

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO - UNIFENAS
MAYSA EDUARDA DE CASTRO

GENOTOXICIDADE DE *HANDROANTHUS IMPETIGINOSUS* E LAPACHOL
POTENCIALMENTE APLICÁVEIS NA PRODUÇÃO ANIMAL

Alfenas-MG

2017

MAYSA EDUARDA DE CASTRO

GENOTOXICIDADE DE *HANDROANTHUS IMPETIGINOSUS* E LAPACHOL
POTENCIALMENTE APLICÁVEIS NA PRODUÇÃO ANIMAL

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência Animal, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, BSB, MSc, PhD.

Alfenas-MG

2017

Dados de catalogação na publicação

Biblioteca Central da UNIFENAS

Castro, Maysa Eduarda de
Genotoxicidade de *Handroanthus impetiginosus* e lapachol
potencialmente aplicáveis na produção animal — Maysa Eduarda de
Castro.— Alfenas, 2017.
54 f.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo
Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação
em Ciência Animal -Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas,
2017.

1. *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos 2. Fitoterápico
3. Lapachol 4. Ensaio do micronúcleo 5. Roedores 6. Medula óssea
I. Universidade José do Rosário Vellano I. Título

CDU : 636.082:582.916.31(043)



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "Genotoxicidade de *Handroanthus impetiginosus* e lapachol potencialmente aplicáveis na produção animal".

Autor: Maysa Eduarda de Castro

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM CIÊNCIA ANIMAL** pela Comissão Examinadora.



Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo
orientador



Profa. Dra. Nelma de Mello Silva Oliveira



Prof. Dr. Manoel Rodrigues Francisco Netto

Alfenas, 21 de fevereiro de 2017.



Profa. Dra. Laura Helena Orfao
Diretora Adjunta de Pesquisa e Pós-graduação
UNIFENAS

*Dedico este trabalho aos meus pais, irmão,
familiares e amigos que me apoiaram e
incentivaram para a conquista deste sonho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, pois sem ele, esta jornada não seria cumprida.

Aos meus pais Adervânia e Ronilson e meu irmão Juninho, por não medirem esforços pra que este sonho se realizasse. Sem a compreensão, ajuda, amor e confiança de vocês, nada disso seria possível.

Aos demais familiares pelo apoio, dedicação, companheirismo, força e incentivo.

Ao meu orientador, professor Ph.D. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, pela paciência, ensinamentos, atenção, amizade e dedicação ao longo desses dois anos. Foi um privilégio ser orientada por você!

Aos amigos pelo apoio e dedicação, em especial a Thaísia, pelos ensinamentos, paciência, sugestões e companheirismo durante todo o processo.

À *Rede Mineira de Ensaio Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos* (REDE MINEIRA TOXIFAR), *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais* (FAPEMIG), à Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS).

“Um dia você vai acordar e não haverá
mais tempo para fazer as coisas
que você sempre quis.
Faça-as agora !”

(Paulo Coelho)

RESUMO

CASTRO, Maysa Eduarda de. **Genotoxicidade de *Handroanthus impetiginosus* e lapachol potencialmente aplicáveis na produção animal**. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - UNIFENAS, Alfenas, 2017.

Handroanthus impetiginosus (Mart. ex DC.). Mattos (HI) tem sido muito utilizada por um extenso período na medicina tradicional e vários estudos têm mostrado a presença de compostos químicos e potenciais fitoterapêuticos dessa planta. O objetivo foi avaliar a genotoxicidade do extrato de *H. impetiginosus* e do lapachol (LAP), um dos principais compostos encontrados nessa planta, usando o ensaio do micronúcleo em medula óssea de camundongos. Grupos experimentais constituídos de camundongos machos e fêmeas *Swiss albinus* (Unib: SW) foram avaliados após 24-48h (HI) e 24h (LAP) de tratamento com Ciclofosfamida (CICLO; 50 mg.Kg⁻¹), NaCl (150 mM), HI (0,5; 1; 2 g.Kg⁻¹), LAP (0,075; 0,15; 0,30 g.Kg⁻¹). As análises de MNPCEs do grupo tratado com HI mostraram diferenças ($p < 0,05$) entre todas as doses de tratamento (500–2.000 mg.Kg⁻¹) e controle negativo (NaCl). As proporções PCE/NCE apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as doses de HI (500–2.000 mg.Kg⁻¹) ou controle negativo (NaCl), frente ao controle positivo ciclofosfamida (50 mg.Kg⁻¹). Os resultados sugerem um efeito potencialmente genóxico dependente da dose (2.000 mg.Kg⁻¹) e levemente genotóxico nas demais doses (500–1.000 mg.Kg⁻¹) do extrato de HI, independentemente do tempo de tratamento (24 e 48 h) e do sexo (macho e fêmea), e ausência de toxicidade sistêmica do HI dose, sexo e tempo-independente. Contudo, as análises de MNPCEs do grupo tratado com LAP apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a dose de tratamento (300 mg.Kg⁻¹) e controle negativo (NaCl), já as proporções PCE/NCE apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as doses de LAP (75–300 mg.Kg⁻¹) ou controle negativo (NaCl), frente ao controle positivo ciclofosfamida (50 mg.Kg⁻¹), sugerindo presença de genotoxicidade do LAP, dependentemente da dose de administração fitoterapêutica (300 mg.Kg⁻¹), mas independente do tempo de tratamento (24 e 48 h), e sexo (macho e fêmea), e ausência de toxicidade sistêmica do LAP nas condições do ensaio MN, dose, sexo e tempo-independente.

Palavras-chave: *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos.; fitoterápico, lapachol, ensaio do micronúcleo, roedores, medula óssea.

ABSTRACT

CASTRO, Maysa Eduarda de. **Genotoxicity of *Handroanthus impetiginosus* and lapacho potentially applicable in animal production.** 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - UNIFENAS, Alfenas, 2017.

Handroanthus impetiginosus (Mart. ex DC.) Mattos (HI) it has been widely used for an extended period in traditional medicine, and several studies have shown the presence of chemical compounds and phytotherapeutic potentials of this plant. The objective was to evaluate the genotoxicity of the extract of *H. impetiginosus* and lapachol (LAP), one of the main compounds found in this plant, using the mouse bone marrow micronucleus assay. Experimental groups consisting of male and female Swiss albinus mice (Unib: SW) were evaluated after 24-48h (HI) e 24h (LAP) post treatment with Cyclophosphamide (CYCLO, 50 mg.kg⁻¹), NaCl (150 mM), HI (0.5; 1.2 g.kg⁻¹), LAP (0.075, 0.15, 0.30 g.kg⁻¹). For HI, analysis of the MNPCEs showed significant differences between treatment doses (500–2,000 mg.kg⁻¹) and NaCl. PCE/NCE showed significant differences between treatment doses (500–2,000 mg.kg⁻¹) or NaCl compared to CP (50 mg.kg⁻¹). This research suggests presence of genotoxicity in treatment doses 2,000 mg.kg⁻¹, and mild genotoxicity in the others treatment doses (500–1,000 mg.kg⁻¹) of HI, sex and time-independent and absence of toxicity doses-, time- and sex-independent. However, for lapacho, analysis of the MNPCEs showed significant differences between treatment dose (300 mg.kg⁻¹) and NaCl. PCE/NCE showed significant differences between treatment doses (500–2,000 mg.kg⁻¹) or NaCl compared to CP (50 mg.kg⁻¹). This research suggests presence of genotoxicity of LAP, dose-dependent (300 mg.kg⁻¹), but time- and sex-independent and absence of toxicity doses-, time- and sex-independent.

Keywords

Bone marrow, *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, lapacho, Micronucleus assay, Rodents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Protocolo experimental para avaliar a atividade mutagênico extrato hidroalcóolico da casca de *H. impetiginosus* 29
- Figura 2.** Protocolo experimental para avaliar a atividade mutagênico composto quinona Lapachol 29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidência de MNPCs (genotoxicidade) e razão PCE/NCE (citotoxicidade) na medula óssea de camundongos *Swiss albinus* machos e fêmeas, após tratamentos (24h e 48h) com compostos controles (NaCl e *cyclophosphamide*: CP, Cat. # C0768 Sigma Aldrich, Número CAS 50-18-0) e extrato fluido liofilizado da casca de *H. impetiginosus* (HI) 31

Tabela 2. Incidência de MNPCs (genotoxicidade) e razão PCE/NCE (citotoxicidade) na medula óssea de camundongos *Swiss albinus* machos e fêmeas, após tratamentos (24h) com compostos controles (NaCl e *cyclophosphamide*: CP, Cat. # C0768 Sigma Aldrich, Número CAS 50-18-0) e lapachol (Cat. # 142905 Aldrich, CAS Number 84-79-7) 33

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
ANOVA	Análise de variância one-way
CO ₂	Dióxido de carbono
DL50	Dose letal mediana
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i>
DSBs	<i>Double-strand breaks</i>
ENC	Eritrócito normocromático
EPC	Eritrócito policromático
EPCMN _s	Eritrócito policromáticos micronucleadas
EPC _s	Eritrócitos policromáticos
G	Grama
H	Horas
<i>H. impetiginosus</i> ou HI	<i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. ex DC.) Mattos
Kg	Quilograma
LAP	Lapachol
mg	Miligrama
mL	Militro
mM	Milimolar
MN	Micronúcleos
MNPCE _s	<i>Micronucleated polychromatic erythrocytes</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NCE	<i>Normochromatic erythrocyte</i>
PCE	<i>Polychromatic erythrocyte</i>
SSB _s	<i>Single-strand breaks</i>
Unib:SW	Camundongos heterogênicos <i>Swiss albinus</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Fitoterápico	26
4.2. Sistema-Teste <i>in vivo</i>	27
4.3. Grupos experimentais	27
4.4. Processamento da medula óssea	30
4.5. Análise estatística	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	37
7. REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

Handroanthus impetiginosus (Mart. ex DC.) Mattosé uma árvore nativa da América do Sul, encontrada no Brasil e norte da Argentina. Pertence à família *Bignoniaceae* e é popularmente conhecida como ipê-roxo. Vários compostos foram isolados e identificados a partir da HI e diversas pesquisas têm demonstrado a efetividade do potencial terapêutico dos compostos fitoquímicos caracterizadamente isolados e também de diferentes formas do extrato bruto dessa planta. Dentre as diferentes atividades farmacológicas que a HI apresenta, uma merece destaque em relação à produção animal: a atividade cicatrizante. O gado, principalmente, merece atenção em relação a feridas e cicatrização, para evitar prejuízos substanciais para os produtores. Porém, antes que a planta seja considerada um agente terapêutico, ela deve passar por importantes ensaios de genotoxicidade para estabelecer medidas seguras para seu uso e as condições e mecanismos que mediam o efeito biológico. Esta pesquisa científica relata informações com ênfase em mutagênese, com foco especial sobre os possíveis efeitos genotóxicos do extrato de *H. impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos e seu composto quinona Lapachol, usando o ensaio *in vivo* do micronúcleo em medula óssea de camundongos, cujo tema tem sido alvo de poucas pesquisas, desde o final da década de 90.

Outros estudos envolvendo a genotoxicidade de extratos e compostos fitoquímicos isoladamente caracterizados de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos deveriam ser conduzidos [e.g., teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos, teste de mutação gênica em células de mamíferos (*mouse lymphoma assay*), testes citogenéticos *in vitro* e aneuploidia, teste do micronúcleo em células do micronúcleo *in vitro*, hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e sua aplicação à mutagênese, teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas, genômica funcional e proteômica em mutagênese (cDNA arrays, microarrays analyses), entre outros, a fim de caracterizar os efeitos potencialmente genotóxicos e seus mecanismos moleculares envolvidos e, mais importante, estabelecer limites para o consumo, delinear os riscos potenciais à saúde, e implementar estratégias racionais e medidas quimio-preventivas.

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Estudos sobre plantas medicinais trazem importantes informações para novas descobertas e para o desenvolvimento de potenciais quimioterápicos, além de ajudar a estabelecer medidas seguras para o seu uso popular e/ou posologias adequadas (ELGORASHI et al., 2003; ARORA et al., 2005). *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos (HI) tem sido muito utilizada por um extenso período na medicina tradicional e vários estudos têm mostrado a presença de compostos químicos e potenciais fitoterapêuticos dessa planta, como antimicrobiano (HÖFLING et al., 2010; GÓMEZ CASTELLANOS et al., 2009; MACHADO et al., 2003; PARK et al., 2006), antiparasitário (XU et al., 2013), cicatrização (LIPINSKI et al., 2012; COELHO et al., 2010; KUNG et al., 2008), anti-inflamatória (LEE et al., 2012; SUO et al., 2012; BYEON et al., 2008), antineoplásica (KUNG et al., 2014; HIGA et al., 2011; BUDÁN et al., 2011; MOON et al., 2010; QUEIROZ et al., 2008; KIM et al., 2007; WOO et al., 2006; LEE et al., 2006, 2005; CHOI et al., 2003ab; LI et al., 2000; UEDA et al., 1994), entre outros.

Embora muitas pesquisas tenham demonstrado a efetividade do potencial terapêutico dos compostos fitoquímicos caracterizadamente isolados e também de diferentes formas do extrato bruto de *H. impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, poucos estudos foram executados tendo como foco, o entendimento dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de *H. impetiginosus*, desde o final da década de 90 (VANNI et al., 1998), seja utilizando o extrato bruto ou seus compostos químicos isolados. Objetivando contribuir e trazer novas informações sobre o potencial genotóxico de fitoterápicos e produtos naturais, a presente pesquisa avaliou os efeitos genotóxicos (clastogenicidade e/ou aneugenicidade) do extrato fluido de *H. impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, utilizando o ensaio *in vivo* do micronúcleo da medula óssea de camundongos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Handroanthus impetiginosus (Mart. ex DC.) Mattosé uma árvore nativa da América do Sul, encontrada em maior concentração, no Brasil e norte da Argentina. Pertence à família *Bignoniaceae*, também conhecida como “pau d'arco”, ipê roxo, lapacho, taheebo (ACCORSI, 1988; HASHIMOTO, 1962; KREHER, 1988; GÓMEZ CASTELLANOS et al., 2009). Entre as milhares de plantas medicinais brasileiras, os ipês ocupam lugar de destaque.

Tradicionalmente utilizada por nativos americanos do Brasil, norte da Argentina, Paraguai, Bolívia e Peru por milhares de anos, apresentando indicações de que seu uso antecede os incas (SACAU et al., 2003), geralmente ingerido como uma decocção preparada a partir da casca interna da árvore para tratar condições como infecções bacterianas e fúngicas, febre, sífilis, malária, tripanossomíase, assim como distúrbios da bexiga e estômago (GONÇALVES et al., 1980; GUIRAUD et al., 1994; SANTOS et al., 2004; CRAGG & NEWMAN, 2005; GÓMEZ CASTELLANOS, 2009).

Diversos estudos têm mostrado a presença de compostos químicos e potenciais fitoterapêuticos, apresentando efeitos: anti-dematogênico (DE MIRANDA et al., 2001; PEREIRA et al., 2013), antinociceptivo (LEE et al., 2012); antioxidante (SUO et al., 2013); antiangiogênico (KUNG et al., 2007), antibacteriano em MRSA (MACHADO et al., 2003); *Helicobacter pylori* (PARK et al., 2006; TWARDOWSCHY et al., 2008), contra a sífilis (GÓMEZ CASTELLANOS et al., 2009), antifúngico sobre *Candida* sp., (HÖFLING et al., 2010); anti-inflamatório em doenças de pele, incluindo psoríase, infecções fúngicas, eczema e câncer de pele (HASHIMOTO et al., 1996; CASINOVI et al., 1963; DE SANTANA et al., 1968; WOO et al., 2005; SUO et al., 2012, ZHANG et al., 2016), antiobesidade (IAWMOTO et al., 2016; CHOI et al., 2014); esclerose múltipla (XU et al., 2013); distúrbios de hiperpigmentação (KIM et al., 2015); antiparasita contra *Trypanosoma* sp., malária (XU et al., 2013); antiparasita contra gênero *Leishmania* (ARAÚJO et al., 2017); antiproliferativo e antineoplásico em linhagens celulares de carcinoma hepatocelular humano (KIM et al., 2007), linhagens de carcinoma epidermóide (JEON et al., 2015), várias linhagens de células de mielomahumano (LI et al., 2000), linhagens celulares de melanoma maligno (BANG et al., 2016), células da bexiga (LEE et al., 2006), inibição da ocorrência de metástase pulmonar de câncer colorretal (KEE et al., 2016), tumores humano de ovário e próstata (SILVA et al., 2003); prevenção e/ou redução de mucosite oral (GIACOMELLI et al., 2015); antiulcerogênico (PEREIRA et al., 2013); supressão de neuroinflamação na micróglia (LEE et al., 2015); antiviral, inibindo a atividade da transcriptase reversa da mieloblastose das aves de

ambos e os vírus da leucemia de murino (SCHUERCH et al., 1978; FRYDMAN et al., 1997) ea transcrição da repetição terminal longa HIV (LI et al., 1993; FRYDMAN et al., 1997); cicatrização (COELHO et al., 2010); citotóxico contra uma variedade de linhagem de células humana e de murino, incluindo carcinoma epidermóide laríngeo, próstata, cólon, ovário, mama, pulmão e diferentes células leucêmicas (PLANCHON et al., 2001; PINK et al., 2000a,b; QUEIROZ et al., 2008; KEE et al., 2016); contraceptivo (SILVA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2002; GOEL et al., 1987; CARMO LAGROTA et al., 1986); desordens mentais e emocionais como ansiedade, perda de memória, irritabilidade e depressão (FREITAS et al., 2010, 2013a, 2013b); diurético e adstringente (QUEIROZ et al., 2008; YAMASHITA et al., 2009); febre (GÓMEZ CASTELLANOS et al., 2009); imunossupressor (BÖHLER et al., 2008); inibidores de sistemas celulares de reparação (SILVA et al., 2003); e propriedades anticoagulante e laxativas (LEE et al., 2012).

Dentre as diversas atividades farmacológicas que a HI apresenta, uma merece destaque em relação à produção animal: atividade cicatrizante. No gado, frequentemente são encontradas em sua pele, feridas como resultado das práticas de gerência, lesões causadas devido a instalações inapropriadas ou lutas para estabelecimento da hierarquia do rebanho. A negligência de cuidados nessas lesões, pode levar ao desenvolvimento de miíase (*Cochliomyia hominivorax*), gerando prejuízos substanciais para os produtores. O efeito da HI na cicatrização de lesões cutâneas em bovinos foi estudado por Lipinski et al. (2012), tendo apresentado cicatrização e reparação eficientes, além de melhorar a fibroplasia, que devem estar relacionadas a atividades antibacterianas e anti-inflamatórias da planta (MOON et al., 2007). Um estudo morfológico do efeito do extrato de ipê-roxo na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar, mostrou que o extrato de HI favoreceu o processo de cicatrização das feridas cutâneas, quando comparado com o controle (COELHO et al., 2010). A aplicação de pomada com e sem beta-lapachona a uma ferida perfurada em ratos normais e diabéticos (*db / db*) mostrou que o processo de cicatrização foi mais rápido em animais tratados com beta-lapachona do que naqueles tratados apenas com veículo. Além disso, a beta-lapachona induziu macrófagos que secretam o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF), que são benéficos para o crescimento de muitas células. Também foi possível notar que a beta-lapachona pode aumentar a proliferação celular, incluindo queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, e a migração de fibroblastos e células endoteliais e, assim, acelerar a cicatrização de feridas. Portanto, sugeriu-se que a beta-lapachona pode ter potencial para uso terapêutico para cicatrização de feridas (KUNG et al., 2008).

Diversos compostos foram isolados e identificados a partir da *H. Impetiginosus*, entre eles, flavonóides (BLATT et al., 1996), dialdeídos-ciclopenteno (KOYAMA et al., 2000) como 2-formil-5-(4'-methoxybenzoyloxy)-3-metil-2-ciclopenteno-1-cetaldeído e 2-formil-5-(3',4'-Zoyloxy-dimethoxyben)-3-methyl-2-ciclopenteno-1-acetaldeído (KOYAMA et al., 2000), foram isolados ainda, ácido benzóico e derivados de benzaldeído (WAGNER et al., 1989) como 3,4-dimetoxibenzaldeído, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (Vainillin) e 4-metoxibenzaldeído, quinonas (SHARMA et al., 1988), como furanonaftoquinonas (ZANI et al., 1991; OLIVEIRA et al., 1993; DIAZ & MEDINA, 1996) como (naphto[2,3-b]furan-4,9-dionas) (STEINERT et al, 1995), e mais significativo ainda, naftoquinonas (THOMSON, 1971; MANNERS & JURD, 1976). Koyama et al. (2000) descreveram o isolamento de β -sitosterol, estigmasterol, 4'-metoxibenzil-4-metoxibenzoato de metilo, 9-hidroxi-3-methylnaphto[2,3-b] pirano-2,5,10-triona, (-)-3,4-di-hidro-6,8-dihidro- -droxy-3-methylisocumarin. Diversos compostos foram isolados por Warashina et al. (2004, 2005, 2006), incluindo treze glicosídeos fenólicos, oito glicosídeos iridóides, quatro glicosídeos feniletanóides, três glicosídeos lignana e dois glicosídeos isocumarin (GÓMEZ CASTELLANOS et al., 2009).

Suo et al., (2013), isolaram três novos compostos glicosídeos fenilpropanóides obtidos da *H. Impetiginosus* junto a outros 3 compostos da mesma classe já conhecidos. Os compostos isolados apresentaram diminuição dos níveis de radical livre DPPH e forte atividade antioxidante. Suo et al., (2012) isolaram um composto neolignana e quatro compostos benzoil apiosides do extrato aquoso da *H. impetiginosus*, os cinco compostos exibiram forte atividade anti-inflamatória, mas fraco ou nenhum efeito antialérgico e antioxidante. Os compostos benzoil apiosides apresentam uma estrutura química relativamente simples, um potencial candidato a agente anti-inflamatório. Suo e Yan (2016) isolaram 5 novos glicosídeos iridoideis, e oito novos compostos derivados de ciclopentenos foram isolados por Zhang et al., (2016b), ésteres de ciclopentenilo e dois ésteres de ciclopentilo.

Awale et al. (2005) descreveram dois novos iridoideis (1, 2) e um novo glicosídeo feniletanóide (3), em conjunto com doze compostos conhecidos (4-15). Todos os compostos isolados foram capazes de inibir a produção de NO em macrófagos ativados por LPS em células J774.1, os compostos 1, 3, 10, 11, e 12 apresentaram atividades inibidoras mais potente (IC50, 13.8-26.1 mg/mL) do que o controle positivo de NG-monometil-L-arginina (L-NMMA; IC50, 27.4 mg/ml).

Também foram isolados, cinco novos glicosídeos iridoides, A-E (1-5) a partir do extrato de água de *H. impetiginosus*. Os compostos isolados apresentaram a capacidade de suprimir a citocina inflamatória, a produção de fator de necrose tumoral- α e a produção de interleucina-1 β em células THP-1 de mieloma humano cultivadas, coestimuladas com lipopolissacárido (LPS). O estudo revelou, também, que os glicosídeos iridoides inibiram a atividade da enzima citocromo CYP3A4 (SUO & YAN, 2016).

Fazendo uso de técnicas cromatográficas, Zhang et al (2016a) conseguiram isolar e caracterizar 8 novos ésteres iridoides (1-8). Os efeitos anti-inflamatórios de 1-8 foram determinados numa linha de células RAW 264.7 estimulada por LPS. Os compostos 1, 2 e 3 exibiram atividades anti-inflamatórias por inibição da produção de NO e PGE2 de uma forma dependente da dose, mas sem alteração da viabilidade celular.

Outro estudo, relatou o isolamento de 6 novos ésteres de ciclopentenilo (1-4, 7, 8), 2 novos ésteres de ciclopentilo, avellaneina G, H (9, 10), em conjunto com 2 ésteres de ciclopentenilo já conhecidos, obtidos a partir do extrato aquoso da casca interna da *H. impetiginosus*. Utilizando técnicas espectroscópicas, foi possível elucidar as estruturas químicas dos novos compostos. Os efeitos anti-inflamatórios desses compostos foram determinados na linha celular RAW 264.7 estimulada por LPS. Alguns dos compostos testados (2, 3, 4, 6, 7) reduziram a produção de NO de uma forma dependente da dose, enquanto que 6 e 7 diminuíram a produção de PGE2 de uma maneira dependente da dose, sem modificar a viabilidade celular. Os dados apresentados nesta pesquisa indicaram que a ação etnofarmacológica de *H. impetiginosus* no tratamento de doenças inflamatórias se baseou nos constituintes que exercem um efeito anti-inflamatório bastante significativo sobre as respostas inflamatórias (ZHANG et al., 2016b).

Dentre os compostos mais expressivos registrados até agora, estão as quinonas lapachol e β -lapachona que, por serem associadas com a atividade farmacológica da planta, apresentam grande importância clínica (OSWALD, 1993; GÓMEZ CASTELLANOS et al., 2009).

Com base na sua estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos, a partir do tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico: benzoquinonas – um anel benzênico; naftoquinonas - um anel naftalênico; antraquinonas - um anel antracênico linear ou angular (SILVA et al., 2003).

O radical quinona possui a capacidade de aceitar elétrons formar ânions ou diânions intracelular, estimulando, assim, a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROE) e formação em frações mitocondriais e microssomais. Essa tendência está relacionada com a atividade biológica da estrutura quinona (lapachol e β -lapachona) (DUBIN et al., 1990;

FRY & PUDNEY, 1992; HENRY & WALLACE, 1995; GÓMEZ CASTELLANOS et al., 2009).

Como as quinonas apresentam citotoxicidade, gerou-se uma especulação de que existe uma propriedade química intrínseca na unidade quinonoídica, associada com outros fatores estruturais, que são responsáveis pela intensidade das atividades antitumorais (BRAND et al., 1990). A capacidade das quinonas se reduzirem pelas flavoenzimas celulares é uma possibilidade plausível (SALMON-CHEMIN et al., 2001). Muitas quinonas possuem um grupo de saída que pode ser ativado por redução das carbonilas quinonoídicas, produzindo intermediários alquilantes (LIN et al., 1984) (agentes antineoplásicos biorredutores) (SILVA et al., 2003).

O composto de quinona mais abundante na família Bignoniaceae é o Lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenilo)-1,4-naftoquinona, $C_{15}H_{14}O_3$, de 242.2738 peso molecular g/mol, é conhecido desde 1858, e foi o primeiro composto natural isolado de *H. Impetiginosus* (THOMSON, 1971; GÓMEZ CASTELLANOS et al., 2009).

Um isômero do lapachol, a β -lapachona(3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-*b*] pirano-5,6-diona, $C_{15}H_{14}O_3$, de 242.2738 peso molecular g/mol, foi, primeiramente, obtido por tratamento ácido do lapachol mas, mais tarde, também foi descrito como um produto natural de *H. impetiginosus* (THOMSON, 1971; OLIVEIRA et al., 1993; GÓMEZ CASTELLANOS et al., 2009).

Com base no nafto [2,3-*b*] furano-esqueleto 4,9-diona, tal como (-) - 5-hidroxi-2- (1'-hidroxietil) nafto [2,3-*b*] furano -4,9-diona (1) e o seu isômero de posição, (-) - 8-hidroxi-2- (1'-hidroxietil) nafto [2,3-*b*] furano-4,9-diona (2), que são metabólitos secundários encontrados na casca interna da *H. impetiginosus*, foram sintetizadas uma série de naftoquinonas. Tendo o composto 1 exibido efeito antiproliferativo potente contra várias linhas de células de tumores humanos, já o seu efeito contra algumas linhas de células humanas normais foi muito menor do que a da mitomicina. O seu enantiômero (R) -1 apresentou menor atividade contra as linhas de células de tumor. O composto 2 apresentou efeito antiproliferativo significativamente reduzido contra todas as linhas de células de tumor, indicando que a presença do grupo hidroxil fenólico no C-5 é de grande relevância para aumentar o efeito antiproliferativo. Os dois compostos apresentaram modesta atividade antifúngica e antibacteriana (bactérias gram-positivas), mas contra bactérias gram-negativas foram inativos (YAMASHITA et al., 2009).

A partir do produto natural β -lapachona, que foi isolado da árvore lapacho (*H. impetiginosus*), foi criada uma versão totalmente sintética chamada 3,4-Di-hidro-2,2-dimetil-

2H-nafto [1,2-*b*] pirano-5,6-diona (ARQ 501), que tem demonstrado promissora atividade anticâncer. ARQ 501 formulado com hidroxipropil- β -ciclodextrina teve êxito na fase I de ensaios clínicos e está, atualmente, em fase II de ensaios clínicos em humanos para o tratamento de câncer de cabeça e pescoço, câncer pancreático e leiomiossarcoma. Esse metabólito foi caracterizado como um novo conjugado glicosilsulfato, presente em amostras de plasma de animais e humanos doseados com ARQ 501 (SAVAGE et al., 2008).

Há um expressivo crescimento de pesquisas envolvendo plantas medicinais e seus extratos, em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo. A medicina popular é utilizada por uma considerável parcela da população mundial. O uso se faz, principalmente, para cuidados primários em relação à saúde, e se presume que a maior parte desses cuidados envolve o uso de extratos de plantas ou seus princípios biologicamente ativos (FARNSWORTH et al., 1985; KAUR et al., 2005). Aproximadamente 8% das 100.000 espécies vegetais catalogadas foram estudadas quanto as suas propriedades químicas, no Brasil. Em relação às suas propriedades terapêuticas, estima-se que apenas 1.100 espécies tenham sido avaliadas (GARCIA et al., 1996). Na área farmacêutica, o panorama brasileiro, revela que, aproximadamente, 82% dos insumos farmoquímicos utilizados na fabricação desses medicamentos são importados, ainda que a indústria farmacêutica nacional responda atualmente pela produção de 80% dos medicamentos consumidos no país (ABIQUIF, 2009). Além disso, a importação de fármacos corresponde a cerca de 30% das importações totais do complexo econômico de saúde do país (VARGAS et al., 2010), tais índices justificam a investigação de alternativas para superar a dependência externa por parte da indústria químico-farmacêutica brasileira.

Compostos biologicamente ativos têm sido reconhecidos em relação as suas propriedades farmacológicas, porém vários desses compostos não puderam ser introduzidos em terapêutica por apresentarem propriedades toxicológicas, carcinogênicas e mutagênicas (AMES, 1983; KONSTANTOPOULOU et al., 1992; TAVARES, 1996). Durante o processo de desenvolvimento de novos fármacos, os ensaios de genotoxicidade e suas análises, representam considerável peso, pois, a maioria das indústrias farmacêuticas delibera o processamento de um novo agente terapêutico também com o apoio dos dados de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (PURVES et al., 1995; MCCANN e AMES, 1976; THYBAUD et al., 2011; ICH, 2016). Portanto, tanto as plantas que são usadas pela população, bem como suas substâncias isoladas, devem passar por ensaios para avaliação da atividade. Tais ensaios são importantes e necessários para estabelecer medidas de controle no uso indiscriminado. Além disso, antes que as plantas sejam consideradas como agentes

terapêuticos, é indispensável esclarecer as condições e mecanismos que mediaram o efeito biológico (VARANDA, 2006).

Os efeitos genotóxicos de um potencial agente mutagênico, vão ocorrer de acordo com seu alvo celular. Antes de assumir sua capacidade mutagênica, alguns compostos químicos necessitam ser metabolizados (MATEUCA et al., 2006). Agentes mutagênicos podem causar alterações genômicas ao atingir direta e/ou indiretamente a molécula de DNA, ou ao se ligar às proteínas envolvidas na manutenção da integridade genômica (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003). As interações entre os agentes mutagênicos e os seus alvos geram consequências que podem acarretar em diferentes tipos de danos no DNA (rupturas dos filamentos, aductos de DNA, sítios alcalinos lábeis) e mutações que podem ser, tanto alterações nucleotídicas simples (mutações gênicas) até alterações cromossômicas estruturais (mutações cromossômicas) ou numéricas (mutações genômicas). O destino celular, finalmente, é determinado pelas várias lesões que foram provocadas sobre o genoma e a capacidade celular intrínseca de reparo ou processos de eliminação por apoptose (DECORDIER et al., 2002).

Assim, testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* são fundamentais para determinar eficazmente se um composto tem capacidade de interagir com o DNA, causar mutações, provocar danos nos cromossomos ou afetar a capacidade de reparação do DNA, conferindo, assim, todos os indicadores de carcinogenicidade (SAWANT et al., 2014).

Dentre os testes utilizados pela indústria farmacêutica, encontram-se: teste de mutação genética em bactérias, chamado teste de Ames. A estirpe mais comumente utilizada para esse ensaio é a *Salmonella typhimurium* (EMA, 2012; GATEHOUSE et al., 1994; NICOLETTE, 2013); testes citogenéticos para avaliação de dano cromossômico, dois ensaios são comumente utilizados: o teste de aberração cromossômica ou o teste de micronúcleo *in vitro*; ou ainda, teste *in vitro* de mutação genética em células de linfoma de ratinho e testes *in vivo* para genotoxicidade, é, usualmente, um teste de dano cromossômico em células hematopoiéticas de roedores (onde se detectam micronúcleos ou aberrações cromossômicas) (ICH, 2016).

Há ainda, outros testes, muito utilizados para avaliação da genotoxicidade, como o ensaio do cometa e a eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose. O ensaio do cometa, também conhecido como Eletroforese em Gel de Célula Única (SCGE) ou Eletroforese em Microgel (MGE), originalmente apresentado por Ostling e Johanson (1984) para detectar danos de DNA resultantes de radiação. Desde a criação dessa técnica, várias modificações metodológicas foram propostas (HARTMANN et al., 2003). No entanto, o método alcalino, desenvolvido por Singh et al. (1988), tornou-se o mais utilizado e recomendado, devido a seu

extenso espectro de detecção de danos no DNA (HARTMANN et al., 2003; COLLINS et al., 2008). O teste consiste na imobilização de uma suspensão celular, homogeneizada com agarose baixo ponto de fusão, em lâminas pré-tratadas com agarose ponto de fusão normal (ARALDI et al., 2013; AZQUETA & COLLINS et al., 2013). O material é coberto com uma lamínula para assegurar uma distribuição homogênea. Após a solidificação, a lamínula é removida e as lâminas são transferidas para a solução de lise (ARALDI et al., 2013, OECD, 2014). Essa solução de lise contém tensoativos celulares (Triton X-100), que removem as membranas (ANDERSON et al 1998; AZQUETA & COLLINS, et al., 2013). As lâminas são transferidas para a cuba de eletroforese, e são tratadas com uma solução numa concentração superior a 2,0 M e pH > 13.0 (ARALDI et al., 2015, OECD, 2014). Essa solução promove a liberação de histonas e o desdobramento de DNA. Sob campo eletroforético, segmentos de DNA livres, produtos de quebras (clastogêneses), migram em direção ao cátodo, dando origem a uma cauda de cometa (AZQUETA & COLLINS et al., 2013).

Durante a última década, esse ensaio tornou-se uma ferramenta básica para uso por pesquisadores interessados em áreas de investigação, desde biomonitoramento humano e ambiental, processos de reparo do DNA até fatores toxicológicos genéticos (HARTMANN et al., 2003). Como um teste de genotoxicidade, o ensaio do cometa pode ser usado para identificar possíveis mutagênicos e cancerígenos humanos. Contudo, uma correlação perfeita entre produtos químicos positivos nesse ensaio e a carcinogenicidade não é esperada. Essa correlação depende da classe química e do mecanismo de carcinogenicidade envolvidos no processo (ANDERSON et al., 1998).

É possível detectar genotoxicidade através da execução de testes *in vitro* a partir do uso de plasmídeos, tendo como base a capacidade que algumas substâncias químicas apresentam de quebrar as ligações fosfodiéster do DNA, gerando alterações na conformação plasmidial (MATTOS et al., 2005; CARVALHO et al., 2003). O plasmídeo é uma molécula circular dupla de DNA capaz de se reproduzir, independentemente do DNA cromossômico (MATTOS et al., 2005; VARELA-BARCA et al., 2007).

A eletroforese é uma técnica que visa à separação de moléculas envolvendo a migração de partículas em um meio gelatinoso durante a aplicação de uma diferença de potencial. Assim, a eletroforese em gel de agarose é um método muito utilizado para a separação e visualização de fragmentos de DNA. A forma e o tamanho das bandas após a corrida são adotados como parâmetros para detectar as possíveis lesões geradas na molécula de DNA. Quando em sua forma íntegra, o plasmídeo se mostra sob a forma supernovelada (forma I), migrando rapidamente, encaminhando-se para uma posição mais distante em

relação ao ponto de aplicação no gel. Quando ocorre quebra em uma das fitas do seu DNA, ele assume a forma circular-relaxada (forma II), gerando uma migração mais lenta, conduzindo-se a uma posição mais próxima em relação ao ponto de aplicação do DNA. Um aumento da forma II com diminuição da forma I, pode ser interpretado como consequência de quebra na cadeia fosfodiéster após ser exposto a um agente genotóxico. Em casos extremos, determinadas substâncias podem gerar duas quebras na ligação fosfodiéster, uma em cada fita de DNA, assim o plasmídeo assume uma forma linear (forma III) que é favorecida por sua conformação e tem a capacidade de migrar mais rápido que a forma II, localizando-se em uma posição intermediária entre as formas I e II no gel de agarose (MATTOS et al., 2005; VARELA-BARCA et al., 2007).

Desempenhando um papel crucial à bateria de testes que objetivam a identificação de riscos por agentes mutagênicos, temos o ensaio do micronúcleo *in vivo* (*micronucleus* – MN) em medula óssea de roedores (MATEUCA et al., 2006), especialmente em relação à avaliação de riscos mutagênicos que permite a reflexão de fatores metabólicos *in vivo*, da farmacocinética e dos processos de reparo do DNA, embora estes possam alterar entre as espécies, entre tecidos e entre os mecanismos genéticos (OECD, 1997a,b; RIBEIRO et al., 2003).

Micronúcleos (MNs) são corpos extranucleares pequenos que se originam durante a divisão celular a partir de fragmentos cromossômicos / cromossômicos acêntricos ou cromossomos / cromátides totais que sofrem um atraso durante a anáfase e não são incluídos nos núcleos filhos durante a telófase (FENECH & MORLEY, 1985). Quebras do DNA de fita dupla, conversão de quebras de fita simples (*single-strand breaks* – SSBs) em quebras de fitas duplas (*double-strand breaks* – DSBs) após a replicação celular, ou inibição de síntese de DNA podem resultar em micronúcleos abrigando fragmentos cromossômicos. O reparo equivocado de duas quebras cromossômicas pode induzir um rearranjo cromossômico assimétrico dando origem a um cromossomo dicêntrico e um fragmento acêntrico. A formação de uma ponte nucleoplásmica (*nucleoplasmic bridge* – NPB) entre os núcleos filhos e um fragmento acêntrico que fica atrasado para formar um MN pode ser resultado da separação de centrômeros de cromossomos dicêntricos que são puxados para polos opostos das células durante a anáfase (FENECH et al., 2005; THOMAS et al., 2003). Defeitos na maquinaria de segregação cromossômica podem gerar micronúcleos comportando cromossomos totais. Esses defeitos vão desde deficiências nos genes que controlam o ciclo celular, falha do fuso mitótico, cinetócoro, ou outras partes do aparato mitótico ou por danos até subestruturas cromossômicas, rompimento mecânico (ALBERTINI et al., 2000) e

hipometilação do DNA centromérico (FENECH et al., 2005). Amplificação gênica via ciclos de quebra-fusão-ponte (*breakage-fusion-bridge* – BFB) também pode formar micronúcleos. Isso ocorre quando o DNA amplificado está seletivamente localizado em locais específicos da periferia do núcleo e eliminado via brotamento nuclear (*nuclear budding* – NBUD) durante a fase S do ciclo celular (FENECH & CROTT, 2002). A compreensão sobre o destino do MN após a sua formação na célula micronucleada ainda é pequena. Seu destino pós-mitótico inclui: (i) eliminação da célula micronucleada decorrente da apoptose (DECORDIER et al., 2002), (ii) exclusão da célula (quando o DNA presente no MN não é esperado para ser funcional ou capaz de replicar devido à ausência dos componentes citoplasmáticos necessários); (iii) reincorporação dentro do núcleo principal (quando o cromossomo reincorporado pode ser indiscriminável daqueles do núcleo principal e será capaz de retomar a atividade biológica normal); (iv) contenção dentro do citoplasma da célula como uma entidade extra-nuclear (quando o MN será capaz de completar uma ou mais rodadas de replicação cromossômica/DNA) (LEACH & JACKSON-COOK, 2004).

Quando o eritroblasto da medula óssea após passar por processos de maturação, desenvolve-se em um eritrócito policromático (*polychromatic erythrocyte* – PCE) (i.e., célula originada após a extrusão do núcleo principal), qualquer micronúcleo que tenha sido formado pode manter-se atrás, de outro modo, no citoplasma anucleado. Dessa forma, o principal *endpoint*, tem sido a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (*micronucleated polychromatic erythrocytes* – MNPCEs) Em contrapartida, a determinação de MNPCEs em sangue periférico também tem sido aceitável em qualquer espécie na qual seja demonstrada a inabilidade do baço de remover eritrócitos micronucleados, ou que uma adequada sensibilidade para detectar agentes que causam aberrações cromossômicas numéricas ou estruturais sejam observadas. Resultados positivos (i.e., um aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em animais tratados) denotam que uma substância induz a formação de micronúcleos, os mesmos surgem como consequência de danos cromossômicos ou danos ao aparato mitótico nos eritroblastos das espécies teste. Resultados negativos indicam que a substância teste não induz a formação de micronúcleos nos eritrócitos imaturos das espécies teste, sob as condições experimentais. Além disso, o número de eritrócitos normocromáticos (*normochromatic erythrocyte* – NCE) no sangue periférico, que contém micronúcleos entre um dado número de eritrócitos maduros, pode também ser usado como *endpoint* desse ensaio (OECD, 1997c; RIBEIRO et al., 2003). A relação PCE/NCE é um indicador da aceleração ou inibição de eritropoiese. Essa relação tem sido reportada para variar com o tempo de pontuação, e a queda contínua na relação PCE/NCE

pode ocorrer devido à inibição da divisão celular, morte de eritroblastos, remoção de células danificadas e/ou diluição do conjunto de células existentes com células recentemente formadas (VENKATESH et al., 2007). Todavia, a compreensão dos efeitos genotóxicos causados por fitoterápicos e alimentos empregando o ensaio do MN *in vivo* em mamíferos tem sido o anseio de vários grupos de pesquisadores (CHANDRASEKARAN et al., 2011; SILVA et al., 2012; INDART et al., 2007; VENKATESH et al., 2007; ALVES et al., 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Fitoterápico

Extrato fluido da casca de *H. Impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos (HI) foi obtido comercialmente e armazenado de acordo com as recomendações do fabricante [Ref. # 000134, BioTae extratos vegetais, Tatuí, SP, Brasil]. Aliquotas (0,5 L) desse extrato foram submetidas ao processo de remoção de solvente por evaporação rotativa (40 rpm) (Rotary Evaporator RV 10 Control V, IKA® Works, Inc., USA) acoplado em sistema de aquecimento (40 °C) (Heating Baths HB10, IKA® Works, Inc., USA), vacuum pump (175 mbar) (Chemistry diaphragm pump MD 1C, VACUUBRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Germany), recirculador e destilador de água (10 °C) (Banho Ultratermostatizado Microprocessado Digital, SPLABOR, cód. # SP-152/10, Presidente Prudente, SP, Brasil) e garrafa de evaporação (RV 10.85 Evaporation Flask, NS 29/32-2L, IKA® Works, Inc., USA). O produto final foi transferido para um frasco de reação de 0,5 L (SCHOTT® DURAN®) emantido a -20 °C por 24 horas, a fim de avaliar o congelamento do produto final e a eficácia do processo de evaporação do solvente (ANVISA, 2010; BORIOLLO et al., 2014ab). Em seguida, alíquotas (20 mL) de produto final foram transferidas para frascos de vidro tipo penicilina (50 mL) e liofilizadas (0.12 mbar at -50 °C) (Lyophilizer model Alpha 1-2 LDPlus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH®, Germany) e sua massa seca foram medidas (Electronic Analytical Balance AUW-220D, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). O produto final liofilizado foi preparado em solvente aquoso (água tipo 1, Sistema Milli-Q Direct 8, Millipore Indústria e Comércio Ltda., Barueri, SP, Brasil) em concentração de 1×, esterelizado por filtração (Millipore Corporation, hydrophilic Durapore® PVDF, 0.22 µm, Ø 47 mm, cat. # GVWP 047 00), no momento de uso.

O LAP (Número CAS: 84-79-7) também foi obtido comercialmente e armazenado de acordo com as instruções do fabricante (Lapachol Sigma Aldrich, Cat. # 142905, St. Louis, MO, Estados Unidos da América). Concentrações 1× de tratamento com LAP foram preparadas em solvente aquoso estéril (água tipo 1, Sistema Milli-Q Direct 8, Millipore Indústria e Comércio Ltda., Barueri, SP, Brasil) no momento de uso.

4.2. Sistema – teste *in vivo*

Camundongos *Swiss albinus* (Unib: SW) adultos jovens (entre 7 e 12 semanas – período púbere), machos e fêmeas, com massa corporal entre 30 g e 40 g (ou seja, o peso variação entre os animais, para cada sexo, não deve exceder a $\pm 20\%$ da massa média) provenientes do Biotério Central da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Alfenas, Minas Gerais, Brasil (<http://www.unifenas.br/pesquisa/bioterio/>), foram utilizados para o teste do micronúcleo (BORIOLLO et al., 2014ab.; CSGMT, 1986; KRISHNA e HAYASHI, 2000; OECD, 1997c; CSGMT, 1986). Os animais foram mantidos em grupos do mesmo sexo, em caixas de polipropileno, num ambiente climatizado a 22 °C ± 3 °C, com uma umidade do ar relativa de 50% $\pm 20\%$, e com os ciclos dia-noite de 12 horas (isto é, 12 horas de luz e 12 horas de escuro). Estes foram alimentados com rações comerciais (Purina® Labina Nestlé Purina Pet Care da empresa) e água *ad libitum*, e aclimatadas às condições laboratoriais para 7 dias (um período de teste) antes da execução do experimento. No final do período de teste, cada animal foi pesado e, de acordo com o peso, recebeu 2 mL.100g⁻¹ de peso corporal do líquido indicado (controle negativo, o controle positivo, fitoterápico e composto isolado). Após o tratamento experimental, os animais foram eutanasiados por asfixia com CO₂ em câmaras adaptadas acrílicas (BORIOLLO et al., 2014ab.; KRISHNA & HAYASHI, 2000; AVMA, 2001). O material contaminado foi acondicionado em sacos de plásticos duplos e armazenado em locais específicos até o momento de sua incineração, conforme as normas de segurança e saúde da instituição.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais da UNIFENAS (CEPEAU Protocolo N°. 27A / 2016).

4.3. Grupos experimentais

Grupos de animais (consistindoem 5 machos e 5 fêmeas para o tratamento com HI (FIG. 1); e 3 machos e 3 fêmeas para o tratamento com lapachol) foram tratados com uma dose única administrada por gavagem (controle negativo, HI e lapachol) ou intraperitoneal (ciclofosfamida) edois tempos de eutanásia (24 e 48 h) para o HI e um tempo de eutanásia (24 h) para o lapachol (FIG. 2), baseada na regulamentação sobre o ensaio de micronúcleo *in vivo* (BORIOLLO et al., 2014ab.; CSGMT, 1986; KRISHNA & HAYASHI, 2000; OECD, 1997):

- Grupos controle: 150 mM NaCl (controle negativo), 50 mg.kg⁻¹ de Ciclofosfamida (controle positivo: Cat. # C0768 Sigma Aldrich, CAS no. 50-18-0) (BORIOLLO et al., 2014ab; VENKATESH et al., 2007);
- Teste de genotoxicidade (fitoterapêutico e lapachol): 500, 1.000 e 2.000 mg.Kg⁻¹ de HI; 75; 150 e 300 mg.Kg⁻¹ de lapachol (Cat. # 142905 Aldrich, CAS Number 84-79-7). A dose máxima tolerada (MTD) de HI foi definida como (i) adose mais elevada que pode ser administrada sem induzir letalidade ou toxicidade excessiva durante o estudo causando eutanásia, ou (ii) uma dose que produz algumas indicações de toxicidade da medula óssea (por exemplo, uma redução na proporção de eritrócitos imaturos entre eritrócitos totais na medula óssea), ou (iii) 2.000 mg.Kg⁻¹ (KRISHNA & HAYASHI, 2000; OECD, 1997). As concentrações para o tratamento com lapachol foram escolhidas com base nos valores de DL50 (i.e., DL50 × ½), estabelecidos a partir da administração via oral em camundongos machos (487 mg.Kg⁻¹) e fêmeas (792 mg.Kg⁻¹) (MORRISON et al., 1970).

Figura 1 – Protocolo experimental para avaliar a atividade mutagênico extrato hidroalcolólico da casca de *H. impetiginosus*. T – tratamento, E – eutanásia.

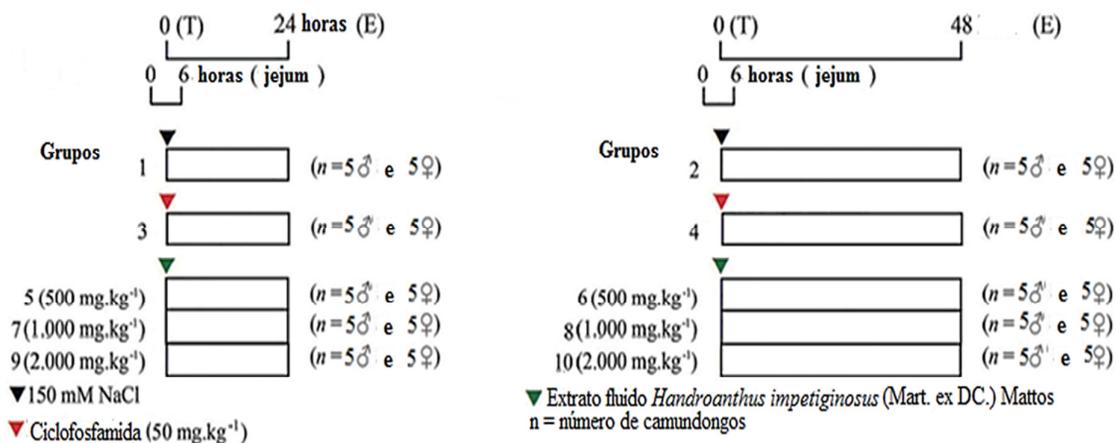
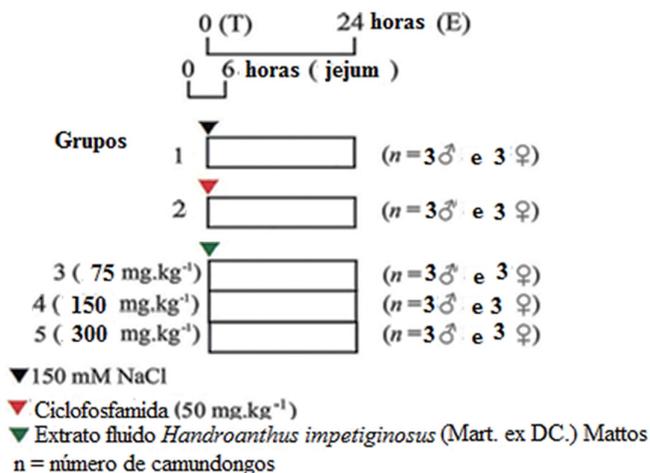


Figura 2 – Protocolo experimental para avaliar a atividade mutagênico composto quinona Lapachol. T – tratamento, E – eutanásia.



4.4. Processamento de medula óssea e análise de células

Pouco tempo após a eutanásia, os fêmures foram removidos cirurgicamente e assepticamente, e os animais adequadamente descartados. Cada fêmur foi seccionado na extremidade proximal e o conteúdo do canal espinhal foi lavado com 1,5 mL de solução de NaCl 150mM e transferidos para um tubo de centrífuga de 15 mL (BORIOLLO et al., 2014ab; KRISHNA & HAYASHI, 2000; OECD, 1997; ZAMBRANO et al., 1982). O material, então, foi ressuspensão com uma pipeta de Pasteur, para garantir uma distribuição aleatória das células da medula óssea. Essa suspensão foi então centrifugada a 1,000 rpm (*Centrifuga de Bancada Microprocessada*, Mod. NT 810, Nova Técnica Ind. e Com. de Equip. para Laboratório Ltda., Piracicaba, SP, Brazil) por 5 minutos. O sobrenadante foi dispensado e o sedimento resultante foi ressuspensão em 500µl de solução de NaCl 150mM e adicionou-se formaldeído a 4%. As lâminas foram preparadas (2 lâminas por animal), e após secar à temperatura ambiente, durante 24h, foram coradas com corante Leishman eosina azul de metileno [corante puro durante 3 minutos, seguido por um corante diluído em água tipo 1 (1:6) por 15 min] para diferenciar eritrócitos policromáticos (PCEs) de eritrócitos normocromáticos (NCEs).

Para observação e contagem das células foi utilizada microscopia óptica (Nikon Eclipse E-200), com ampliação de 1000× (pelo menos 2000 eritrócitos policromáticos anucleados por animal foram marcados para a incidência de eritrócitos policromáticos micronucleados). O número de PCEs e NCEs, o número e frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCEs) foram reportados. Como forma de avaliar a toxicidade da medula óssea, também foi observada e reportada a proporção de PCE para NCE (BORIOLLO et al., 2014ab; KRISHNA & HAYASHI, 2000; OECD, 1997).

4.5. Análise estatística

Os dados obtidos no teste do micronúcleo foram submetidos à análise estatística de variância *one-way* (ANOVA), em delineamento inteiramente casualizado e esquema fatorial [HI: 6×2×2 (tratamento × sexo × tempo); Lapachol: 6×2×1], e ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$) empregando o software R[®] (versão 3.0.2).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos sobre plantas medicinais trazem importantes informações para novas descobertas e para o desenvolvimento de potenciais quimioterápicos, além de ajudar a estabelecer medidas seguras para o seu uso popular e/ou posologias adequadas (ELGORASHI et al., 2003; ARORA et al., 2005). Como descrito anteriormente, diversas pesquisas descrevem o potencial fitoterapêutico da *H. impetiginosus* e seus compostos. Poucos estudos têm como objetivo compreender os efeitos genotóxicos e mutagênicos dessa planta, seja a partir de extratos brutos ou compostos isolados (VANNI et al., 1998). Esse fato nos levou a avaliar as propriedades nocivas genotóxicas (i.e, clastogênese e/ou aneugenicidade) do extrato fluido liofilizado de *H. impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos e do seu composto lapachol, utilizando o ensaio do micronúcleo *in vivo*. Os números e as frequências de MNPCEs e a proporção PCE/NCE na medula óssea de camundongos foram analisados estatisticamente, para cada um dos grupos de animais tratados apenas com extrato de *H. impetiginosus* e lapachol – ensaio genotóxico –, e para cada um dos grupos controle.

Para os grupos de animais tratados com HI, a análise dos MNPCEs apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todas as doses de tratamento (500–2.000 mg.Kg⁻¹) e controle negativo (NaCl). Esses resultados sugerem presença de potencial genotoxicidade dependente da dose (2.000 mg.Kg⁻¹), e leve genotoxicidade, também dependente da dose (500–1.000 mg.Kg⁻¹), mas independentemente do tempo de tratamento (24 e 48 h) e do sexo (macho e fêmea) (Tabela 1).

A análise obtida a partir da razão PCE/PCE+NCE apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as doses de HI (500–2.000 mg.kg⁻¹) ou controle negativo (NaCl), frente ao controle positivo ciclofosfamida (50 mg.kg⁻¹). Portanto, esses resultados sugerem ausência de toxicidade sistêmica do HI nas condições do ensaio MN, dose, sexo e tempo-independente (Tabela 1).

Para os grupos de animais tratados com LAP, a análise dos MNPCEs não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as doses de tratamento (75–150 mg.kg⁻¹) e controle negativo (NaCl). Esses resultados sugerem a ausência de genotoxicidade do LAP nas dosagens de (75–150 mg.kg⁻¹), dependentemente da dose de administração fitoterapêutica (75–150 mg.kg⁻¹), independentemente do tempo de tratamento (24 e 48 h) e sexo (macho e fêmea) (Tabela 2).

A análise obtida a partir da razão PCE/PCE+NCE apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre controle positivo (ciclofosfamida) frente a todas as doses de LAP (75–300 mg.Kg⁻¹) e controle negativo (NaCl). Portanto, esses resultados sugerem ausência de toxicidade sistêmica do lapachol nas condições do ensaio MN, dose, sexo e tempo-independente ([Tabela 2](#)).

Tabela 1. Incidência de MNPCEs (genotoxicidade) e razão PCE/NCE (citotoxicidade) na medula óssea de camundongos *Swiss albinus* machos e fêmeas, após tratamentos (24h e 48h) com compostos controles (NaCl e *cyclophosphamide*: CP, Cat. # C0768 Sigma Aldrich, Número CAS 50-18-0) e extrato fluido liofilizado da casca de *H. impetiginosus* (HI).

Tratamento	Número de PCEs analisados		MNPCEs (n)		MNPCEs (%)		PCE / (PCE + NCE)		NCE (n)	
	24h	48h	24h ^A	48h ^A	24h ^A	48h ^A	24h ^A	48h ^A	24h	48h
♀ ^A (MNPCE): A (PCE/NCE ratio)	2074 ±26	2085 ±13	10 ±3	9 ±2	0,47 ±0,14	0,45 ±0,09	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00	10 ±6	9 ±6
♀ ₁	2095	2097	7	10	0,33	0,48	1,00	1,00	5	3
♀ ₂	2094	2095	9	10	0,43	0,48	1,00	1,00	6	5
♀ ₃	2087	2089	11	8	0,53	0,38	0,99	0,99	13	11
♀ ₄	2056	2078	14	12	0,68	0,58	0,99	1,00	20	7
♀ ₅	2038	2067	8	7	0,39	0,34	1,00	0,99	8	19
♂ ^A (MNPCE): A (PCE/NCE ratio)	2053 ±29	2072 ±20	11 ±3	11 ±2	0,53 ±0,17	0,54 ±0,08	0,99 ±0,00	1,00 ±0,00	11 ±4	10 ±4
♂ ₁	2095	2088	9	13	0,43	0,62	1,00	1,00	5	9
♂ ₂	2055	2088	12	11	0,58	0,53	0,99	1,00	15	7
♂ ₃	2058	2084	7	13	0,34	0,62	0,99	0,99	14	12
♂ ₄	2018	2048	16	9	0,79	0,44	0,99	1,00	12	6
♂ ₅	2037	2051	10	10	0,49	0,49	1,00	0,99	8	15
Média ±DP (150 mM NaCl)	2063 ±28	2079 ±17	10 ±3 ^A	10 ±2 ^A	0,50 ±0,15 ^A	0,50 ±0,10 ^A	0,99 ±0,00 ^A	1,00 ±0,00 ^A	11 ±5	9 ±5
♀ ^A (MNPCE): A (PCE/NCE ratio)	2058 ±19	2136 ±70	58 ±19	98 ±10	2,82 ±0,89	4,60 ±0,57	0,96 ±0,04	0,98 ±0,02	95 ±93	53 ±48
♀ ₁	2082	2096	82	104	3,94	4,96	0,98	0,98	34	53
♀ ₂	2038	2107	38	103	1,86	4,89	0,94	0,95	137	111
♀ ₃	2067	2101	67	100	3,24	4,76	0,90	1,00	241	4
♀ ₄	2040	2115	40	102	1,96	4,82	0,98	0,96	37	91
♀ ₅	2062	2260	64	81	3,10	3,58	0,99	1,00	28	8
♂ ^A (MNPCE): B (PCE/NCE ratio)	2082 ±23	2127 ±165	79 ±28	82 ±9	3,78 ±1,30	3,83 ±0,22	0,97 ±0,01	0,97 ±0,02	56 ±31	61 ±52
♂ ₁	2113	2420	113	95	5,35	3,93	0,95	0,98	103	49
♂ ₂	2070	2086	70	87	3,38	4,17	0,98	1,00	51	7
♂ ₃	2078	2031	78	74	3,75	3,64	0,97	0,96	69	80
♂ ₄	2054	2061	39	77	1,90	3,74	0,99	0,99	26	29
♂ ₅	2095	2037	95	75	4,53	3,68	0,99	0,94	31	140
Média ±DP (CP 50 mg/kg)	2070 ±23	2131 ±120	69 ±25 ^C	90 ±12 ^C	3,30 ±1,16 ^C	4,22 ±0,58 ^C	0,97 ±0,03 ^B	0,97 ±0,02 ^B	76 ±69	57 ±47
♀ ^A (MNPCE): A (PCE/NCE ratio)	2041 ±3	2193 ±136	41 ±3	33 ±9	2,01 ±0,12	1,51 ±0,35	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00	3 ±2	2 ±1
♀ ₁	2042	2261	42	35	2,06	1,55	1,00	1,00	1	3
♀ ₂	2039	2062	39	32	1,91	1,55	1,00	1,00	2	4
♀ ₃	2045	2123	45	30	2,20	1,41	1,00	1,00	5	1
♀ ₄	2037	2122	39	22	1,91	1,04	1,00	1,00	4	1
♀ ₅	2040	2398	40	48	1,96	2,00	1,00	1,00	3	2

Médias com a mesma letra (A, B e C) não são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Tratamentos controles (NaCl e *cyclophosphamide*: CP) e uma avaliação da genotoxicidade de HI (0,5-2 g/Kg). ♀ e ♂ correspondem ao gênero de camundongos *Swiss albinus* fêmea e macho, respectivamente. MNPCes: *micronucleated polychromatic erythrocytes*. PCE / (PCE + NCE): razão entre *polychromatic erythrocytes* (PCE) *enormochromatic erythrocytes* (NCE).

Tabela 1. Continuação.

Tratamento	Número de PCEs analisado		MNPCEs (n)		MNPCEs (%)		PCE / (PCE + NCE)		NCE (n)	
	24h	48h	24h ^A	48h ^A	24h ^A	48h ^A	24h ^A	48h ^B	24h	48h
♂ ^A (MNPCE); ^B (PCE/NCE ratio)	2044 ±10	2064 ±33	44 ±10	37 ±16	2,13 ±0,46	1,77 ±0,76	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00	4 ±3	4 ±4
♂ ₁	2036	2016	36	16	1,77	0,79	1,00	1,00	5	1
♂ ₂	2037	2095	37	36	1,82	1,72	1,00	1,00	5	2
♂ ₃	2039	2092	39	56	1,91	2,68	1,00	1,00	1	3
♂ ₄	2059	2049	59	27	2,87	1,32	1,00	1,00	2	10
♂ ₅	2047	2070	47	48	2,30	2,32	1,00	1,00	8	5
Média ±DP(HI 500 mg/kg)	2042 ±7	2129 ±115	42 ±7 ^B	35 ±13 ^B	2,07 ±0,32 ^B	1,64 ±0,57 ^B	1,00 ±0,00 ^A	1,00±0,00 ^A	4 ±2	3 ±3
♀ ^A (MNPCE); ^A (PCE/NCE ratio)	2040 ±5	2124 ±201	40 ±5	35 ±8	1,96 ±0,24	1,68 ±0,42	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00	3 ±3	1 ±1
♀ ₁	2032	2042	32	36	1,57	1,76	1,00	1,00	1	1
♀ ₂	2041	2014	41	48	2,01	2,38	1,00	1,00	1	1
♀ ₃	2043	2483	45	34	2,20	1,37	1,00	1,00	4	1
♀ ₄	2039	2025	39	29	1,91	1,43	1,00	1,00	7	1
♀ ₅	2043	2057	43	30	2,10	1,46	1,00	1,00	1	3
♂ ^A (MNPCE); ^B (PCE/NCE ratio)	2046 ±7	2066 ±44	46 ±7	56 ±23	2,27 ±0,35	2,69 ±1,06	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00	2 ±1	1 ±0
♂ ₁	2037	2021	37	28	1,82	1,39	1,00	1,00	1	1
♂ ₂	2053	2053	53	43	2,58	2,09	1,00	1,00	1	1
♂ ₃	2054	2057	54	50	2,63	2,43	1,00	1,00	4	2
♂ ₄	2041	2140	41	77	2,01	3,60	1,00	1,00	1	1
♂ ₅	2047	2060	47	81	2,30	3,93	1,00	1,00	2	1
Média ±DP(HI 1.000 mg/kg)	2043 ±7	2095 ±141	43 ±7 ^B	46 ±19 ^B	2,11 ±0,33 ^B	2,18 ±0,93 ^B	1,00 ±0,00 ^A	1,00±0,00 ^A	2 ±2	1 ±1
♀ ^A (MNPCE); ^A (PCE/NCE ratio)	2046 ±12	2047 ±34	46 ±12	100 ±32	2,25 ±0,58	4,90 ±1,59	1,00 ±0,00	0,98 ±0,04	3 ±4	52 ±93
♀ ₁	2039	2008	39	105	1,91	5,23	1,00	0,90	1	218
♀ ₂	2056	2052	56	61	2,72	2,97	1,00	0,99	1	28
♀ ₃	2062	2080	62	110	3,01	5,29	1,00	1,00	3	1
♀ ₄	2037	2016	37	144	1,82	7,14	0,99	1,00	11	1
♀ ₅	2036	2080	36	80	1,77	3,85	1,00	0,99	1	14
♂ ^A (MNPCE); ^B (PCE/NCE ratio)	2073 ±55	2075 ±24	62 ±33	70 ±17	2,95 ±1,51	3,36 ±0,80	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00	5 ±6	4 ±3
♂ ₁	2067	2108	67	83	3,24	3,94	1,00	1,00	5	3
♂ ₂	2031	2082	31	80	1,53	3,84	0,99	1,00	14	5
♂ ₃	2029	2083	29	84	1,43	4,03	1,00	1,00	2	9
♂ ₄	2073	2054	73	54	3,52	2,63	1,00	1,00	1	1
♂ ₅	2164	2048	109	48	5,04	2,34	1,00	1,00	1	4
Média ±DP(HI 2.000 mg/kg)	2059 ±40	2061 ±32	54 ±25 ^{BC}	85 ±29 ^{BC}	2,60 ±1,14 ^{BC}	4,13 ±1,44 ^{BC}	1,00 ±0,00 ^A	0,99±0,03 ^A	4 ±5	28 ±67

Médias com a mesma letra (A, B e C) não são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Tratamentos controles (NaCl e *cyclophosphamide*: CP) e uma avaliação da genotoxicidade de HI (0,5-2 g/Kg). ♀ e ♂ correspondem ao gênero de camundongos *Swiss albinus* fêmea e macho, respectivamente. MNPCEs: *micronucleated polychromatic erythrocytes*. PCE / (PCE + NCE): razão entre *polychromatic erythrocytes* (PCE) e *normochromatic erythrocytes* (NCE).

Tabela 2. Incidência de MNPCEs (genotoxicidade) e razão PCE/NCE (citotoxicidade) na medula óssea de camundongos *Swiss albinus* machos e fêmeas, após tratamentos (24h) com compostos controles (NaCl e *cyclophosphamide*: CP, Cat. # C0768 Sigma Aldrich, Número CAS 50-18-0) e lapachol (Cat. # 142905 Aldrich, CAS Number 84-79-7).

Tratamento	Número de PCEs analisados	MNPCEs (n)	MNPCEs (%)	PCE / (PCE + NCE)	NCE (n)
♀ ^A (MNPCE); ^A (PCE/NCE ratio)	2024 ±9	10 ±3	0.51 ±0.12	1.00 ±0.00	10 ±4
♀ ₁	2030	8	0.39	1.00	8
♀ ₂	2013	10	0.50	1.00	7
♀ ₃	2028	13	0.64	0.99	15
♂ ^A (MNPCE); ^A (PCE/NCE ratio)	2029 ±6	11 ±4	0.56 ±0.17	0.99 ±0.00	12 ±4
♂ ₁	2022	11	0.54	1.00	8
♂ ₂	2032	15	0.74	0.99	12
♂ ₃	2032	8	0.39	0.99	15
Média ±DP (150 mM NaCl)	2026 ±7	11 ±3 ^A	0.53 ±0.14 ^A	0.99 ±0.00 ^A	11 ±4
♀ ^B (MNPCE); ^A (PCE/NCE ratio)	2073 ±8	73 ±8	3.51 ±0.35	0.96 ±0.01	87 ±29
♀ ₁	2064	64	3.10	0.95	105
♀ ₂	2076	76	3.66	0.97	54
♀ ₃	2078	78	3.75	0.95	103
♂ ^A (MNPCE); ^A (PCE/NCE ratio)	2047 ±3	47 ±3	2.30 ±0.14	0.96 ±0.00	94 ±7
♂ ₁	2050	50	2.44	0.95	102
♂ ₂	2047	47	2.30	0.96	89
♂ ₃	2044	44	2.15	0.96	91
Média ±DP (CP 50 mg/kg)	2060 ±15	60 ±15 ^B	2.90 ±0.70 ^B	0.96 ±0.01 ^B	91 ±19
♀ ^A (MNPCE); ^A (PCE/NCE ratio)	2014 ±4	14 ±4	0.71 ±0.20	1.00 ±0.00	10 ±8
♀ ₁	2010	10	0.50	1.00	2
♀ ₂	2018	18	0.89	0.99	11
♀ ₃	2015	15	0.74	0.99	17
♂ ^A (MNPCE); ^A (PCE/NCE ratio)	2016 ±5	16 ±5	0.78 ±0.22	0.99 ±0.00	13 ±7
♂ ₁	2011	11	0.55	0.99	15
♂ ₂	2020	20	0.99	0.99	19
♂ ₃	2016	16	0.79	1.00	6
Média ±DP (Lapachol 75 mg/kg)	2015 ±4	15 ±4 ^A	0.74 ±0.19 ^A	0.99 ±0.00 ^A	12 ±7
♀ ^A (MNPCE); ^A (PCE/NCE ratio)	2023 ±2	23 ±2	1.12 ±0.07	0.99 ±0.01	20 ±14
♀ ₁	2023	23	1.14	0.99	21
♀ ₂	2024	24	1.19	0.98	33
♀ ₃	2021	21	1.04	1.00	5
♂ ^A (MNPCE); ^A (PCE/NCE ratio)	2022 ±2	22 ±2	1.70 ±0.10	0.99 ±0.01	24 ±18
♂ ₁	2021	21	1.04	0.99	23
♂ ₂	2020	20	0.99	0.98	42
♂ ₃	2024	24	1.19	1.00	7
Média ±DP (Lapachol 150 mg/kg)	2022 ±2	22 ±2 ^A	1.10 ±0.08 ^A	0.99 ±0.01 ^A	22 ±14
♀ ^A (MNPCE); ^A (PCE/NCE ratio)	2054 ±23	54 ±23	2.60 ±1.10	0.99 ±0.01	29 ±21
♀ ₁	2060	60	2.91	0.99	11
♀ ₂	2028	28	1.38	0.99	23
♀ ₃	2073	73	3.52	0.98	52
♂ ^A (MNPCE); ^A (PCE/NCE ratio)	2048 ±22	48 ±22	2.34 ±1.03	0.99 ±0.00	29 ±9
♂ ₁	2072	72	3.47	0.98	39
♂ ₂	2030	30	1.48	0.99	26
♂ ₃	2042	42	2.06	0.99	23
Média ±DP (Lapachol 300 mg/kg)	2051 ±20	51 ±20 ^B	2.47 ±0.96 ^B	0.99 ±0.01 ^A	29 ±14

Médias com a mesma letra (A e B) não são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Tratamentos controles (NaCl e *cyclophosphamide*: CP) e uma avaliação da genotoxicidade do lapachol (0.075-0.3 g/Kg). ♀ e ♂ correspondem ao gênero de camundongos *Swiss albinus* fêmea e macho, respectivamente. MNPCEs: *micronucleated polychromatic erythrocytes*. PCE / (PCE + NCE): razão entre *polychromatic erythrocytes* (PCE) e *normochromatic erythrocytes* (NCE).

O principal atributo de toxicidade do LAP é a sua capacidade de induzir estresse oxidativo (SILVA et al., 2003). O lapachol na presença da enzima citocromo P450 redutase e NADPH, geram danos ao DNA, enquanto radical ânion superóxido e radical hidroxil são formados. Assim, citocromo P450 redutase apresenta a capacidade de reduzir o LAP e, desse modo, produzir espécies reativas de oxigênio. Sozinho, O LAP não tem efeito no DNA (KUMAGAI et al., 1997). Resultados semelhantes, foram obtidos em outro estudo, Costa et al. (2010), investigou a genotoxicidade do LAP (20, 40 e 60 µg/ml) através do teste de *Drosophila melanogaster wing spot* nos descendentes de cruzamento padrão (*ST- Standard*) e de alta bioativação (HB - *High bioactivation*). Os resultados mostraram que o LAP exibiu atividade genotóxica nos descendentes do cruzamento de alta bioativação metabólica (HB - *High bioactivation*), ou seja, um aumento na frequência de manchas é exclusivo de indivíduos com um alto nível de citocromo P450.

Krishnan e Bastow (2000) sugeriram que o LAP apresenta a capacidade de interferir na função normal da enzima topoisomerase II (topo II). Os efeitos inibitórios da DNA topoisomerase por derivados da amina do LAP, também foram demonstrados por Esteves-Souza et al. (2007), a ação do inibidor sobre a topo II foi avaliada através do ensaio de relaxamento de DNA plasmidial. Cunha et al. (2006) evidenciou que 2µl de derivados do lapachol impediram, significativamente, a atividade catalítica da topo II. Essa interferência pode produzir uma mudança topológica do DNA que favorece a ocorrência de eventos recombinacionais (BAGULEY & FERGUSON, 1998).

A citotoxicidade do lapachol, e β-lapachona foram avaliadas contra a linhagem celular de câncer esofágico (WHCO1). A β-lapachona foi considerada a mais potente (IC₅₀ = 1,6 µM), 10 vezes mais ativa do que a cisplatina (IC₅₀ = 16,5 µM), fármaco de escolha atual para tratamento do câncer. Porém, o lapachol mostrou ser quinze vezes menos citotóxico (IC₅₀ = 24,1 µM) do que a β-Lapachona contra a linhagem celular WHCO1 (SUNASSEE et al., 2013).

Os mecanismos de ação genotóxica de β-lapachona (fonte comercial) foram caracterizados, a partir do uso de cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO) (VANNI et al., 1998). Nesse estudo, a β-lapachona apresentou citotoxicidade (em células em fase S) e genotoxicidade (a partir de indução de quebras na cadeia de DNA) em células CHO logaritmicamente crescentes, em concentrações de cerca de 10µM. Além disso, a β-lapachona provou ser capaz de desregular as funções de PARP (aumento da atividade) e topoisomerase I (inibição). Tais resultados, considerados em conjunto, convergiram para sugerir que a β-

lapachona não é um agente que danifica diretamente o DNA. É possível que o forte potencial genotóxico, observado neste estudo, seja reflexo da interferência da β -lapachona com a delicada máquina de metabolização de DNA, em que ambos PARP e topoisomerase I desempenham um papel central (VANNI et al., 1998). No entanto, é possível que a β -lapachona induza a um pequeno número de quebras da cadeia de DNA devido à sua capacidade de produzir espécies de oxigênio reativas (DOCAMPO et al., 1979; MOLINA PORTELA et al., 1996ab).

A β -lapachona apresenta intensa atividade citotóxica *in vitro* contra diversas linhagens de células cancerígenas humanas e, também, de murino, incluindo câncer laríngeo epidermóide, próstata, do cólon, do ovário e do câncer de mama e diferentes tipos de células leucêmicas (PLANCHON et al., 2001; QUEIROZ et al., 2008). Acredita-se ser devido à redução de dois elétrons da β -lapachona catalisada por NAD (P) H: quinona oxidoreductase (NQO1, a DT-diaforase), utilizando NAD (P) H ou NADH como elétrons de origem (PARDEE et al., 2002; PLANCHON et al., 2001; KUNG et al., 2007). Na presença de NQO1, a β -lapachona passa por uma redução a uma hidroquinona instável, que sofre uma rápida oxidação em dois passos para trás para o composto progenitor, perpetuando ciclo fútil redox e resultando na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo superóxidos (PLANCHON et al., 2001; de WITTE et al., 2004; PINK et al., 2000; CHOI et al., 2007; KUNG et al., 2007). Estudos sugerem que a β -lapachona tenha atuação direta sobre a DNA topoisomerase, inibindo sua atividade, resultando em citotoxicidade (FRYDMAN et al., 1997; LI et al., 1993; LI et al., 1995; PARDEE et al., 2002; WOO et al., 2006). A possível capacidade de inibição do desenrolamento do DNA é mediada por uma direta interação da topoisomerase I com a β -lapachona, sem induzir a atividade catalítica do complexo clivável (LI et al., 1993; CHOI et al., 2003b; WOO et al., 2006). Vanni et al. (1998) demonstraram que os efeitos citotóxicos do β -lapachona apresentam relação com a reduzida atividade enzimática de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP). Sugere, então, que a inibição de PARP desempenha um papel central nos efeitos biológicos complexos que sejam induzidos por β -lapachona (VANNI et al., 1998; CHOI et al., 2003b).

Os efeitos tóxicos do lapachol administrado por via oral foram estudados em roedores, cães e macacos. A DL50 de ambos os sexos foi de 0,621 g/Kg em camundongos BALB/c e superior a 2,4 g/kg em ratos albinos. Os sinais tóxicos apresentados incluíam diarreia, apatia, edema e eritema das pálpebras. Os cães receberam doses diárias de 0,25, 0,50, 1,0 e 2,0 g/Kg por 6 dias e nenhuma delas apresentou efeito letal. Já os macacos foram tratados com as seguintes doses 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, e 1,0 g/Kg/dia. Sendo letal após seis doses de 0,5

g/Kg/dia e após cinco doses de 1,0 g/Kg/dia. Os sinais de toxicose em cães e macacos incluíam anemia moderada a grave, reticulocitose, normoblastose, bilirrubinúria e proteinúria. Além disso, os cães apresentaram trombocitose transitória e leucocitose. Leucopenia, trombocitopenia e azotemia foram observadas apenas em macacos (MORRISON et al., 1970).

In vivo a β -lapachona é bem tolerada em cães, ratos, camundongos e galinhas. A dose máxima tolerada, quando administrada diariamente durante 1 mês, seja 200mg/kg em ratos, e 100mg/kg em cães. Doses acima dessas concentrações causam úlceras gástricas e perda de eritrócitos, mas não são sinais de supressão da medula óssea (LI et al., 2000). Queiroz et al., (2008), demonstraram que as manifestações tóxicas foram exercidas pelas doses elevadas de β -lapachona em camundongos normais e portadores de tumor. Porém, as concentrações de *H. impetiginosus* utilizadas no tratamento dos animais não apresentaram qualquer vestígio de β -lapachona. Sugere-se então que o efeito antitumoral da *H. impetiginosus* e β -lapachona, atue em sinergia com outros fatores, tais como as citocinas específicas (KAMATA & HIRATA, 1999; QUEIROZ et al., 2008).

6. CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos na presente pesquisa, conclui-se que:

- Esta pesquisa científica relata informações com ênfase em mutagênese, de modo especial sobre os possíveis efeitos genotóxicos do extrato fluido liofilizada da casca de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos e seu composto quinona Lapachol, usando o ensaio *in vivo* do micronúcleo em medula óssea de camundongos, cujo tema tem sido alvo de poucas pesquisas, desde o final da década de 90.
- Os dados apontam para presença de potencial genotoxicidade (i.e., clastogenia e/ou aneugenia) dependente da dose (2000 mg.Kg⁻¹) e leve genotoxicidade (i.e., clastogenia e/ou aneugenia) também dependente da dose (500–1.000 mg.Kg⁻¹) do extrato de *H. impetiginosus*, independentemente do tempo de tratamento (24 e 48 h) e do sexo (macho e fêmea).
- Ausência de genotoxicidade (i.e., clastogenia e/ou aneugenia) do LAP nas dosagens de (75–150 mg.Kg⁻¹), dependente da dose de administração fitoterapêutica (75–150 mg.Kg⁻¹), independentemente do tempo de tratamento (24 e 48 h) e sexo (macho e fêmea) e presença de genotoxicidade (i.e., clastogenia e/ou aneugenia) do LAP dose-dependente (300 mg.Kg⁻¹), mas dependente do tempo de tratamento (24 e 48 h) e sexo (macho e fêmea).
- Ausência de toxicidade sistêmica (i.e., aguda e crônica na medula óssea) tanto do extrato de *H. impetiginosus*, quanto do lapachol, sob as condições do ensaio do micronúcleo, conforme os dados de proporção PCE/NCE.
- Outros estudos envolvendo a genotoxicidade de extratos e compostos fitoquímicos isoladamente caracterizados de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos, devem ser conduzidos, objetivando-se caracterizar os efeitos potencialmente genotóxicos e seus mecanismos moleculares envolvidos e, mais importante, estabelecer limites para o consumo, delinear os riscos potenciais à saúde, e implementar estratégias racionais e medidas quimio-preventivas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCORSI, W R. **Tahebo**. Zero Planning: Kobe, 1988. 28 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopéia Brasileira**. 5.ed. Brasília, 2010.

ALBERTINI, R J et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 463, n. 2, p. 111–172, aug. 2000.

ALVES, J M et al. *In vivo* protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. **Journal of Applied Toxicology**, Philadelphia, v. 33, n. 8, p. 854–860, aug. 2013.

AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION (AVMA). Report of the American Veterinary Medical Association Panel on Euthanasia. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Ithaca, v. 218, n. 5, p. 669–696, mar. 2001.

AMES, B N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, New York, v. 221, n. 4617, p. 1256–1264, sept. 1983.

ANDERSON, D; YU, T; MCGREGOR, D. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. **Mutagenesis**, Washington, v. 13, n. 6, p. 539–555, nov. 1998.

ARALDI, R et al. Bovine papillomavirus clastogenic effect analyzed in comet assay. **Bio Med Research International**, New York, v. 2013, p. 1–7, mar. 2013. Article ID 630683.

ARALDI, R et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, New York, v. 72, n. C, p. 74–82, may 2015.

ARAÚJO, M V et al., Evaluation on the leishmanicidal activity of 2-N,N'-dialkylamino-1,4-naphthoquinone derivatives. **Experimental Parasitology**, New York, v. 176, p. 46–51, feb. 2017.

ARORA, S et al. Evaluation or genotoxicity of medicinal plant extracts by the comet and Vitotox (R) tests. **Journal of Environment Pathology, Toxicology and Oncology**, New York, v. 24, n. 3, p. 193–200, jan. 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA FARMOQUÍMICA (ABIQUIF). 2009.

Disponível em: http://abiquifi.org.br/mercado_/ Acesso em: 20 dez. 2016.

AWALE, S et al. Nitric oxide (NO) production inhibitory constituents of *Tabebuia avellanedae* from Brazil. **Chemical e Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 53, n. 6, p. 710–713, jun. 2005.

AZQUETA, A; COLLINS, A. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of Toxicology**, New York, v. 87, n. 6, p. 949–968, jun. 2013.

BAGULEY, B C; FERGUSON, L R. Mutagenic properties of topoisomerase-targeted drugs. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1400, n. 1–3, p. 213–222, oct. 1998.

BANG, W et al. B-lapachone suppresses the proliferation of human malignant melanoma cells by targeting specificity protein 1. **Oncology Reports**, Athens, v. 35, n. 2, p. 1109–1116, feb. 2016

BLATT, C T T; SALATINO, A; SALATINO, M L F. Flavonoids of *Tabebuia caraiba* (Bignoniaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, New York, v. 24, n. 89, p. 89, nov. 1996.

BÖHLER, T et al. *Tabebuia avellanedae* extracts inhibit IL–2–independent T–lymphocyte activation and proliferation. **Transplant immunology**, Sevenoaks, v. 18, n. 4, p. 319–323, feb. 2008.

BORIOLLO, M F G et al. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of *Ziziphus joazeiro* Mart. Bark in the micronucleus assay. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 2, p. 428–438, jun. 2014a.

BORIOLLO, M F G. et al. Nongenotoxic effects and a reduction of the DXR-induced genotoxic effects of *Helianthus annuus* Linné (sunflower) seeds revealed by micronucleus assays in mouse bone marrow. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v.14, p 121, p. 1–15, apr. 2014b.

BRAND, J D; FISHER, F J. Reductive transformations of 10-deoxydaunomycinone. **The Journal of Organic Chemistry**, Easton, v. 55, n. 8, p. 2518–2530, apr. 1990.

BUDÁN, F et al. Mixtures of *Uncaria* and *Tabebuia* extracts are potentially chemopreventive in CBA/Ca mice: a long-term experiment. **Phytotherapy Research**, London, v.25, n. 4, p. 493–500, aug. 2011.

BYEON, S E et al. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from the inner bark of *Tabebuia avellanedae*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 119, n. 1, p. 145–152, jun. 2008.

CARMO LAGROTA, M H et al. Antiviral activity of naphthoquinones. I. Lapachol derivatives against enteroviruses. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, México, v. 28, n. 3, p. 221–225, jul/sept. 1986.

CARVALHO, M C D et al. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 42, n. 3, p. 185–191, out. 2003.

CASINOVI, C G et al. On quinones isolated from the wood of *Tabebuia avellanedae* Lor. ex griseb. **Rendiconti – Istituto superiore di sanita**, Roma, v. 26, n.2, p. 5–10, jan.1963.

CHANDRASEKARAN, C V *et al.* Evaluation of the genotoxic potential of standardized extract of *Glycyrrhiza glabra* (GutGard™). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 61, n. 3, p. 373–380, dec. 2011.

CHOI, B T; CHEONG, J; CHOI, Y H. β -Lapachone-induced apoptosis is associated with activation of caspase-3 and inactivation of NF-kappaB in human colon cancer HCT-116 cells. **Anticancer Drugs**, Oxford, v. 14, n. 10, p.845–850, nov. 2003a.

CHOI, H W et al. Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 145, n. 3, p. 890–904, nov. 2007.

CHOI, W. H. et al. Ethanolic extract of Taheebo attenuates increase in body weight and fatty liver in mice fed a high-fat diet. **Molecules: a journal of synthetic chemistry and natural product chemistry**, Basel, v. 19, n. 10, p. 16013–16023, oct. 2014.

CHOI, Y H; KANG, H S; YOO, M A. Suppression of human prostate cancer cell growth by β -Lapachone via down-regulation of pRB phosphorylation and induction of Cdk inhibitor p21(WAF1/CIP1). **Journal of biochemistry and molecular biology**, Seoul, v. 36, n. 2, p. 223–229, mar. 2003b.

COELHO, J M et al. 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**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 1, p. 45–51, feb. 2010.

COLLABORATIVE STUDY GROUP FOR THE MICRONUCLEUS TEST (CSGMT). Sex differences in the micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 172, n. 2, p. 151–163, nov. 1986.

COLLINS, A. R et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 143–151, may 2008.

COSTA, W F; OLIVEIRA, A B; NEPOMUCENO, J C. Genotoxicity of lapachol evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 558-563, jul. 2010.

CRAGG, G M; NEWMAN, D J. Plants as a source of anticancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 100, n. 1-2, p. 72–79, aug. 2005.

CUNHA, A S et al. Synthesis of novel naphthoquinone-spermidine conjugates and their effects on DNA-topoisomerases I and II-a. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 439–442, jun. 2006.

DE MIRANDA, F G et al. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract. **BMC Pharmacology**, London, v. 1, n. 6, p. 1–5, sept. 2001.

DE SANTANA, C F et al. Antitumoral and toxicological properties of extracts of bark and various wood components of Pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*). **Revista do Instituto de Antibióticos da Universidade de Recife**, Recife, v. 8, n. 1, p. 89–94, dec. 1968.

DE WITTE, N V et al. 2-Phenyl-beta-lapachone can affect mitochondrial function by redox cycling mediated oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, n. 432, v. 2, p. 129–135, dec. 2004.

DECORDIER, I et al. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. **Mutagenesis**, Swansea, v. 17, n. 4, p. 337–344, jul. 2002.

DIAZ, F; MEDINA, J D et al. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea* ssp. *neochrysantha*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 59, n. 5, p. 423–424, jan. 1996.

DOCAMPO R, et al. B-lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide anion and hydrogen peroxide formation by Sarcoma 180 ascites tumor cells. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 723–728, mar. 1979.

DUBIN, M; FERNÁNDEZ, V S; STOPPANI, A O. Inhibition of microsomal lipid peroxidation and cytochrome P-450-catalyzed reactions by β -lapachone and related naphthoquinones. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 39, n. 7, p. 1151–1160, apr. 1990.

ELGORASHI, E E et al. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 143, n. 2, p. 195–207, jul. 2003.

ESTEVEZ-SOUZA, A et al. Cytotoxic and DNA-topoisomerase effects of lapachol amine derivatives and interactions with DNA. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 40, n. 10, p. 1399–1402, jul. 2007.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **ICH guideline**: on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. 2012. Disponível em <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/12/WC500119604.pdf>. Acesso em 07 dez. 2016.

FARNSWORTH, N R et al. Medicinal plants in therapy. **Bull World Health Organization**, Geneva, v. 63, n. 6, p. 965–981, jan.1985.

FENECH, M et al. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability—results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. **Carcinogenesis: integrative Cancer Research**, New York, v. 26, n. 5, p. 991–999, may 2005.

FENECH, M; CROTT, J W. Micronuclei, nucleopasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis–block micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 504, n. 1–2, p. 131–136, jul. 2002.

FENECH, M; MORLEY, A A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 147, n. 1–2, p. 29–36, feb. 1985.

FREITAS, A E et al. Antidepressant-like action of the bark ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in the olfactory bulbectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 145, n. 3, p. 737–745, feb. 2013b.

FREITAS, A E et al. Antidepressant–like action of the ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Progress in Neuro–Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, New York, v. 34, n. 2, p. 335–343, mar. 2010.

FREITAS, A E et al. NMDA receptors and the L–arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway are implicated in the antidepressant–like action of the ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in mice. **Journal of medicinal food**, New York, v. 16, n. 11, p. 1030–1038, nov. 2013a.

FRY, M; PUDNEY, M. Site of action of the antimalarial hydroxynaphthaquinone– 2–[trans–4–(49–chlorophenyl)cyclohexyl]–3–hydroxy–1,4–naphthoquinone (566C80). **Biochemical Pharmacology**, New York, n. 43, n. 7, p. 1545–1553, apr. 1992.

FRYDMAN, B et al. Induction of DNA topoisomerase II–mediated DNA cleavage by β –lapachone and related naphthoquinones. **Cancer Research**, Baltimore, v. 57, n. 4, p. 620–627, feb.1997.

GARCIA, E S et al. Fitoterápicos. In: SIMÕES, C M O et al. (Ed.), **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRS, 1996. p.15.

GATEHOUSE, D et al. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 312, n. 3, p. 217–233, jun. 1994.

GIACOMELLI, I et al, Oral lapacho-based medication: an easy, safe, and feasible support to prevent and/or reduce oral mucositis during radiotherapy for head and neck cancer. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 67, n. 8, p. 1247–1253, out. 2015.

GOEL, R K et al. Effect of lapachol, a naphthaquinone isolated from *Tectona grandis*, on experimental peptic ulcer and gastric secretion. **Journal of Pharmaceutics & Pharmacology**, Los Angeles, v. 39, n. 2, p. 138–140, feb. 1987.

GÓMEZ CASTELLANOS, J R; PRIETO, J M; HEINRICH, M. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*) - a global ethnopharmacological commodity? **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 121, n. 1, p. 1–13, nov. 2009.

GONÇALVES, A M et al. Evaluation of the toxicity of 3-allyl-_-lapachone against *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, n. 1, v.3, p. 167–176, jun. 1980.

GUIRAUD, P et al. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and b-lapachone. **Planta Medica**, Stuttgart, n.60, v.4, p. 373–374, aug. 1994.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, Swansea, v. 18, n. 1, p. 45–51, jan. 2003.

HASHIMOTO, G. **Illustrated cyclopedia of Brazilian medical plants**. Kamakura: Aboc-sha, 1996.158 p.

HASHIMOTO, G. **In Brazil Shokubutu-ki**: a Note of Brazilian Pkmts. Teikoku Shoin, Tokyo, 1962. 193 p.

HENRY, T R; WALLACE, K B. Differential mechanisms of induction of the mitochondrial permeability transition by quinones of varying chemical reactivities. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 134, n. 2, p. 195–205, oct. 1995.

- HIGA, R A et al. Study of the antineoplastic action of *Tabebuia avellanedae* in carcinogenesis induced by azoxymethane in mice. **Acta cirúrgica brasileira**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 125–128, apr. 2011.
- HÖFLING, J F et al. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 70, n. 4, p. 1065–1068, nov. 2010.
- IAWMOTO, K. et al. The anti-obesity effect of Taheebo (*Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb) extract in ovariectomized mice and the identification of a potential anti-obesity compound. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 478, n. 3, p. 1136–40. sept. 2016.
- INDART, A et al. Clastogenic and cytotoxic effects of lipid peroxidation products generated in culinary oils submitted to thermal stress. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 10, p. 1963–1967, may 2007.
- INTERNATIONAL CONFERENCE HARMONISATION (ICH). ICH M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. 2016. Disponível em <[http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/pdf/prodpharma/applic-demande/guide-ld/ich/multidisciplin/m3\(r2\)-step4etape-eng.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/pdf/prodpharma/applic-demande/guide-ld/ich/multidisciplin/m3(r2)-step4etape-eng.pdf)>. Acesso em 07 dez. 2016.
- JEON, Y J et al. Down regulation of Sp1 is involved in β -lapachone-induced cell cycle arrest and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 46, n. 6, p. 2606–2612, abr. 2015.
- KAMATA, H; HIRATA, H. Redox regulation of cellular signaling. **Cellular Signaling**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 1–14, jan. 1999.
- KAUR, S et al. The *in vitro* cytotoxic and apoptotic activity of Triphala—an Indian herbal drug. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 97, n. 1, p. 15–20, feb. 2005.
- KEE, J Y et al. B-lapachone inhibits lung metastasis of colorectal cancer by inducing apoptosis of CT26 cells. **Integrative Cancer Therapies**, Thousand Oakes, v. 22, n. 3, p. 1–12, dec. 2016.

- KIM, J H et al. Melanogenesis inhibition of b-lapachone, a natural product from *Tabebuia avellanedae*, with effective in vivo lightening potency. **Archives of Dermatological Research**, Berlin, v. 307, n. 3, p. 229–238, apr. 2015.
- KIM, S O et al. Induction of Egr-1 is associated with anti-metastatic and anti-invasive ability of β -lapachone in human hepatocarcinoma cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 71, n. 9, p. 2169–2176, sept. 2007.
- KIRSCH-VOLDERS, M et al. Indirect mechanisms of genotoxicity. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 140–141, n. 141, p. 63–74, apr. 2003.
- KONSTANTOULOPOULOU, I. et al. Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. **Experientia**, Basel, v. 48, n. 6, p. 616–619, jun. 1992.
- KOYAMA, J et al. Cyclopentene dialdehydes from *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, London, v. 53, n. 8, p. 869–872, apr. 2000.
- KREHER, B et al. New furanonaphthoquinones and other constituents of *Tabebuia avellanedae* and their immunomodulating activities *in vitro*. **Planta Medica**, Stuttgart, n. 54, v. 6, p. 562–563, dec. 1988.
- KRISHNA, G; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, n. 1-2, p. 155–166, nov. 2000.
- KRISHNAN, P; BASTOW, K F. Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives-eleutherin, alpha lapachone, and beta lapachone. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 60, n. 9, p. 1367–1379, nov. 2000.
- KUMAGAI, Y et al. Bioactivation of lapachol responsible for DNA scission by NADPH-cytochrome P450 reductase. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 3, n.4, p. 245–250, sept. 1997.
- KUNG, H N et al. *In vitro* and *in vivo* wound healing-promoting activities of β -lapachone. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 295, n. 4, p 931–943, oct. 2008.

KUNG, H N et al. Involvement of NO/cGMP signaling in the apoptotic and anti-angiogenic effects of β -lapachone on endothelial cells *in vitro*. **Journal of Cellular Physiology**, New York, v. 211, n. 2, p. 522–532, may 2007.

KUNG, H N et al. Sulindac compounds facilitate the cytotoxicity of β -Lapachone by up-regulation of NAD(P)H quinone oxidoreductase in human lung cancer cells. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 2, feb. 2014.

LEACH, N T; JACHSON-COOK, C. Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 554, n. 1–2, p. 89–94, oct. 2004.

LEE, E J et al. B-lapachone suppresses neuroinflammation by modulating the expression of cytokines and matrix metalloproteinases in activated microglia. **Journal of Neuroinflammation**, London, v. 12, n. 133, jul. 2015.

LEE, J H et al. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by β -lapachone in human prostate carcinoma cells. **Pharmacological Research**, London, v. 51, n. 6, p. 553–560, jun. 2005.

LEE, J I et al. β -lapachone induces growth inhibition and apoptosis in bladder cancer cells by modulation of Bcl-2 family and activation of caspases. **Experimental Oncology**, Kyiv, v. 28, n. 1, p. 30–35, mar. 2006.

LEE, M H et al. Analgesic and anti-inflammatory effects in animal models of an ethanolic extract of Taheebo, the inner bark of *Tabebuia avellaneda*. **Molecular Medicine Reports**, Athens, v. 6, n. 4, p. 791–796, oct. 2012.

LI, C J; AVERBOUKH, L; PARDEE, A B. β -lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, n. 30, p. 22463–22468, oct. 1993.

LI, C J; WANG, C; PARDEE, A B. Induction of apoptosis by β -lapachone in human prostate cancer cells. **Cancer Research**, Chicago, v. 55, n. 17, p. 3712–3715, sept. 1995.

- LI, Y. et al. Potent induction of apoptosis by β -lapachone in human multiple myeloma cell lines and patient cells. **Molecular Medicine**, Cambridge, v. 6, n. 12, p. 1008–1015, dec. 2000.
- LIN, T. S. et al. 2,3-Dimethyl-1,4-naphthoquinone derivatives as bioreductive alkylating agents with cross-linking potential. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 27, n. 6, p. 813–815, jun. 1984.
- LIPINSKI, L C et al. Effects of 3 topical plant extracts on wound healing in beef cattle. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, Nigeria, v. 9, n. 4, p. 542–547, jul. 2012.
- MACHADO, T B et al. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 279–284, mar. 2003.
- MANNERS, G D; JURD, L. A new naphthoquinone from *Tabebuia guayacan*. **Phytochemistry**, London, v. 15, n. 2, p. 225–226, ago.1976.
- MATEUCA, R et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, Paris, v. 88, n. 11, p. 1515–1531, nov. 2006.
- MATTOS, J C P et al. Alkaline gel electrophoresis assay to detect DNA strand breaks and repair mechanisms in *Escherichia coli*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, London, v. 51, n. 1, p. 121–126, dec. 2008.
- MCCANN, J; AMES, B N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 73, n. 3, p. 950–954, mar. 1976.
- MOLINA PORTELA, M P et al. Redox cycling of *o*-naphthoquinones in trypanosomatids, superoxide and hydrogen peroxide production. **Biochemical pharmacology**, New York, v. 52, n. 12, p. 1875– 1882, dec. 1996b.

MOLINA PORTELA, M P; STOPPANI, A O. Redox cycling of β -lapachone and related *o*-naphthoquinones in the presence of dihydrolipoamide and oxygen. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 51, n. 3, p. 275–283, feb. 1996a.

MOON D O et al. Anti-inflammatory effects of β -lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 7, n. 4, p. 506–514, apr. 2007.

MOON, D O et al. β -lapachone (LAPA) decreases cell viability and telomerase activity in leukemia cells: suppression of telomerase activity by LAPA. **Journal of Medicinal Food**, New York, v. 13, n. 3, p 481–488, jun. 2010.

MORRISON, D E et al. Oral toxicology studies with lapachol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v.17, n. 1, p. 1–11, jul. 1970

NICOLETTE, J. Genetic Toxicology Testing. *In*: FaQI, A. S. A **Comprehensive E Guide To Toxicology In Preclinical Drug Development**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 141–162.

OECD A GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **Bacterial reverse mutation test**. [S.l.: s.n.], 1997a.

OECD B GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **In vitro mammalian chromosome aberration test**. [S.l.: s.n.], 1997b.

OECD C GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**. [S.l.: s.n.], 1997c.

OECD Test No. 489. **In vivo mammalian alkaline comet assay**. [S.l.: s.n.], 2014.

OLIVEIRA, A B et al. Lignans and naphthoquinones from *Tabebuia incana*. **Phytochemistry**, London, v. 34, n. 5, p. 1409–1412, nov.1993.

OLIVEIRA, M F et al. New enamine derivatives of lapachol and biological activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 74, n. 2, p. 211–221, jun. 2002.

OSTLING, O; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 123, n. 1, p. 291–298, aug. 1984.

OSWALD, E H. **Lapacho**. **British Journal of Phytotherapy**, Hailsham, v. 3, n.3, p. 112–117, jun. 1993.

PARDEE, A B; LI, Y Z; LI, C J. Cancer therapy with β -lapachone. **Current Cancer Drug Targets**, Hilversum, v. 2, n. 3, p. 227–242, sept. 2002.

PARK, B S et al. Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 105, n. 1–2, p. 255–262, apr. 2006.

PEREIRA, T I et al. Efeito antiúlcera do extrato da casca de *Tabebuia avellanae*: ativação da proliferação celular em mucosa gástrica durante o processo de cicatrização. **Phytotherapy Research**, London, v. 27, n. 7, p.1067–1073, jul. 2013.

PINK, J J et al. Activation of a cysteine protease in MCF–7 and T47D breast cancer cells during β -lapachone-mediated apoptosis. **Experimental Cell Research**, New York, v. 255, n. 2, p. 144–155, mar. 2000b.

PINK, J J et al. NAD(P)H:Quinone oxidoreductase activity is the principal determinant of β -lapachone cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 8, p. 5416–5424, feb. 2000a.

PLANCHON, S M et al. β -lapachone-induced apoptosis in human prostate cancer cells: involvement of NQO1/xip3. **Experimental Cell Research**, New York, v. 267, n. 1, p. 95–106, jul. 2001.

PURVES, D et al. Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. **Mutagenesis**, Swansea, v. 10, n. 4, p. 297–312, jul. 1995.

QUEIROZ, M L et al. Comparative studies of the effects of *Tabebuia avellanae* bark extract and β -lapachone on the hematopoietic response of tumour-bearing mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 117, n. 2, p. 228–235, may 2008.

R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em:<<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

RIBEIRO, R L. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, R L; SALVADORI, D M F; MARQUES, E K. (Org). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora ULBRA, 2003. cap. 7, p. 173–200.

SACAU, E P et al. Inhibitory effects of lapachol derivatives on Epstein-Barr virus activation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, n. 11, v.4, p. 483–488, feb. 2003.

SALMON–CHEMIN, L et al. 2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: synthesis and correlation between redox cycling activities and in vitro cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, Easton, v. 44, n. 4, p. 548–565, feb. 2001.

SANTOS, E V; CARNEIRO, J W; FERREIRA, V F. Quantitative structureactivity relationship in aziridinyl-1,4-naphthoquinone antimalarials: study of theoretical correlations by the PM3 method. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 87–93, jan. 2004.

SAVAGE, R E et al. Identification of a novel glucosylsulfate conjugate as a metabolite of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphtho[1,2-b]pyran-5,6-dione (ARQ 501, β -lapachone) in mammals. **Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals**, Bethesda, v. 36, n. 4, p. 753–758, apr. 2008.

SAWANT, S G; FIELDEN, M R; BLACK, K A. Evaluation of genotoxicity testing of FDA approved large molecule therapeutics. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 70, n. 1, p. 87–97, oct. 2014.

SCHUERCH, A R; WEHRLI, W. β -lapachone, an inhibitor of oncornavirus reverse transcriptase and eukaryotic DNA polymerase- α . Inhibitory effect, thiol dependence and specificity. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 84, n. 1, p. 197–205, mar.1978.

SHARMA, P K et al. Tecomaquinone-III: a new naphthoquinone from *Tabebuia pentaphylla*. **Phytochemistry**, London, v. 27, n. 2, p. 632–633, jan. 1988.

SILVA, C R et al. Assessment of *Duguetia furfuracea* genotoxic and cytotoxic activity in bacteria and mice. **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 1, p. 149–156, feb. 2012.

SILVA, M N; FERREIRA, V F; SOUZA, M C B V. An overview of the chemistry and pharmacology of naphthoquinones with emphasis on β -lapachone and derivatives. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 407–416, maio 2003.

SINGH, N et al. A simple technique for quantitation damage of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.175, n. 1, p. 184–191, mar. 1988.

STEINERT, J; KHALAF, H; RIMPLER, M. HPLC separation and determination of naphthol[2,3-b]furan-4,9-diones and related compounds in extracts of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 693, n. 2, p. 281–287, mar.1995.

SUNASSEE, S N et al. Cytotoxicity of lapachol, b-lapachona and related synthetic 1,4-naphthoquinones against oesophageal cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 62, p. 98–110, apr. 2013.

SUO, M et al. Bioactive Phenylpropanoid Glycosides from *Tabebuia avellanedae*. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 7, p. 7336–7345, jun. 2013.

SUO, M R; YAN, S Y. Iridoid glycosides from *Tabebuia avellanedae*. **Chemistry and Biodiversity**, Zurich, v. 13, n. 12, p. 1611–1616, dec. 2016.

SUO, M et al. Anti-inflammatory constituents from *Tabebuia avellanedae*. **Fitoterapia**, Milano, v. 83, n. 8, p. 1484–1488, dec. 2012.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos: introdução ao estudo dos antimicrobianos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1996.

THOMAS, P; UMEGAKI, K; FENECH, M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutagenesis**, Swansea, v. 18, n. 2, p. 187–194, mar. 2003.

THOMSON, R H. **Naphtoquinones. Naturally Occurring Quinones.** London: Academic Press, London, 1971. 203 p.

THYBAUD, V et al. Strategies in case of positive results in genotoxicity testing. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 723, n. 2, p. 121–128, aug. 2011.

TWARDOWSCHY, A et al. Antiulcerogenic activity of bark extract of *Tabebuia avellanedae*, Lorentz ex Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 118, n. 3, p. 455–459, aug. 2008.

UEDA, S et al. Production of anti-tumour-promoting furanonaphthoquinones in *Tabebuia avellanedae* cell cultures. **Phytochemistry**, London, v. 36, n. 2, p. 323–325, may 1994.

VANNI, A et al. DNA damage and cytotoxicity induced by β -lapachone: relation to poly (ADP-ribose) polymerase inhibition. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 401, n. 1–2, p. 55–63, jun. 1998.

VARANDA, E A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 27, n. 1, p. 1–7, ago. 2006.

VARELA-BARCA, F N et al. Base excision repair pathway is involved in the repair lesions generated by flavonoid-enriched fractions of pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) stem bark. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, n. 48, v. 8, p. 672–681, 2007.

VARGAS, M A et al. Reestruturação na indústria farmacêutica mundial e seus impactos na dinâmica produtiva e inovativa do setor farmacêutico brasileiro. 24f. 2010. Disponível em: http://www.researchgate.net/publication/267179584_Reestruturacao_na_industria_farmacautica_mundial_e_seus_impactos_na_dinamica_produtiva_e_inovativa_do_setor_farmacautico_brasileiro, Acesso em: 20 dez. 2016.

VENKATESH, P et al. Modulation of doxorubicin-Induced genotoxicity by *Aegle marmelos* in mouse bone marrow: A micronucleus study. **Integrative Cancer Therapies**, Thousand Oaks, v. 6, n. 1, p. 42–53, mar. 2007.

WAGNER, H et al. Structure determination of new isomeric naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones from *Tabebuia avellanedae* by the selective-INEPT technique. **Helvetica Chimica Acta**, Zurich, v. 72, n. 4, p. 659-667, jun. 1989.

WARASHINA, T; NAGATANI, Y; NORO, T. Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, London, v. 65, n. 13, p. 2003-2011, jul. 2004.

WARASHINA, T; NAGATANI, Y; NORO, T. Constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 54, n. 1, p. 14-20, jan. 2006.

WARASHINA, T; NAGATANI, Y; NORO, T. Further constituents from the bark of *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, London, v. 66, n. 5, p. 589-597, mar. 2005.

WOO, H J et al. β -Lapachone, a quinone isolated from *Tabebuia avellanedae*, induces apoptosis in HepG2 hepatoma cell line through induction of Bax and activation of caspase. **Journal of Medicinal Food**, New York, v. 9, n. 2, p. 161-168, out. 2006.

WOO, H J; CHOI, Y H. Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by β -lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 26, n. 4, p.1017-1023, apr. 2005.

XU, J et al. β -Lapachone ameliorization of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 254, n. 1-2, p. 46-54, jan. 2013.

YAMASHITA, M et al. Synthesis and evaluation of bioactive naphthoquinones from the Brazilian medicinal plant, *Tabebuia avellanedae*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 17, n.17, p. 6289-6291, sept. 2009

ZAMBRANO, M A; TARGA, H J; RABELLO-GAY, M N. Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleus and metaphase slide preparations. **Stain Technology**, Baltimore, v. 57, n. 1, p. 48-49, jan. 1982.

ZANI, C L; OLIVEIRA, A B; OLIVEIRA, G G. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea*. **Phytochemistry**, London, v. 30, n. 7, p. 2379-2381, nov. 1991.

ZHANG, L; HASEGAWA, I; OHTA, T. Anti-inflammatory cyclopentene derivatives from the inner bark of *Tabebuia avellanedae*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 109, p. 217-223, mar. 2016b.

ZHANG, L; HASEGAWA, I; OHTA, T. Iridoid esters from *Tabebuia avellanedae* and their in vitro anti-inflammatory activities. **Planta medica**, Stuttgart, v. 83, n. 1–2, p. 164–171, jan. 2016a.