos taninos, ocasionando um aumento no número de sítios sujeitos a hidratação, aumentando a solubilidade em água (PIZZI, 2008).

Figura 8- Curva de calibração construída para fenóis totais utilizando o ácido tânico nas seguintes diluições: 0,15, 0,20, 0,25, 0,30 e 0,35 mg/mL.



5.1.4 Doseamento de taninos totais

A concentração de taninos totais presentes no decocto das cascas do barbatimão foi de 15,08 mg/mL ($\pm 0,02$). Assim sendo, considerando a perda por dessecação do material vegetal, constatou-se que, o teor de taninos em 0,062 g/mL de material extraído é de 8,5%. A curva de calibração com ácido tânico gerou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,988 (Figura 9).

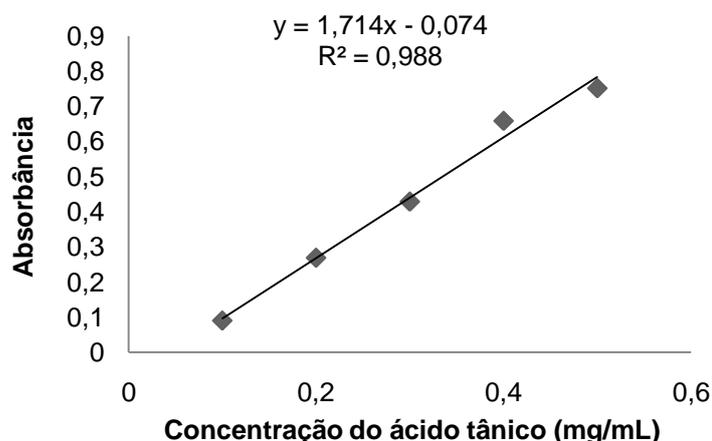
Sousa (2014) investigou o teor de taninos totais nas cascas de *S. adstringens* utilizando o extrato hidroalcoólico na concentração de 0,1 g/mL. Para a doseamento a autora inicialmente diluiu uma alíquota de 1 mL do extrato em 100mL de acetona (30%). O teor de taninos encontrados foi 43,41% ($\pm 1,5$). Valor acima do encontrado no nosso estudo, o que pode ser devido à concentração testada e o tipo ao extrato investigado.

O teor de taninos encontrado no decocto das cascas do barbatimão em nosso estudo está de acordo com o estabelecido pela Farmacopeia Brasileira (monografia), que diz que, a droga vegetal das cascas do barbatimão deve apresentar no mínimo 8% de taninos (BRASIL, 2014). Uma vez que compostos fenólicos, como taninos são citados como um dos compostos responsáveis pelas atividades farmacológicas de *S. adstringens* é imprescindível a determinação de seu teor na droga vegetal. A

verificação do perfil de produção desse metabólito secundário é importante no que tange os requisitos propostos para a padronização da droga vegetal (COUTO et al., 2009).

Dentre as atividades farmacológicas atribuídas aos taninos à propriedade cicatrizante é a mais citada na literatura, sendo investigada em diferentes espécies como: ratos (HERNANDES, et al., 2010), bovinos (MOURA, 2011), equinos (MARTINS et al., 2003) e humanos (MINATEL et al., 2010). Vários estudos já comprovaram a eficácia desse composto fenólico na cura de feridas (MARTINS et al., 2003; COELHO et al., 2010; MINATEL et al., 2010; HERNANDES, et al., 2010).

Figura 9- Curva de calibração construída para taninos totais utilizando o ácido tânico nas seguintes diluições: 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 e 0,50 mg/mL.

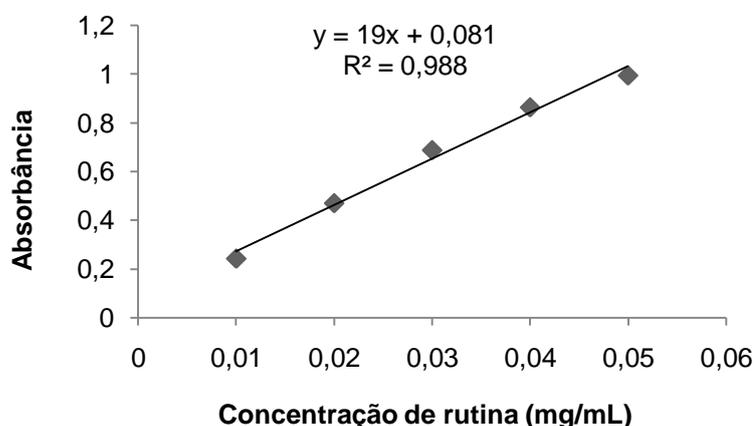


5.1.5 Doseamento de flavonoides

A concentração de flavonoides totais presentes no decocto das cascas de *S. adstringens* foi de 1,33 mg/mL ($\pm 0,02$). Assim sendo, considerando a perda por dessecação do material vegetal, constatou-se que, o teor de flavonoides em 0,062 g/mL de material extraído é de 0,75%. A curva de calibração com a rutina gerou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,988 (Figura 10). Baldivia et al. (2018) investigaram a concentração de flavonoides nas cascas de *S. adstringens*. As cascas de *S. adstringens* foram coletadas na região do Mato Grosso do Sul no mês

de outubro de 2014 e 2015. Para o preparo do extrato, 300 g cascas frescas do barbatimão foram maceradas em 2L de água destilada (0,15 g/mL) por 48 h, posteriormente, o macerado foi liofilizado para o preparo do extrato aquoso. A concentração de flavonoides encontrado no extrato liofilizado das cascas de *S. adstringens* foi de 2,87 mg/g (\pm 0,08), valor superior ao encontrado no decocto das cascas de *S. adstringens* no nosso trabalho.

Figura 10 - Curva de calibração construída para flavonoides utilizando a rotina nas seguintes diluições: 0,01; 0,02, 0,03, 0,04 e 0,05 mg/mL.



A diferença nos resultados encontrados pode estar relacionada à época de coleta das cascas de *S. adstringens*, já que, a espécie em questão apresenta diferença na proporção e composição dos fitoconstituintes ao longo do ano, sendo os valores mais expressivos no período chuvoso (JACOBSON et al., 2005). As cascas de *S. adstringens* utilizadas no nosso estudo foram coletadas no mês de janeiro (período chuvoso), entretanto, apesar de ambos os trabalhos utilizarem extrato aquoso, nós não utilizamos o extrato liofilizado nas análises, esse pode ser um dos fatores que contribuíram para a maior concentração de flavonoides no trabalho de Baldivia et al. (2018). As diferenças metodológicas também podem ter contribuído para a diferença na concentração de flavonoides entre o nosso estudo e de Baldivia et al. (2018).

Outro fator que pode influenciar na concentração de flavonoides presentes em uma amostra é o tipo de solvente utilizado no preparo do extrato. Os extratos

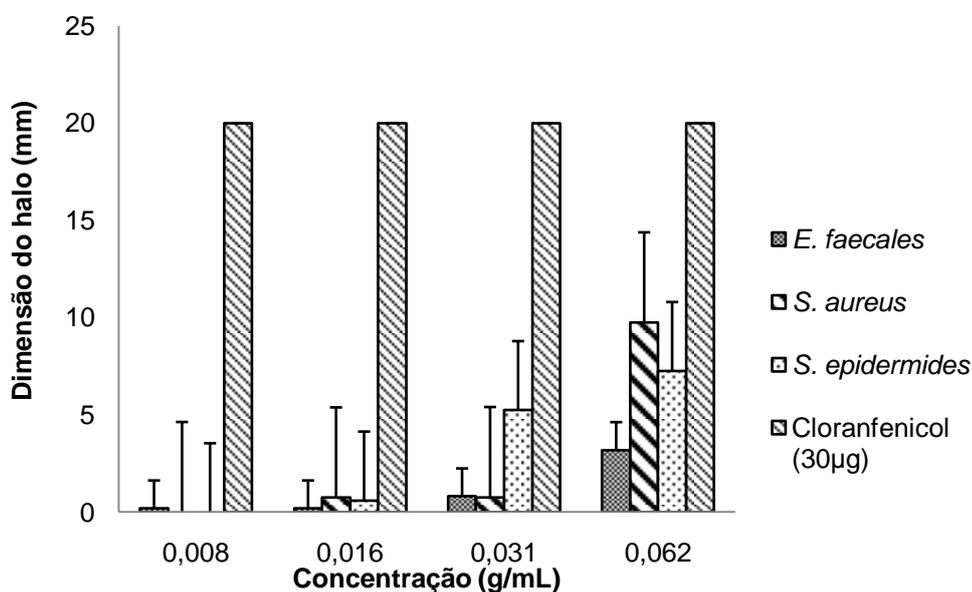
etanólico (EtOH 50% e EtOH 70%) e acetônico tem sido mais eficiente na extração de flavonoides em comparação a água (DIRAR et al., 2019).

Os benefícios dos flavonoides para a saúde humana tem sido alvo de diferentes estudos (SILVA; BIESKI, 2018; DIRAR et al., 2019). Dentre as propriedades benéficas dos flavonoides, a atividade antioxidante, eliminando radicais livres, tem se destacado. Outras atividades atribuídas a esse composto são: antimicrobiana, anti-inflamatória, antiproliferativa e modulação enzimática (SILVA; BIESKI, 2018).

5.2 Atividade antimicrobiana

O decocto das cascas de *S. adstringens* apresentou potencial antimicrobiano em três das cinco cepas analisadas, sendo essas: *Enterococcus faecales*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* todas, gram-positivas (Figura 11). Observou-se, que para a menor concentração analisada (0,008 g/mL) somente a cepa *E. faecales* apresentou um pequeno halo de inibição. A partir da concentração 0,016 g/mL houve a formação de halo de inibição em todas as cepas bacterianas gram-positivas investigadas. Ao comparar as concentrações 0,031 e 0,062 g/mL foi possível observar um aumento na dimensão do halo de inibição para *E. faecales* e *S. aureus*, sendo esse resultado mais expressivo para *S. aureus*. Entretanto, para *S. epidermidis*, não houve diferença no diâmetro do halo entre a concentração média (0,031 g/mL) e máxima (0,062 g/mL) analisada. Para todas as bactérias testadas o halo de inibição foi inferior ao controle positivo (cloranfenicol). O halo de inibição foi ausente nos testes com *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, ambas gram-negativas.

Figura 11- Relação entre a concentração de extraíveis do decocto das cascas de *S. adstringens* e halos de inibição das cepas bacterianas investigadas.



A atividade antimicrobiana das diferentes concentrações (0,2, 0,1, 0,075, 0,005 e 0,025 g/mL) extrato etanólico das cascas *S. adstringens* contra as cepas bacterianas *S. aureus*, *S. epidermidis* já havia sido confirmada por Souza et al., (2007). Assim como nosso trabalho os autores constaram que o halo de inibição eram maiores nas maiores concentrações investigadas. Entretanto, os autores constataram que o extrato investigado também era eficiente contra a cepa *E. coli*, o que não ocorreu nos nossos testes. Os diferentes resultados para a cepa em questão pode ser em decorrência ao tipo de extrato investigado ou as concentrações testadas.

Três, das cinco cepas bacterianas (*S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*) investigadas no presente trabalho estão dentre os micro-organismos mais importantes em se tratando de resistência bacteriana (ALVES et al., 2016). A resistência desenvolvida pelas bactérias frente aos antimicrobianos existentes tem ocorrido com uma velocidade bem superior à descoberta de novos produtos capazes de um eficaz tratamento contra as infecções causadas por esses microorganismos (FERREIRA et al., 2010).

Essa resistência a antibióticos desenvolve se em decorrência da habilidade da população bacteriana em se adaptar. Essa adaptação ocorre por: a) mutações; b)

aquisição de plasmídeos; c) produção de enzimas que inativam o medicamento; d) efluxo contínuo do antibiótico; e) síntese de novas enzimas que não sofrem a ação do medicamento e que apresentam a mesma atividade metabólica das enzimas que seriam inativadas pelo fármaco em questão (SILVEIRA et al., 2006; MURRAY, ROSENTHAL; PFALLER, 2014; ALVES et al., 2016).

A atividade antimicrobiana de *S. adstringens* está associada aos compostos presentes na casca dessa espécie, como os flavonoides e a classe dos taninos, (HASENACK et al., 2008; ALVES et al., 2016; SILVA; BIESKI, 2018). Em um levantamento feito sobre os usos de *S. adstringens*, 100% dos autores referem-se aos taninos como principal responsável pela atividade terapêutica do barbatimão (FERREIRA; SILVA; SOUZA, 2013).

A atividade antimicrobiana dos taninos é conhecida, sendo essa atividade extinta quando os taninos são eliminados tanto de extratos aquosos quanto de acetônicos (DJIPA; DELME; QUETIN-LECLERCQ, 2000). O potencial farmacológico dos taninos está relacionado a três características: a) a capacidade dos compostos formarem complexos com íons metálicos, como o ferro, alumínio, cálcio e cobre, dentre outros; b) a atividade antioxidante pelo sequestro de radicais livres; (HOYOS-MARTÍNEZ et al., 2019) e c) habilidade de formar complexos com proteínas e polissacarídeos (SOUZA-KANESHIMA et al., 2016). Essa capacidade de formar complexos com proteínas e polissacarídeos está relacionada à propriedade cicatrizante dos taninos, isso por que a ligação (tanino-proteína ou tanino-polissacarídeo) é insolúvel em água, desse modo, haverá a formação de uma camada protetora sobre a lesão e, abaixo dessa camada, ocorrerá naturalmente o processo de cicatrização (RODRIGUES, 2015).

A atividade de *S. adstringens* frente a bactérias gram-positivas, e ausência nas cepas gram-negativas, está de acordo com a literatura, onde há relatos de maior sensibilidade de cepas gram-positivas aos metabólitos secundários (HASENACK et al., 2008; ELLER et al., 2015; SOARES; PEREIRA 2016; ALVES et al., 2016). Isso deve se ao fato da membrana externa de bactérias gram-negativas atuar como uma barreira, dificultando a entrada de várias moléculas de antibióticos. Adicionalmente, as enzimas do espaço periplasmático são capazes de degradar moléculas vindas de fora da célula (DUFFY; POWER, 2001).

5.3 Toxicidade em *Artemia salina* Leach

O ensaio de toxicidade em *Artemia salina* mostrou que o decocto das cascas de *S. adstringens* apresentou baixa capacidade letal frente à *Artemia salina*. Não houve mortalidade na menor concentração investigada. A taxa de mortalidade ficou acima de 50% em 24 h de exposição somente para as duas maiores concentrações analisadas (0,031 e 0,062 g/mL) (Tabela 2). A ausência de toxicidade do decocto de *S. adstringens* foi confirmada pela $CL_{50} = 14.625,000 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 2- Frequência (%) de náuplios mortos após 24 h de exposição a quatro concentrações do decocto das cascas de *S. adstringens*.

Concentração do decocto de <i>S. adstringens</i>	Nº de <i>A. salina</i> testadas	% de mortos
0,008 g/mL	90	0
0,016 g/mL	90	44,4
0,031 g/mL	90	76,6
0,062 g/mL	90	100
Dicromato de potássio	90	100
Água marinha sintética	90	0

De acordo com Dolabela (1997), o composto é considerado altamente tóxico em casos de $CL_{50} < 80 \mu\text{g/mL}$; entre $80 \mu\text{g/mL}$ e $250 \mu\text{g/mL}$, moderadamente tóxico; $CL_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$ baixa toxicidade ou não tóxico. Vários estudos têm sido realizados com objetivo de avaliar a toxicidade de plantas medicinais e, assim, contribuir para o uso seguro de espécies popularmente utilizadas na medicina popular. Neste cenário, o teste em *A. salina* tem sido bastante utilizado como “*screening*” de toxicidade de plantas medicinais, devido à fácil aplicabilidade, resultados rápidos além de apresentar uma boa correlação com os testes em animais (PARRA-LARGATO et al., 2001; RAMOS et al., 2009; SILVA et al., 2017).

A fração rica em proantocianidinas (tanino condensado) extraídas das cascas de *S. adstringens* foi utilizada em três concentrações (F2: 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) para a investigação de toxicidade em *Artemia salina*. Os autores constaram que à

medida que aumentava a concentração do extrato, o número de sobreviventes de *A. salina* diminuía, entretanto, a DL_{50} obtida estava acima da concentração máxima investigada de 1000 µg/mL, indicando uma baixa toxicidade de *S. adstringens* (COSTA et al., 2010). Corroborando com os nossos resultados.

Já Trolezi, et al. (2017) analisaram a toxicidade do extrato metanólico das cascas de *S. adstringens*, em ratos. Na investigação os autores administraram 5 g/kg de extrato de casca do barbatimão, por gavagem, em ratos Wistar. O teste de toxicidade evidenciou que o extrato de *S. adstringens*, não apresentou toxicidade aguda. Não foram observadas alterações nos parâmetros bioquímicos das funções hepáticas e renais ou no comportamento animal. As contagens de eritrócitos e leucócitos também foram semelhantes aos animais controle.

As plantas medicinais são muito úteis no tratamento de diversas enfermidades, principalmente em países em desenvolvimento, em função do alto custo dos medicamentos e à dificuldade de atendimento nos setores de saúde. A atividade terapêutica de algumas espécies vegetais advém dos diferentes compostos naturais derivados do metabolismo primário e secundário, entretanto, esses metabólicos podem apresentar tanto efeitos terapêuticos como tóxicos ao organismo (ALMEIDA et al., 2009; BELCAVELLO et al., 2012 PRAJITHA; THOPPIL, 2016). Desse modo, investigar o potencial tóxico de plantas medicinais é de extrema importância para o uso seguro dessas espécies.

5.4 Teste de *Allium cepa* L.

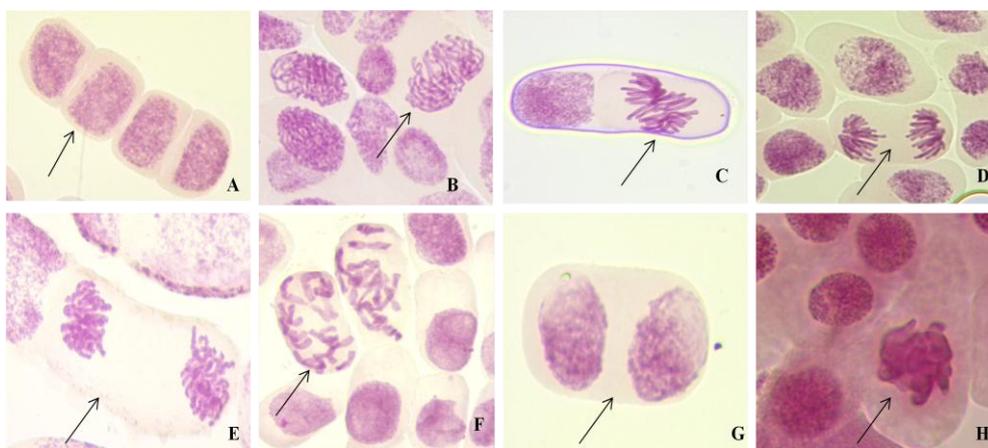
Nossos resultados mostram que não houve diferença significativa para o índice mitótico (IM), alterações cromossômicas (AC) e alterações nucleares (AN), em relação ao controle negativo (água mineral), considerando um nível de significância com valor de $p \leq 0.05$ (Tabela 3).

No presente trabalho, foi possível visualizar todas as fases do ciclo mitótico nas raízes de *A. cepa* expostas a água mineral (controle negativo). Entretanto, as raízes de *A. cepa* previamente tratadas com o decocto das cascas de *S. adstringens* só apresentavam células em prófase inicial (Tabela 3). A prófase inicial é caracterizada pela presença de cromossomos compactados de tal forma que não é

possível visualizar com exatidão as cromátides cromossômicas. A ausência dos demais estágios da mitose nas raízes de *A. cepa* pode ser um indicativo de que o decocto da casca de *S. adstringens* apresenta toxicidade. Tendo em vista que em 0,062 g/mL de material extraído 8,5% são de taninos, a toxicidade observada pode ser atribuída aos taninos, já que estudos atestam tanto para a atividade farmacológica quanto para a toxicidade dessa classe de composto (MINATEL et al., 2010; VILAR et al., 2010).

O potencial genotóxico do decocto de *S. adstringens* foi avaliado por meio das alterações cromossômicas, observadas nas raízes de *A. cepa* (Figura 12). As alterações encontradas nos tratamentos foram: C-metáfase (0,06%) e aderência cromossômica (0,03%). A C-metáfase esteve presente nas concentrações: 0,016, 0,031 e 0,062 g/mL. As aderências cromossômicas foram visualizadas nos tratamentos: 0,008 e 0,031 g/mL. A ocorrência dessas AC não diferiu estatisticamente do controle negativo, o que indica que o decocto das cascas de *S. adstringens* não teve ação genotóxica nas concentrações testadas no presente estudo (Tabela 3).

Figura 12- Células em divisão nas raízes de *A. cepa*. **A-** célula em interfase (controle negativo); **B -** célula em prófase (0,062 g/mL); **C-** células em metáfase (controle negativo); **D-** células em anáfase (controle negativo); **E-** célula em telófase (controle negativo); **F-** C-metáfase (0,016 g/mL); **G-** célula binucleada (0,031 g/mL); **H-** aderência cromossômica (0,008 g/mL).



Fonte: própria autora.

A análise do potencial mutagênico no decocto das cascas de *S. adstringens* foi feita pela frequência de anormalidades nucleares, tais como: micronúcleo e células binucleadas no teste *A. cepa*, foi constatado que a espécie não apresenta atividade mutagênica. Em nossas análises, não foi visualizado micronúcleo em qualquer das concentrações testadas, a ausência de micronúcleos pode ser um indicativo que o decocto não apresenta mutagenicidade. Ou ainda, pode ser que a mutagenicidade não foi detectada por que o decocto foi tão citotóxico a que a célula não concluiu a mitose.

A única alteração nuclear observada nos tratamentos foi presença de células binucleadas. Essa alteração esteve presente em todas as concentrações analisadas. A frequência de células binucleadas para cada tratamento foi: 0,13% para as concentrações 0,008 e 0,016 g/mL; 0,1% na concentração de 0,031 g/mL; 0,08% para a concentração máxima analisada (0,062 g/mL) e 0,08% para o controle negativo. Entretanto, os valores encontrados nos tratamentos não diferem estatisticamente do controle negativo (Tabela 3).

Tabela 3- Total de células analisadas por tratamento, seguida da quantidade de células em processo mitótico nas raízes de *A. cepa*. Média e DP, do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico para *S. adstringens* no teste de *A. cepa*.

Tratamentos	Total de células analisadas	Número de células nas fases do ciclo celular					Atividade		
		Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	<u>Citotóxica</u> IM %	<u>Genotóxica</u> AC	<u>Mutagênica</u> CB
<i>S. adstringens</i> 0,008 g/mL	6000	5055	945	0	0	1	15,76± 3,8 ^a	0,33±0,51 ^a	1,33±0,51 ^a
<i>S. adstringens</i> 0,016 g/mL	6000	5051	949	0	0	0	15,81± 2,8 ^a	0,33±0,51 ^a	1,33±0,81 ^a
<i>S. adstringens</i> 0,031 g/mL	6000	4978	1022	0	0	0	17,03±4,7 ^a	0,33±0,81 ^a	1±0,89 ^a
<i>S. adstringens</i> 0,062 g/mL	6000	5270	730	0	0	0	12,16±3,8 ^a	0,16±0,40 ^a	0,83±0,75 ^a
Água mineral	6000	4878	972	54	45	51	16,2±3,2 ^a	0,33±0,51 ^a	0,83±0,98 ^a
MSE 166 µg/mL	6000	5274	698	11	5	12	11,4 ±2,08 ^{b*}	4,8±3,1 ^b	2,66±1,03 ^b

*Letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0.05)

IM: índice mitótico / AC: alterações cromossômicas/ CB: células binucleadas

As ACs são consequências do potencial genotóxico de diferentes compostos intrínsecos e extrínsecos, aos quais estamos constantemente expostos (NATARAJAN, 2002). A baixa taxa de alterações cromossômicas e nucleares no organismo-teste pode estar relacionada à atividade citotóxica da substância testada, que inibiu o processo mitótico da raiz e, conseqüentemente, evitou a visualização de efeitos dependentes do ciclo celular em *A. cepa*, pois se não há divisão, não há como analisar os efeitos nas fases mitóticas (SUDHAKAR et al., 2001; FERNANDES; MAREZZO; MARIN-MORALES, 2007). Desse modo, os constituintes citotóxicos podem causar problemas em ensaios baseados em células, uma vez que podem mascarar a detecção de outras bioatividades ou a presença de outros compostos com a eficácia desejada (ATANASOV, 2015).

A citotoxicidade das cascas de *S. adstringens* já foi comprovada em diferentes sistemas (VILAR et al., 2010; BALDIVIA et al., 2018). Vilar et al. (2010) investigou a citotoxicidade e mutagenicidade do extrato das cascas do barbatimão nos testes: SOS-Inductest, Chromotest e Teste de Ames. Corroborando com os nossos resultados, o extrato de *S. adstringens* apresentou citotoxicidade em todos os sistemas testados. E não apresentou atividade mutagênica para as concentrações testadas.

O extrato aquoso das cascas de *S. adstringens* apresentou citotoxicidade contra as células de melanoma B16F10Nex-2, ocasionando na morte celular por apoptose em aproximadamente 19,6 e 36,7% das células previamente tratadas com o extrato nas concentrações de 65 e 100 µg/mL. Essas células apresentaram um aumento de 40% no índice das caspase-3, uma proteína pro-apoptótica, após 24 h de exposição ao extrato das cascas de *S. adstringens* (BALDIVIA et al., 2018).

A toxicidade do extrato das cascas de *S. adstringens* também foi constatada em células hematológicas de camundongos, onde foi possível constatar que os animais tratados com 1600 mg/kg do extrato do barbatimão por 30 dias apresentaram uma diminuição no peso do timo. O grupo de animais tratados com a dose 800 mg/kg pelo mesmo período também apresentaram efeitos tóxicos ao organismo. Evidenciando que o uso de *S. adstringens* por longos períodos pode causar efeitos tóxicos ao organismo ainda que em baixas doses (REBECCA, et al., 2002).

A possível citotoxicidade das cascas de *S. adstringens* pode ser um indicativo que essa planta apresenta potencial antineoplásico, uma vez que o crescimento desordenado é uma das características de células tumorais e uma planta com potencial de paralisar essa divisão celular pode ser uma candidata a futuros estudos que visem o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer. A fração obtida das cascas do caule de *S. adstringens*, testada *in vitro* contra a linhagem de célula B16F10Nex-2 (melanoma) evidenciou que a citotoxicidade do barbatimão foi capaz de aumentar os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio, causar a disfunção do potencial de membrana mitocondrial e a ativação da caspase-3 clivada, uma proteína pro-apoptótica, indicando indução de morte celular nas células tratadas com *S. adstringens* (BALDIVIA et al., 2018).

A paralisação do processo mitótico observada em nossos resultados pode estar relacionada à ação do extrato das cascas de *S. adstringens* sobre as proteínas α e β tubulinas que compõem fibras do fuso mitótico. A desmontagem do microtúbulo que compõe o fuso mitótico pode atrasar a prófase por horas até que o mesmo seja reestruturado e o processo de divisão retomado (RIEDER; COLE, 2000). Ou ainda, pode ser que as células sofreram alteração no material genético durante a prófase inicial e estejam retornando à interfase até que o erro seja corrigido e a mitose seja retomada. O mecanismo de retorno à interfase envolve a inibição da CDK1 juntamente com as histonas H1 e H3 (RIEDER; COLE 1998).

Quanto as AC observadas nas células meristemáticas de *A. cepa*, tanto a aderência cromossômica como a C-metáfase são efeitos predominantemente aneugênicos (TEIXEIRA, 2014). A C-metáfase é um evento que ocorre em decorrência da não formação das fibras do fuso, resultando na dispersão dos cromossomos sobre as células (LEAVAN, 1938). Em relação à aderência cromossômica, elas são assim classificadas por se tratarem de agrupamentos cromáticos envolvendo poucos cromossomos ou todo o genoma. A aderência é resultado do aumento da contração e condensação cromossômica e parcial dissolução de proteínas nucleares. Essa alteração é do tipo irreversível e provavelmente acarretará na morte celular (KHANNA; SHARMA, 2013; GOMES et al., 2015).

A ausência de genotoxicidade no extrato das cascas de *S. adstringens* já foi constatada em diferentes testes. Costa et al. (2010), analisaram a fração rica em polímeros de proantocianidinas extraídas da casca de *S. adstringens* pelo ensaio do micronúcleo utilizando eritrócitos de camundongos. Os autores constataram que nenhuma das concentrações avaliadas apresentou atividade genotóxica. Coelho (2015) investigou o potencial genotóxico da pomada das cascas de *S. adstringens* (10%) sobre o processo de reparação tecidual utilizando ensaio do micronúcleo em sangue periférico de ratos Wistar. A frequência de micronúcleo foi calculada após 24, 48 e 72 h de tratamento com a pomada. *S. adstringens* não apresentou atividade genotóxica nos tratamentos. Os estudos de Costa et al. (2010) e Coelho (2015) corroboram os resultados encontrados em nosso estudo pelo teste de *A. cepa*.

Já Vilar et al. (2010) analisaram a atividade genotóxica do extrato das cascas do barbatimão pelo ensaio *SOS-Inductest*, e constatou que a espécie apresentou genotoxicidade pela diminuição da sobrevivência da cepa bacteriana analisada (*Escherichia coli*). Ainda segundo os autores, a genotoxicidade encontrada pode ser explicada em parte pela presença dos taninos nas cascas de *S. adstringens*, esses compostos têm a capacidade de se ligarem a proteínas ocasionando na formação de grandes agregados protéicos, propriedade essa que poderia afetar tanto a atividade enzimática quanto a replicação de DNA pela formação de ligações cruzadas com proteínas necessárias. Os diferentes resultados encontrados também podem estar associado às diferenças metodológicas, os tipos de extratos utilizados bem como, as concentrações testadas. Outro mecanismo de toxicidade associada ao tanino deve-se a capacidade de se complexarem facilmente aos íons metálicos. Os sistemas biológicos necessitam de íons metálicos como co-fatores enzimáticos (SCALBERT, 1991).

Assim como em nosso estudo, outros trabalhos dedicaram-se a investigar o potencial mutagênico do extrato das cascas de *S. adstringens*. E a espécie em questão não apresentou atividade mutagênica em qualquer desses estudos (VILAR et al. 2010; COELHO 2015), confirmando os nossos resultados. A presença de células binucleadas encontradas em nossas análises pode ser resultado da inibição do processo de citocinese na célula em divisão (KHANNA; SHARMA, 2013).

6. CONCLUSÕES

- O decocto das cascas de *S. adstringens* apresentou 6,2% de teor de sólidos. O rendimento do método extrativo utilizado foi de 31%. A partir desses resultados, a concentração do decocto foi determinada.
- O decocto das cascas de *S. adstringens* esteve de acordo com os padrões de qualidade estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira quanto à perda por dessecação (11,34%) e teor de taninos (8,2%). Portanto, os métodos utilizados no preparo da droga vegetal foram eficientes e o decocto das cascas do barbatimão atende aos parâmetros de qualidade estabelecidos para a droga vegetal.
- O teor de flavonoides encontrados no decocto das cascas de *S. adstringens* foi 0,75%.
- O decocto das cascas de *S. adstringens* apresenta atividade antimicrobiana contra as cepas gram-positivas *E. faecales*, *S. aureus* e *S. epidermidis* sendo os resultados mais expressivos nas maiores concentrações avaliadas. Esses resultados estão de acordo com a literatura em que há relatos de que as bactérias gram-positivas são mais susceptíveis ao extrato de plantas medicinais.
- O decocto das cascas de *S. adstringens* não apresentou toxicidade em *A. salina* $CL_{50}=14,624,000 \mu\text{g/mL}$.
- A paralisação da mitose em prófase inicial demonstra que *S. adstringens* apresenta citotoxicidade nas concentrações testadas por meio do teste *A. cepa*. A citotoxicidade das cascas de *S. adstringens* está de acordo com dados da literatura.
- Os resultados da investigação genotóxica e mutagênica indicam que o decocto das cascas de *S. adstringens* não apresenta potencial genotóxico ou mutagênico pelo teste de *A. cepa* nas concentrações testadas.
- Apesar de nossos resultados não cobrirem todos os possíveis riscos, o presente estudo reporta ausência de qualquer indicio que o uso do barbatimão comprometa a segurança do uso popular como planta medicinal nas condições testadas.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados encontrados abrem a perspectiva do uso seguro do barbatimão como planta bactericida e citotóxica. Esse potencial é promissor inclusive como uma devolutiva aos pacientes entrevistados na unidade de quimioterapia do Hospital Araújo Jorge (HAJ/ACCG) quanto aos aspectos de paralisação do ciclo celular induzida pelo decocto e potencial extrapolação para outros modelos biológicos além do *A. cepa*. Ao certo, a aplicabilidade do barbatimão depende de investigações mais complexas referentes à: formas de administração, doses, tempo de uso, biodisponibilidade, metabolização e qualidade da droga vegetal utilizada.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**, 5. ed. Porto Alegre: Artmed, p.1205- 1256, 2010.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Revista Química Nova**, v. 28, n.1, p.118-129, 2005.

ALMEIDA, A.C.; SOBRINHO, E. M.; PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; MARTINS, E. R.; DUARTE, R. E.; SANTOS, H. O.; BRANDI, I. V.; CANGUSSU, A. S.; COSTA, J. P. R. 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**, v.40, n.1, p.1-4, 2009.

ALMEIDA, N. F.; MORI, F. A. GOULART, S. L. MENDES, L. M. Estudo da reatividade de taninos de folhas e cascas de barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.38, n.87, p.401-408, 2010.

ALVES, J. E.; SOUZA, T. A.; LACERDA, G. A.; PRINCE, P. M. A. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de jatobá-do-Cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne) e barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville). **Revista Bionorte**, v.5, n.1, p. 1-10, 2016.

AMARANTE, C. B.; MÜLLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazônica**, v. 41, n.3, p.431- 434, 2011.

AMAROWICZ, R.; JANIÁK, M. Hydrolysable Tannins. In: LAURENCE, M.; FERREDOON, S. V. **Encyclopedia of Food Chemistry**, v.3, Peter. Elsevier, p.337-343, 2019.

ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Phytotherapy in primary health care. **Revista Saúde Pública**, v.48, n.3, p.541-553, 2014.

ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, EVA-MARIA, LINDER, T.; WAWROSCHEK, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M., SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.;

MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology Advances**, v.33, n.8, p.1582-1614, 2015.

ARAÚJO, T. S.; BRITO, C. R.; AGUIAR, M. C. R. D.; CARVALHO, M. C. R. D. Perfil sócio-econômico dos raizeiros que atuam na cidade de Natal (RN). **Infarma**, v.15, n.1/3, p.77-79; 2003.

BAGATINI, M. D.; FACHINETTO, J. M.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.2B, p.632-636, 2009.

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

BALDIVIA, D. S.; LEITE, D. F.; CASTRO, D. T. H.; CAMPOS, J. F.; SANTOS, U. P.; PAREDES-GAMERO, E. J.; CAROLLO, C. A.; SILVA, D. B.; SOUZA, K. P.; SANTOS, E. L. Evaluation of In Vitro Antioxidant and Anticancer Properties of the Aqueous Extract from the Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens*. **International Journal Molecular Sciences**, v.19, n.8, p.1-23, 2018.

BANDEIRA, C. M.; ALMEIDA, A. A.; GONÇALVES, A. J. Polimorfismos genéticos da família Citocromo P450 e carcinoma de células escamosas de cavidade oral, faringe e laringe. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.41, n.5, p.366-373, 2014.

BATE-SMITH, E. C.; SWAIN, T. Flavonoid compound. In: FLORKIN M.; MASON, H.S.; (Eds.), **Comparative Biochemistry**, New York: Academic Press, p. 755-809, 1962.

BARRETO, N. M.; ANGELINI, R. 2003. **Mapeamento topográfico e delimitação fitofisionômica da área natural do campus da UEG**. In: Amostra de iniciação científica da UEG, Anápolis. Anais. Universidade Estadual de Goiás, Anápolis.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**, Brasília, v.2, 5 ed. p. 899, 2010.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Teste de sensibilidade aos antimicrobianos**. Disponível em:<

http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/interpretacao.htm > Acessado em: 10/07/2018.

BRASIL. ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014**. Disponível em:<
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf >
Acessado em: 20/04/2019.

BRASIL. ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Disponível <
https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_5_2004.pdf > Acessado em 10/08/2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monografia da espécie *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão)**. Brasília, p.55, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Secretaria de ciência, tecnologia e insumos estratégicos, departamento de assistência farmacêutica. 1. ed. Série B. Brasília: Ministério da Saúde, p.60, 2006.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **O Bioma Cerrado**. Disponível em:
<<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>> Acesso em: 20 de Dezembro de 2018.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas: Cerrado**. Brasília: MMA, p.200, 2011.

BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI N. N.S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C. F. F.; SANTOS, A. C. P.; MONTE-MÓR, R. L. M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.141-148, 2008.

BrCAST - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Teste sensibilidade aos antimicrobianos, método de disco-difusão EUCAST**. Versão 5.0, 2016. Disponível em:< <http://brcast.org.br/documentos/> >Acessado em: 10/07/2018.

BELE, A. A.; JADHAY, V. M.; KADAM, V. J. Potential of taninnis: a review. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.9, n.4, p.209-2014, 2010.

BELCAVELLO, L.; CUNHA, M. R. H.; ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. C. P. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza on line**, v.10, n.3, p.140-145, 2012.

BEZRUKOV, V. F.; LAZARENKO, L. M. Environmental impact on age-related dynamics of karyotypical instability in plants. In: JOSEPHY, D; SIEGFRIED KNASMUELLER. **Mutation Research**. Elsevier, 2002, p.113-118.

BORCHARDT, J. K. The Beginnings of Drug Therapy: Ancient Mesopotamian Medicine. **Drug News & Perspectives**, v.15, n.3, p.187-192, 2002.

BOURVELLEC, C. L.; RENARD, C. M. G. C. Interactions Between Polyphenols and Macromolecules: Effect of Tannin Structure. **Enciclopédia de Química Alimentar**, p.515-521, 2018.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.2, p.179-189, 2000.

CALIXTO, J. S.; RIBEIRO, A. E. M. **O Cerrado como fonte de plantas medicinais para uso dos moradores de comunidades tradicionais do alto Jequitinhonha, MG**. In: II Encontro nacional de Pós-graduação em Ambiente e Sociedade, Indaiatuba, p.1-20, 2004.

CASSILETH, B. R.; DENG, G. Complementary and alternative therapies for cancer. **The Oncologist**, v.9, n.1, p.80-89, 2004.

CHAVES, D. A.; LEMES, S. R.; SOUSA, M. A. M.; GONÇALVES, E.; SOUZA A. R.; ARAÚJO, L. A.; MRUÉ, F.; MELO-REIS, P. R. Avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica do Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). **Estudos vida e saúde**, v.44, p.56-61, 2017.

CHAVES, I. L. S. **Extração e caracterização de taninos de cascas de eucalipto cultivado em ambientes contrastantes**. 2018. 60 f. Dissertação (mestrado em Ciências Florestais) Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, 2018.

CHINI, S. O. **Taninos e Flavonoides em *Lottus spp.*** 2013. 134 f. Dissertação (mestrado em Agronomia e Medicina Veterinária) Universidade de Passo Fundo, Passo fundo, 2013.

COELHO, J. M.; ANTONIOLLI, A. B.; SILVA, D. N.; CARVALHO, T. M. M. B.; PONTES, E. R. J. C.; ODASHIRO, A. N. Effects of silver sulfadiazine, ipê roxo (*Tabebuia avellanedae*) extract and barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) extract on cutaneous wound healing in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.37, n.1, p.45-51, 2010.

COELHO, J. M. **Avaliação toxicogenética, bioquímica e da reparação tecidual em modelo experimental submetido a tratamentos com extrato de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. Ex DC) Mattos (Ipê-roxo) e de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão).** 2015. 73 f. Tese (Doutorado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.

COSTA, L. F. R. **Sistema de automatização do antibiograma por disco-difusão em aplicação clínica e ambiental.** 2016. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica), Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

COSTA, M. A.; ISHIDA, K.; KAPLUM, V.; KOSLYK, E. ALVES, D.; MELLO, J. C. P.; UEDA-NAKAMURA, T; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V. 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**, v.58, n.2, p.330-335, 2010.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química nova**, v.31, n.7, p.1820-1830, 2008.

COUTO, R. O.; VALGAS, A. B.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n.3, p. 59-69, 2009.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, n.6, p.3670-95, 2013.

CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*, publication M02-A12. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard- Twelfth edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v.35, n.1, p.1-15, 2015.

DANTAS, L. Q.; SILVA, J. R. L.; OLIVEIRA, D. A.; PONTES, K. L. C.; ARAÚJO, C. R. F. O uso do Barbatimão: do saber popular ao conhecimento científico. **Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde**, p.1-10, 2018.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v.14, n.2, p. 299-315, 2014.

DIAS, J. E.; LAUREANO, L. C. Farmacopéia popular do cerrado. 1ª ed. Goiás: Articulação Pacari; p. 352, 2010.

DIAZ, E. E. F.; SAITO, R. F.; CHAMMAS, R. Introdução ao Câncer. In: SAITO, R. F.; LANA, M. V. G.; MEDRANO, R. F. V.; CHAMMAS, R. **Fundamentos de Oncologia Molecular**, São Paulo. Atheneu. 2015. p.01-14.

DIRAR, A. I.; ALSAADI, D. H. M.; WADA, M.; MOHAMED, M. A.; WATANABE, T.; DEVKOTA, H. P. Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. **South African Journal of Botany**, v.120, p.261-267, 2019.

DJIPA, C. D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.307-313, 2000.

DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti *Tripanossoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. 1997. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Farmacologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1997.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multi Ciência**, n.7, p.1-16, 2006.

DUFFY, C. F.; POWER, R. F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.17, n.6, p.527-529, 2001.

ELGORASHI, E. E.; TAYLOR J. L. S.; MAES, A. VAN STADEN, J.; KIMPE, N.; VERSCHAEVE, L. Screening of medicinal plants used in south African traditional medicine for genotoxic effects. **Toxicology Letters**, v.143, n.2, p.195-207, 2003.

ELLER, S. C. W. S.; FEITOSA, V. A.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica *in vitro*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.36, n.1, p.131-136, 2015.

EMBRAPA- Agência de Informação Embrapa. **Bioma Cerrado**. Disponível em< <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/Abertura.html> > Acesso em: 27 de Dezembro de 2018.

EURIDES, D.; FRANCO, L. G.; MOURA, M. I.; CAMPOS, S. B. S.; FREITAS, S. L. R. *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville. In: SILVA, L. A. F.; EURIDES, D.; PAULA, J. R.; LIMA, C. R. O.; MOURA, M. I. **Manual do barbatimão**. Goiânia: Kelps, 2010. p. 69-78.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5º ed. v.1 p.545, Brasília, 2010.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, n.3, p.252-259, 2007.

FELFILI, J. M.; JUNIOR, M. C. S.; DIAS, B. J. REZENDE, A. V. Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no cerrado *sensu stricto* da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, n.1, p.83-90, 1999.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. C.; **Oncologia Molecular**. 2. ed. São Paulo, Atheneu, p.61-106, 2010.

FERREIRA, E. C.; SILVA J. L. L.; SOUZA, R. F. As propriedades medicinais e bioquímicas da planta *Stryphnodendron adstringens* “barbatimão”. **Ciências biológicas e da saúde**, v.11, n.3, p.14-32, 2013.

FERREIRA, S. B.; PALMEIRA, J. D.; SOUZA, J. H.; ALMEIDA, J. M.; FIGUEIREDO, M. C. P.; PEQUENO, A. S.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da Atividade Antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcolico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.42, n.1, p.27-31, 2010.

FONSECA, C. A; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v.16, n.7-8, p.51-54, 2004.

FORZZA, R. C., org., et al., INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil** [online]. Rio de

Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v.2, p.828, 2010.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v.18, n.especial, p.90-95, 2011.

FISKEJO, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v.102, n.1, p.99-112, 1985.

FUKUMASU, H.; LATORRE, A. O.; BRACCI, N.; GÓRNIK, S. L.; DAGL, M. L. Z. Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.21, n.2, p.49-59, 2008.

GERTSCH J Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: forth and back to intelligent mixtures. **Planta Médica**, v.77, n.11, p.1086-1098, 2011.

GOMES, J. V.; TEIXEIRA, J. T. S.; LIMA, V. M.; BORBA, H. R. Induction of cytotoxic and genotoxic effects of Guandu River waters in the *Allium cepa* system. **Revista Ambiente e Água**, v.1, n.10, p.1-11, 2015.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasílica**, v.17, n.4, p.561-584, 2003.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; MENDONÇA, G. A. S.; Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.3, n.51, p.227-234, 2005.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como Observar Cromossomos**. Ribeirão Preto, São Paulo: FUNPEC, 1 ed. p.132, 2002.

HAGERMAN, A. E. Tannin Handbook, 2002.

HASENACK, B. S.; SICHINELLI, J. M.; GARCIA, A. F.; GOMES, K. S.; COSTA, S. S. C. L.; OLIVEIRA, S. P. L. F. Atividade antibacteriana do extrato barbatimão sobre cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de secreções de feridas crônicas de

pacientes ambulatoriais. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v.10, n.1, p.13-18, 2008.

HERNANDES, L.; PEREIRA, L. M. S.; PALAZZO, F.; MELLO, J. C. P. Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, n.3, p.1-6, 2010.

HOYOS-MARTÍNEZ, P. L.; MERLE, J., LABIDI, J.; BOUHTOURY, F. C. Tannins extraction: A key point for their valorization and cleaner production. **Journal of Cleaner Production**, v.206, n.1, p.1138-1155, 2019.

INCA- Instituto Nacional de Câncer: A situação do câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2006.

INCA- Instituto Nacional de Câncer: Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2016.

JACONODINO, C. B.; AMESTOY, S. C.; THOFEHRN, M. B. A utilização de terapias alternativas por pacientes em tratamento quimioterápico. **Cogitare Enfermagem**, v.13, n.1, p.61-66, 2008.

JACOBSON, K. B. T.; GARCIA, J.; SANTOS, C.; DUARTE, J. B.; FARIAS, J. G.; KLIEMANN, H. J. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.35, n.3, p.163-169, 2005.

JESUS, N. Z. T.; FALCÃO, H. S.; GOMES, I. F.; LEITE, T. J. A.; LIMA, G. R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BATISTA, L. M. Tannins, Peptic Ulcers and Related Mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.3, p.3203–3228, 2012.

JORDÃO, B. Q.; ANDRADE, C. G, T. J. **Ciclo Celular e Meiose**. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Biologia Celular e Molecular*. 9 ed. Guanabara Koogan, p.177-202, 2012.

JUSTMAN, Q. A. Looking beyond the stop sign: cell-cycle checkpoints reconsidered. **Cell System**, v.5, n.5, p.438-440, 2017.

KAWAKAMI, M.; LIU, X.; DMITROVSKY, E. New cell cycle inhibitors target aneuploidy in cancer therapy. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.59, n.8, p.8-17, 2018.

KHANNA N.; SHARMA, S.; *Allium cepa* Root Chromosomal Aberration Assay: A Review. **Indian Journal of Pharmaceutical e Biological Research**, v.1, n.3, p.105-119, 2013.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Revista Megadiversidade**, v.1, n.1, p.1-9, 2005.

KLINK, C. A.; MOREIRA, A. G.; SOLBRIG, O. T. Ecological impacts of agricultural development in the Brazilian Cerrados. *The World's Savannas: Economic Driving Forces, Ecological Constraints and Policy Options for Sustainable Land Use (Man in the Biosphere Series 12 (eds Young MD, Solbrig OT))*, **Parthenon Publishing**, p. 259-283, 1993.

KOMAKI, S.; SUGIMOTO, K. Control of the plant cell cycle by developmental and environmental cues. **Plant Cell Physiology**, v.53, n.6, p.953-964, 2012.

KY, I.; LE FLOCH, A.; ZENG, L.; PECHAMA, T, L.; JOURDES, M.; TEISSEDRE, P. L. Tannins. **Encyclopedia of Food and Health**, p.247–255, 2016.

LADDHA, A. P.; KULKARNI, Y. A. Tannins and vascular complications of Diabetes: An update. **Phytomedicine**, v.15, n. 56, p.229–245, 2019.

LEONARDO-SILVA, L.; MOREIRA, I. C.; SILVA, T. M.; SILVA, L. B.; SANTOS, T. A. A.; OLIVEIRA, L. M.; SOUZA, D. F.; BRITO, A. O.; XAVIER-SANTOS, S. Bioprospecção de Fungos de um Fragmento de Cerrado no Brasil Central para Aplicações Biotecnológicas. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental**, v.7, n.1, p.288-305, 2018.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A.; *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v.682, n.1, p.71-81, 2009.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v.24: p.471-486, 1938.

LIMA, N. J. **Modelos matemáticos do ciclo celular**. 2016. 101 f. Tese (mestrado em engenharia matemática) Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Portugal, 2016.

LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. Kew: Royal Botanic Gardens, p.369, 1987.

LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, H.; AMON, A.; SCOTT, M. P. **Biologia Celular e Molecular**, 7. ed. Porto Alegre, Artmed, p.725-733, 2014.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACHINDER, B.; LOCK, M. 2005. Legumes of the World. **Royal Botanic Gardens, Kew**, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, v.2, p.384, 2008.

LUNA, J. S., SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n.2, p.199-206, 2005.

MACÁKOVÁ, K.; KOLEČKÁŘ, V.; CAHLÍKOVÁ, L.; CHLEBEK, J.; HOŠŤÁLKOVÁ, A.; KUČA, K.; JUN, D.; OPLETAL, L. Tannins and their Influence on Health. In: ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY M.; PERRY, G. **Recent Advances in Medicinal Chemistry**, Bentham Science Publishers. 2014 p.159-208.

MANGALAMPALLI, B.; DUMALA, N.; GROVER, P. *Allium cepa* root tip assay in assessment of toxicity of magnesium oxide nanoparticles and microparticles. **Journal of Environmental Sciences**, v.66, p.125-137, 2017.

MARTINS, M. M.; LUCARELLI, A. P.; OLIVEIRA, J. S.; MONTO, W. R.; *Synadenium grantii* e o câncer de mama. **Arquivos médicos**, v.62, n.2, p.98-101, 2017.

MARTINS, P. S.; ALVES, A. L. G.; HUSSNI, C. A.; SEQUEIRA, J. L.; NICOLETTI, J. L. M.; THOMASSIAN, A Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em eqüinos. **Archives of Veterinary Science**, v.8, n.2, p.1-7, 2003.

MEIRA, M. R.; CABACINHA, C. D.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R.; Barbatimão: ecologia, produção de tanino e potencial sócio econômico na região norte mineira. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer Goiânia, v.9, n.16; p.466-494, 2013.

MENEGUELLI, A. Z.; RIBEIRO, S. B.; JÚNIOR, G. A. L.; SPIROTTTO, E. O.; SOUZA, J. H. G. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos na saúde pública brasileira. **Revista Enfermagem e Saúde Coletiva**, v.1, n.1, p.2-12, 2017.

MENDONÇA, R. C.; FELFINI, J. M.; WALTER, B. M. T. Flora vascular do cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. **Cerrado, ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa/CAPC, p. 289-556, 1998.

MINATEL, D. G.; PEREIRA, A. M. S.; CHIARATTI, T. M.; PASQUALIN, L.; OLIVEIRA, J. C. N.; COUTO, L. B.; LIA, R. C. C.; CINTRA, J. M.; BEZZON, M. F. A.; FRANCA, S. C. Clinical study for the validation of the efficacy of ointment containing barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) on healing of decubitus ulcers. **Revista Brasileira de Medicina**, v.67, n.7, p.250-256, 2010.

MONTELES, R.; PINHEIRO, C. U. B. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.7, n.2, p.38-48, 2007.

MORAES, L. G.; ALONSO, A. M. OLIVEIRA-FILHO, E. C. Plantas medicinais no tratamento do câncer: uma breve revisão de literatura. **Universitas: Ciências da Saúde**, v.9, n.1, p.77-99, 2011.

MOURA, I. V. **Enfermidades cutâneas digitais bovina: aspectos genéticos e terapêuticos**. 2011, 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7. ed. Elsevier, p. 270- 281, 2014

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, n.6772, p.853- 858, 2000.

MYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN L .J. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, n.5, p.31-34, 1982.

NASCIMENTO, J. E.; MELO, A. F. M.; LIMA e SILVA, T. C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies

medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n.2, p.145-150, 2008.

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research**, v.504, p.3-16, 2002.

NUSSBAUM, R. L.; McINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson Genética Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro, Elsevier, p.560, 2016.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Revista Química Nova**, v.25, n.6, p.976-984, 2002.

OLIVEIRA, E. A. S. **Meia-vida as drogas, biodisponibilidade, biotransformação e excreção dos fármacos**, Farmacologia-USP, p.1-11, 2008.

OLIVEIRA, A. B.; LONGHI, J. G.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. A normatização dos fitoterápicos no Brasil. **Revista Visão Acadêmica**, v.7, n.2, p.1-13, 2007.

OLIVEIRA, L. A. R.; MACHADO, R. D.; RODRIGUES, A. J. L. Levantamento sobre o uso de plantas medicinais com a terapêutica anticâncer por pacientes da Unidade Oncológica de Anápolis. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.16, n.1, p.32-40, 2014.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.301-307, 2008.

OVEJERO, S.; AYALA, P.; MALUMBRES, M.; PIMENTEL-MUIÑOS, F. X.; BUENO, A.; SACRISTÁN, M. P. Biochemical analyses reveal amino acid residues critical for cell cycle dependent phosphorylation of human Cdc14A phosphatase by cyclin-dependent kinase 1. **Scientific Reports**, v.8, n.1, p.1-14, 2018.

PAES, J. B.; SANTANA, G. M.; AZEVEDO, T. K. B., MORAIS, R. M., JÚNIOR, J. T. C. substâncias tânicas presentes em várias partes da árvore angico-vermelho (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. var. *cebil* (Gris.) Alts.). **Scientia Forestalis**, v.38, n.87, p.441-447, 2010.

PAIXÃO, C. S.; SANTOS, M. O.; D'ÁVILA, V. G. F. C.; TERNES Y. M. F.; SANTOS, R. S. Polimorfismos genéticos da família citocromo P450 e o câncer. **Saúde e Ciência em Ação**, v.03, n.1, p118-133, 2016.

PANIZZA, S.; ROCHA, A. B.; GECCHI, R.; SOUZA E SILVA, R. A. P. *Stryphnodendron barbadetiman* (Vell) Martius: teor de taninos na casca e sua propriedade cicatrizante. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.10, p.101-106, 1988.

PARRA- LAGARTO, A.; SILVA, Y. R.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v.8, n.5, p.395-400, 2001.

PRAJITHA, V.; THOPPIL, J. E. Cytotoxic and apoptotic activities of extract of *Amaranthus spinosus* L. in *Allium cepa* and human erythrocytes. **Cytotechnology**, v. 69, n.1, p.123-133, 2016.

PESSÔA, G. A.; FERNANDES, J. A.; MATHEUS, J. P. C.; MATHEUS, L. B. G. Aumento da fadiga e redução da qualidade de vida após tratamento de câncer do colo do útero. **ConScientia e Saúde**, v.15, n.4, p.564-574, 2016.
PING, K. Y.; DARAH, I.; YUSUF, U. K.; YENG, C.; SASIDHARAN, S. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: an *Allium cepa* assay. **Moleculares**, v.17, p.7782-7791, 2012.

PIZZI, A. Tannins: Major sources, properties and applications. In **monomers, polymers and composites from Renewable resources**.1. ed. Elsevier, p 179-199, 2008.

POLUHA, W.; POLUHA, D. K.; CHANG, B.; CROSBIE, N. E.; SCHONHOFF, C. M.; KILPATRICK, D. L.; ROSS, A. H. The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor *p21^{WAF1}* Is Required for Survival of Differentiating Neuroblastoma Cells. **Molecular And Cellular Biology**, v.16, n.4, p.1335-1341, 1996.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v.26, n.4, p.485-492, 2002.

QUIRK, S. M.; COWAN, R. G.; HARMAN, R. M. Role of the cell cycle in regression of the corpus luteum. **Society for Reproduction and Fertility**, v.145, n.2, p.161-175, 2013.

RAMOS, S. C. S.; OLIVEIRA, J. C. S.; CÂMARA, C. A. G.; CASTELAR, I.; CARVALHO A. F. F. U.; LIMA-FILHO, J. V. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.2A, p.376-381, 2009.

REATTO, A.; MARTINS, E. S. Classes de solo em relação aos controles da paisagem do bioma Cerrado. In: SCARIOTI, A. SOUSA-SILVA, J. C.; FELFILI, J. M. (Org.) **Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação**. Brasília, Ministério do Meio Ambiente-MMA, p.49-59, 2005.

REBECCA, M. A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; GRESPA, R.; CUMAN, R. K. N.; CAPARROZ-ASSEF, S. M. A.; MELLO, J. C. P.; BERSANI-AMADO, C. A. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, n.1-2, p.101-104, 2002.

RENISUS: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnmpf/politica-e-programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos/plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-renisus> > Acesso em 03 de Junho de 2018.

REIS, P. E. D.; RODRIGUES, C. C.; VASQUES, C. I.; CARVAL, E. C. Efeitos adversos identificados em local de infusão intravenosa periférica por drogas quimioterápicas. **Ciência y Enfermería**, v. XIV n.2, p.55-64, 2008.

RIBEIRO, A. H.; ZANATTA, D. B.; STRAUSS, B. E. Ciclo celular e o reparo do DNA no câncer. In: SAITO, R. F.; LANA, M. V. G.; MEDRANO, R. F. V.; CHAMMAS, R. **Fundamentos de Oncologia Molecular**, 1. ed. São Paulo, Atheneu, p.97-115, 2015.

RICARDO, L. M.; DIAS, B. M.; MÜGGE, F. L. B.; LEITE, V. V.; BRANDÃO, M. G. L. Evidence of traditionality of Brazilian medicinal plants: The case studies of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão) barks and *Copaifera* spp. (copaíba) oleoresin in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v.219, p.319-336, 2018.

RIEDER C. L.; COLE, R. Microtubule disassembly delays the G2–M transition in vertebrates. **Current Biology**, v.10, n.17, p.1067-1070, 2000.

RIEDER, C. L.; COLE, R. W. Entry into Mitosis in Vertebrate Somatic Cells Is Guarded by a Chromosome Damage Checkpoint That Reverses the Cell Cycle When

Triggered during Early but Not Late Prophase. **The Journal of Cell Biology**, v.142, n.4, p.1013-1022, 1998.

RODRIGUES, D. F.; **Aspectos gerais sobre o extrato da casca do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) na cicatrização de feridas**. 2012. 42 f. Seminário (doutorado em Ciência Animal) Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2012.

RODRIGUES, D. F.; **Extrato de barbatimão e células mononucleares autólogas no tratamento de feridas excisionais de coelhos**. 2015. 84 f. Tese (doutorado em Ciência Animal) Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2015.

RODRIGUES, K. A.; OLIVEIRA, L. S.; NETO, F. R.; ARAÚJO, M. P.; GOMES, D. C. V. O uso de plantas medicinais pela comunidade da zona norte de Teresina–Pi e seus fins terapêuticos. **Revista Interdisciplinar**, v.10, n.4, p.77-81, 2017.

ROLIM, A.; MACIEL, C. P. M.; KANEKO, T. M.; CONSIGLIERI, V. O.; SALGADO SANTOS, I. M. N.; VELASCO, M. V. R. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss. (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) Commercial Extract. **Journal of AOAC International**, v.88, n.4, p.1015-1019, 2005.

SANTOS, M. A. C.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacology as a tool for the selection of medicinal plants for screening antitumour activity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.2, n.1, p.7-17, 1999.

SANTOS, R. L.; GUIMARAES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S.; Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p.486-491, 2011.

SALMON, S. E.; KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 6 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 629-655,1998.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, n.12. p.3875-3883, 1991.

SIENIAWSKA, S.; BAJ, T. Tannins. In: **Pharmacognosy**, p.199-232, 2017.

SILVA, S. G.; BIESKI, I. G. C. A importância medicinal dos flavonoides na saúde humana, com ênfase na espécie *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. **Revista Saúde Viva Multidisciplinar da AJES**, v.1, n.1, p.1-156, 2018.

SILVA, J. S.; HECK, M. C.; BUZO, M. G.; ALMEIDA, I.V.; VICENTIN, V. E. P. Evaluation of textile laundry effluents and their cytotoxic effects on *Allium cepa*. **Environmental Science and Pollution Research**, v.25, n.28, p.890-898, 2018.

SILVA, J. A. G.; LIMA, I. R.; SANTANA, M. A. N.; SILVA, T. M. S.; SILVA, M. I. A. G.; LEITE, S. P. *Screening* fitoquímico e avaliação da toxicidade de *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae) frente à *Artemia salina* Leach. **Revista virtual de Química**, v.9, n.3, p.934-941, 2017.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.618-626, 2008.

SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S.; CRUZ, A. L. N.; MENDES, J. C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.2, p.124-128, 2009.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F. GESSER, J. C.; SÁ, M. M.; TEREZI, H. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v.29, n.4, p.844-855, 2006.

SHIRMOHAMMADLI, Y.; EFHAMISISI, D.; PIZZI, A. Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review. **Industrial Crops and Products**, v.126, p.316-332, 2018.

SOARES, A. V. S.; PEREIRA, S. B. Inibição bacteriana do extrato fluido de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão) sobre cepas selecionadas de *Staphylococcus aureus*. **Revista Científica Sena Aires**, v.5, n.1, p.39-44, 2016.

SOUZA, C. N.; ALMEIDA, A. C.; XAVIER, M. T. R.; RAMOS, J. P. C. SILVA, L. M. V.; MARTINS, E. R. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais do Cerrado Mineiro frente a bactérias isoladas de ovinos com mastite. **Unimontes científica**, v.19, n.2, p.51-60, 2017.

SOUSA, W. C.; PAZ, A. T. S.; ROCHA, J. D.; CONCEIÇÃO, E. C.; ALMEIDA, L. M.; CHEN, L. C., BORGES, L. L.; BAILÃO, E. F. L. C. *In vivo* assessment of cyto/genotoxic, antigenotoxic and antifungal potential of *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe leaves and stems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.90, n.2, p.1565-1577, 2018.

SOUSA, J. N. **Obtenção de extratos padronizados a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) e avaliações biológicas *in vitro***. 2014 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

SOUZA-KANESHIMA, A. M.; KANESHIMA, E. N.; CAVALCANTI, A. V.; WIDERSKI, K. Estudo Terapeutico e geoeológico do *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville : Uma Revisão Integrativa. **Revista Conhecimento e Sociedade**, v.01, n.01, p.135-152, 2016.

SOUZA, T. M.; SEVERI, J. A.; SILVA, V. Y. A.; SANTOS, E.; PIETRO, R. C. L. R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.2, p.221-226, 2007.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; QUEIROZ-FERNANDES, G. M.; PIETRO, R. C. L. R. *Stryphnodendron* Species Known as “Barbatimão”: A Comprehensive Report. **Molecules**, v.23, n.4, 2018.

SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.17, n.1, p.71-75, 2007

SOUZA, M. M. T.; MOURA, F. M. C.; SILVA, T. A. S. M.; COSTA, P. S.; FIGUEIREDO, N. M. A.; PASSOS, J. P. Olhar-se sem cabelos – Estudo de enfermagem sobre mulheres com alopecia decorrente da quimioterapia antineoplásica. **Revista de Saúde**, v.08, n.2, p.16-22, 2017.

SCARIOTI, A. SOUSA-SILVA, J. C.; FELFILI, J. M Biodiversidade, ecologia e conservação do Cerrado: avanços no conhecimento In: SCARIOTI, A. SOUSA-SILVA, J. C.; FELFILI, J. M. (Org.) **Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação**. Brasília-DF, Ministério do Meio Ambiente-MMA, p.27-44, 2005.

SPADACIO, C.; BARROS, N. Uso de medicinas alternativas e complementares por pacientes com câncer: revisão sistemática. **Revista Saúde Pública**, v.42, n.1, p.158-164, 2008.

SLOCZYŃSKA, K.; POWROŹNIK, B.; PEKALA, E.; WASZKIELEWICZ, A. M.; Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal of Applied Genetics**, v.55, n.2, p.273-285, 2014.

SMERIGLIO, A.; BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; TROMBETTA, D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. **British Journal of Pharmacology**, v.174, n.11, p.1244–1262, 2017.

SUDHAKAR, R.; GOWDA, K. N. N.; VENU, G. Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa*. **Cytologia**, v.66, n.3, p.235-239, 2001.

TANAKA, T.; MATSUO, Y.; SAITO, Y. Solubility of Tannins and Preparation of Oil-Soluble Derivatives. **Journal of Oleo Science**, v.67, n.10, p.1179-1187, 2018.

TANIGUCHI, C.; GUENGERICH, F. P. Metabolismo dos Fármacos. In: GOLAN, D. E. TASHJIAN JR., A. H.; ARMSTRONG, E. J. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacologia**. 3. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.46-57, 2014.

TEIXEIRA, M. B. **Genotoxicidade e modificações anatômicas radiculares em *A. cepa* (Amaryllidaceae) provocados pelo efluente do beneficiamento de rochas ornamentais**. 2014, 85 f. Dissertação (mestrado em Botânica aplicada) Universidade Federal de Lavras-Minas Gerais, 2014.

TEIXEIRA, R. O.; CAMPAROTO, M.L.; MANTOVANI, M. S.;VICENTINI, V. E. P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in vivo assays. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.4, p.551-555, 2003.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: **Helianthus**, p.320, 2000.

TORRE, L.A.; SIEGEL, R. L.; WARD, E. M.; JEMAL, A. Global cancer incidence and mortality rates and trends-an update. **Cancer Epidemiology, Biomarkers e Prevention**, v.25, n.1, p.16-27, 2016.

TRISTÃO, M. C. **Uso do solo e conversão vegetacional: a perda da biodiversidade em dois fragmentos de Cerrado *Stricto Sensu* no município de Goiandira (GO)**. 2017. 187 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) Universidade Federal de Goiás, Catalão, 2017.

TROLEZI, R.; AZANHA, J. M.; PASCHOAL, N. R.; CHECHI, J. L.; SILVA, M. J. D.; FABRIS, V. E.; VILEGAS, W.; KANENO, R.; JUNIOR, A. F.; BOSCO, S. M. G. *Stryphnodendron adstringens* e tanino purificado em *Pythium insidiosum*: estudos *in vitro* e *in vivo*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.16, n.7, p.2-7, 2017.

VALENTE, C. R. **Caracterização geral e composição florística do Cerrado**. In: GUIMARÃES, L. D.; SILVA, M. A. D.; ANACLETO, T. C. (Org.). *Natureza Viva Cerrado: caracterização e conservação*. Goiânia, Editora da UCG, p. 211, 2006.

VICENTINI V. E. P.; CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. S. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, v.23, n.2, p.593-598, 2001.

VILAR, J. B.; D'OLIVEIRA, M. I. P.; SANTOS, S. C.; CHEN, C. L. Cytotoxic and genotoxic investigation on barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, 1910] extract. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, n.4, p.1-8, 2010.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I: techniques for chemically defining tannins. **Oecologia**, v.72, p. 37-147, 1987a.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II: techniques for chemically defining tannins. **Oecologia**, v.72, p.148-156, 1987b.

ANEXOS