

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO – UNIFENAS
THAÍSLA ANDRIELLE DA SILVA

ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS E DE TOXICIDADE DE *Handroanthus impetiginosus* E SUA
POTENCIAL APLICABILIDADE EM MEDICINA VETERINÁRIA

Alfenas – MG

2019

THAÍSLA ANDRIELLE DA SILVA

ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS E DE TOXICIDADE DE *Handroanthus impetiginosus* E SUA
POTENCIAL APLICABILIDADE EM MEDICINA VETERINÁRIA

Tese apresentada à Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Reprodução, sanidade e bem-estar animal para obtenção do título de Doutor (a).

Orientador (a): Nelma de Mello Silva Oliveira
Co-orientador: Marcelo Fabiano Gomes Boriollo

Alfenas – MG

2019

Dados internacionais de catalogação-na-publicação

Biblioteca Central da UNIFENAS

Silva, Thaísia Andrielle da
Estudos microbiológicos e de toxicidade de *handroanthus
impetiginosus* e sua potencial aplicabilidade em Medicina Veterinária.
Thaísia Andrielle da Silva. —Alfenas, 2019.
60 f.

Orientadora: Profª Nelma de Mello Silva Oliveira
Tese (Doutorado)- Programa de Pós-graduação
em Reprodução, Sanidade e Bem Estar Animal
Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2019.

1. Atividade antimicrobiana 2. Ensaio toxicológico 3. Fitoterápico
4. Ipê roxo 5. Medicina Veterinária I. Universidade José do Rosário
Vellano II. Título

CDU : 582.916.31:636(043)

Zélia Fernandes Ferreira Miranda

Bibliotecária CRB6 1486



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS E DE GENÉTICA TOXICOLÓGICA DE *Haemodranthus impetiginosus* E SUA POTENCIAL APLICABILIDADE A MEDICINA VETERINÁRIA".

Autor: Thaísia Andrielle da Silva

Orientador: Profa. Dra. Nelma de Mello Silva Oliveira

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **DOUTORA EM REPRODUÇÃO, SANIDADE E BEM-ESTAR ANIMAL** pela Comissão Examinadora.


Profa. Dra. Nelma de Mello Silva Oliveira
Orientadora


Prof. Dr. Luiz Carlos Nascimento


Profa. Dra. Alessandra Cristina Pupin Silvério


Profa. Dra. Síndone Caetani Machado


Profa. Dra. Elizângela Guedes

Alfenas, 14 de março de 2019.


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

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Deus*, por me proporcionar a capacidade de conseguir seguir sempre em frente, mesmo com todas as dificuldades.

Aos meus Pais *Paulo* e *Sueli*, e minha Avó *Maria*, pelas orações, apoio, dedicação, companheirismo, força e todo amor concebido para a realização do meu sonho. Quero que saibam que reconheço tudo que fizeram por mim, a força que inculcaram no meu pensamento para não desistir e o conforto de saber que nunca estarei só e serei sempre capaz de tudo por maiores que sejam as dificuldades.

À minha Tia *Suzana*, que sempre me inspirou e me fez acreditar que podemos mudar o nosso mundo através dos estudos. Nada disso seria possível sem o seu apoio.

As minhas *irmãs, sobrinhos e familiares*, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim durante toda minha caminhada.

Ao meu namorado *Igor*, por me apoiar, incentivar e tornar esta etapa mais leve.

Ao Professor Ph.D. *Marcelo Fabiano Gomes Boriollo*, que me orientou para a realização deste trabalho, por sempre acreditar na minha capacidade e aconselhar diante dos empecilhos encontrados. Obrigada pelos ensinamentos, atenção, amizade e dedicação ao longo deste período.

À Professora Ph.D. *Nelma de Mello Silva Oliveira*, pela confiança em minha capacidade, por todo o apoio e ensinamento durante esses anos.

À *Rede Mineira de Ensaaios Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos (REDE MINEIRA TOXIFAR)*, *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)*.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES/PROSUP*, pela bolsa de estudo, fundamental para realização deste projeto.

À *Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS*, em especial aos professores do programa de pós-graduação, por todo conhecimento transmitido.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

*“Se eu vi mais longe, foi por estar
sobre ombros de gigantes.”*

Isaac Newton

RESUMO

SILVA, Thaís da. **Estudos microbiológicos e de toxicidade de *Handroanthus impetiginosus* e sua potencial aplicabilidade em Medicina Veterinária**. 60 p. Tese (Doutorado em Reprodução, Sanidade e Bem-Estar Animal) – UNIFENAS, Alfenas, 2019.

Handroanthus impetiginosus Mattos tem sido utilizado por um longo período na Medicina tradicional e vários estudos têm mostrado a presença de compostos químicos com potencial atividade fitoterapêutica. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a composição química (Cromatografia Gasosa – MS) do extrato hidroalcoólico da casca de *H. impetiginosus* (H.i.), seu potencial antimicrobiano contra bactérias e leveduras (Teste de Microdiluição em Caldo) e toxicidade (Ensaio do Micronúcleo (MN) em medula óssea de camundongos; *DNA Nicking* plasmidial; e Citotoxicidade em Células *HaCat*). Trinta compostos químicos foram identificados pela cromatografia gasosa, o H.i. apresentou atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias e leveduras, com CIM de (50 – 12,5 e 100 – 0,19 mg.mL⁻¹, respectivamente). O ensaio do MN sugeriu ausência de genotoxicidade, leve toxicidade sistêmica e efeitos antigenotóxicos nas concentrações testadas (0,5 – 2,0 g.mL⁻¹). O teste em células *HaCat* indicou citotoxicidade dose-dependente de H.i. a partir da concentração $\geq 1,56$ mg.mL⁻¹. No ensaio antioxidante genômico, as concentrações (1.000 – 100 μ g.mL⁻¹) de H.i. protegeu parcialmente o DNA de danos causados pela reação de Fenton, já no ensaio genotóxico, o H.i. foi pró-oxidante em sua maior concentração (5.000 μ g.mL⁻¹), no entanto, nas dosagens (3.160 – 100 μ g.mL⁻¹) não causou qualquer efeito. Esses resultados indicam que o H.i. apresenta atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica) e antigenotóxica, no entanto, é tóxico de maneira dose-dependente para as células avaliadas, o que justifica a realização de mais estudos a fim de determinar condições de exposição mais seguras com aplicabilidade na saúde animal.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, ensaio toxicológico, fitoterápico, ipê roxo, Medicina Veterinária.

ABSTRACT

SILVA, Thaísia Andrielle da. ***Microbiological and toxicity studies of *Handroanthus impetiginosus* and its potential applicability in veterinary medicine***. 60 p. Thesis (Doctorate in Reproduction, Health and Animal Welfare) – UNIFENAS, Alfenas, 2019.

Handroanthus impetiginosus Mattos has been used for a long time in traditional Medicine and several studies have shown the presence of chemical compounds with potential phytotherapeutic activity. Thus, the objective of this study was to evaluate the chemical composition (Gas Chromatography - MS) of the hydroalcoholic extract of *H. impetiginosus* (H.i.) peel, its antimicrobial potential against bacteria and yeasts (Broth Microdilution Test) and toxicity Micronucleus (MN) in bone marrow of mice, plasmid DNA Nicking, and Cytotoxicity in HaCat Cells). Thirty chemical compounds were identified by gas chromatography, H.i. showed antimicrobial activity against strains of bacteria and yeasts, with MIC (50 - 12.5 and 100 - 0.19 mg.mL⁻¹, respectively). The MN assay suggested absence of genotoxicity, mild systemic toxicity, and antigenotoxic effects at the concentrations tested (0.5 - 2.0 g.mL⁻¹). The HaCat cell test indicated dose-dependent cytotoxicity of H.i. from the concentration ≥ 1.56 mg.mL⁻¹. In the genomic antioxidant assay, the concentrations (1,000 - 100 μ g.mL⁻¹) of H.i. partially protected the DNA from damage caused by the Fenton reaction, already in the genotoxic assay, H.i. was pro-oxidant at its highest concentration (5,000 μ g.mL⁻¹), however, at dosages (3,160 - 100 μ g.mL⁻¹) it did not cause any effect. These results indicate that H.i. (anti-bacterial and antifungal) and antigenotoxic activity, however, it is toxic in a dose-dependent manner for the cells evaluated, which justifies further studies in order to determine safer exposure conditions with applicability in animal health.

Keywords: Antimicrobial activity, toxicological test, phytotherapeutic, purple ipe, Veterinary Medicine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Tratamentos do Ensaio do Micronúcleo.....	31
Figura 2.	Triagem fitoquímica (análise qualitativa) de H.i. por GC-MS.....	33
Figura 3.	Atividade antiproliferativa (<i>HaCat cells</i>).....	37
Figura 4.	Perfil eletroforético do DNA plasmidial pBR322 após ensaios genotóxico ou pró-oxidante e antioxidante genômico de H.i.....	38
Figura 5.	Ensaio mutagênico e antimutagênico de H.i., utilizando o ensaio do Micronúcleo...	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Atividades farmacológicas de <i>H. impetiginosus</i> e seus compostos.....	19
Tabela 2.	Triagem fitoquímica (análise qualitativa) de H.i. por GC-MS.....	34
Tabela 3.	Concentração inibitória mínima – Leveduras.....	35
Tabela 4.	Concentração inibitória mínima – Bactérias.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{mol/L}$	Micromol/Litro
A549	Linhagem do câncer de pulmão
AGS	Linhagem do adenocarcinoma gástrico humano
ARH-77	Linhagem do mieloma múltiplo humano
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSC-40	Células epiteliais de rim de macaco
CBM	Concentração bactericida mínima
CCE	Células somáticas do leite
CFM	Concentração fungicida mínima
CHO	Células do ovário de Hamster chinês
CIM	Concentração inibitória mínima
CL1-1	Linhagem do câncer de pulmão
CL1-5	Linhagem do câncer de pulmão
CP	Ciclofosfamida
DMBA	<i>7,12-Dimethylbenz[a]anthracene</i>
DOX40	Células doxorubicina resistente
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DU145	Linhagem do câncer de próstata humano
DXR	Doxorrubicina
EAhy926	Linhagem de células endoteliais
EGF	Fator de crescimento epidérmico
H.i.	Extrato hidroalcoólico da casca de <i>Handroanthus impetiginosus</i>
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
g/mol	Gramas/mol
G480	Linhagem do câncer de pulmão
GC-MS	Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa
<i>H. impetiginosus</i>	<i>Handroanthus impetiginosus</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
<i>HaCat</i>	Células de queratinócitos humano
HCT-116	Linhagem celular do câncer de colon
Hela	Linhagem celular do câncer de mama
Hep3B	Linhagem celular do hepatocarcinoma humano
HepG2	Linhagem celular do hepatocarcinoma humano
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana - 1
HL60	Linhagem celular de leucemia humana
HO•	Radical hidroxila
HPTLC	Cromatografia de camada fina de alto desempenho
HSC3	Linhagem celular do câncer escamoso oral
HUVEC	Células endoteliais vasculares umbilicais humanas
IC	Índices de citotoxicidade
J774.1	Linhagem celular de macrófagos murino

K562	Linhagem celular de leucemia humana
LPS	Lipopolissacarídeo
MN	Micronúcleo
MNPCE	Eritrócito policromático micronucleado
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina
NCE	Eritrócito normocromático
Nm	Nanômetro
PGE ₂	Prostaglandina E2
NO	Óxido nítrico
O ₂ -•	ânion-radical superóxido
PARP	Polimerase ADP-ribose
pBR322	DNA plasmidial
PC-3	Linhagem celular do câncer de próstata
PCE	Eritrócito policromático
PM	Peso molar
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI-1640	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i> - 1640
SCGE	Eletroforese em gel de célula única
SDA	Ágar sabouraud dextrose
SRB	Sulforodamina B
T24	Linhagem celular do câncer de bexiga
TBE	Tris, ácido bórico, EDTA
TTZ/ TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio
U937	Linhagem celular da leucemia
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
K562	Linhagem celular da leucemia
HL60	Linhagem celular da leucemia
THP-1	Linhagem celular da leucemia

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	OBJETIVOS.....	16
3.	JUSTIFICATIVA.....	17
4.	REVISÃO DE LITERATURA	18
4.1	Fitoterapia em medicina veterinária.....	18
4.2.	Doenças bacterianas e fúngicas.....	19
4.3.	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	20
4.3.1.	Atividades farmacológicas.....	21
4.3.2.	Fitoquímica.....	22
4.3.3.	Aspectos citotóxicos e genotóxicos.....	23
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1.	Fitoterápico	25
5.2.	Análise qualitativa por Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa.....	25
5.3.	Ensaio antimicrobianos.....	25
5.3.1.	Leveduras.....	25
5.3.2.	Bactérias.....	26
5.3.3.	Teste de sensibilidade antifúngica.....	26
5.3.3.1.	Concentração fungicida mínima.....	27
5.3.4.	Teste de sensibilidade antibacteriana.....	28
5.3.4.1.	Concentração bactericida mínima.....	29
5.4.	Ensaio citotóxico <i>in vitro</i> e mutagênico.....	29
5.4.1.	Citotoxicidade <i>in vitro</i> – atividade antiproliferativa (<i>HaCat cells</i>).....	29
5.5.	Ensaio de <i>DNA Nicking</i>	30
5.5.1.	Grupos experimentais.....	30
5.5.2.	Eletroforese em gel de agarose e fotodocumentação.....	31
5.5.3.	Análises das formas <i>pBR322</i>	31
5.6.	Ensaio do Micronúcleo.....	32
5.6.1.	Sistema – teste <i>in vivo</i>	32
5.6.2.	Grupos experimentais.....	32
5.6.3.	Processamento de medula óssea e análise de células.....	33

5.6.4.	Análise estatística.....	34
6.	RESULTADOS.....	35
6.1.	Análise qualitativa por Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa.....	36
6.2.	Ensaio antimicrobianos.....	36
6.2.1.	Sensibilidade antifúngica.....	36
6.2.2.	Sensibilidade antibacteriana.....	37
6.3.	Ensaio citotóxico e mutagênico.....	38
6.3.1.	Citotoxicidade <i>in vitro</i> – atividade antiproliferativa (<i>HaCat cells</i>)	38
6.3.2.	Ensaio de <i>DNA Nicking</i>	39
6.3.3.	Ensaio do Micronúcleo.....	40
7.	DISCUSSÃO.....	43
7.1.	Fitoquímica.....	43
7.2.	Atividade antimicrobiana.....	44
7.3.	Citotoxicidade e Genotoxicidade.....	46
8.	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

Handroanthus impetiginosus (Mart. ex DC.) Mattos (*H. impetiginosus*) é uma árvore perene, com flores rosadas (ou roxas), encontrada em florestas tropicais de toda a América Central e do Sul (ZHANG *et al.*, 2016), e diversos estudos têm mostrado a presença de variados compostos químicos com atividade fitoterapêutica, que podem ter potencial aplicação para a medicina veterinária. Dentre essas atividades estão: anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-térmica, antiedematogênica. Mas as atividades anticancerígena e antimetastática são as mais conhecidas (CASTELLANOS *et al.*, 2009). Porém, antes que essa 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 medeiam o efeito biológico, bem como identificar os compostos químicos responsáveis por seus efeitos terapêuticos. Esta pesquisa científica relata informações com ênfase na composição química (Cromatografia Gasosa – MS) do extrato hidroalcoólico da casca de *H. impetiginosus* (H.i.), avaliação do seu potencial antimicrobiano contra bactérias e leveduras (Teste de Microdiluição em Caldo) e toxicológico (Ensaio do Micronúcleo (MN) em medula óssea de camundongos; *DNA Nicking* plasmidial; e Citotoxicidade em Células *HaCat*).

Outros estudos envolvendo a genotoxicidade de *H. impetiginosus* e seus compostos fitoquímicos isoladamente caracterizados também devem ser conduzidos (Teste de Ames, *mouse lymphoma assay*, FISH, 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 a sua exposição, delinear os potenciais riscos à saúde e animal, e implementar estratégias racionais e medidas quimio-preventivas.

2 OBJETIVOS

Objetivando contribuir com as informações sobre a composição química, efeitos antimicrobianos e toxicológicos do extrato hidroalcoólico da casca de *Handroanthus impetiginosus* (H.i.), a presente pesquisa realizou:

- (i) A avaliação fitoquímica qualitativa de H.i. por meio do ensaio de cromatografia gasosa;
- (ii) A avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e microbicida de cepas de referência e controle de qualidade (bacteriana e fúngica), frente ao H.i., usando o método de microdiluição em caldo;
- (iii) A avaliação da citotoxicidade *in vitro* (índices de citotoxicidade: IC50 e IC100) de H.i., empregando as técnicas de cultura celular eucariótica (células *HaCat*), espectrofotometria e análise de regressão;
- (iv) A avaliação da ação pró-oxidante e antioxidante genômica *in vitro* de H.i., usando o ensaio de *DNA Nicking* plasmidial; e
- (v) A avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade *in vivo*, bem como da toxicidade sistêmica, de H.i., usando o ensaio do micronúcleo em medula óssea de camundongos.

3 JUSTIFICATIVA

Os efeitos colaterais das drogas sintéticas, como a presença de metabólitos tóxicos e resíduos de antibióticos em carnes e carcaças, além do seu uso generalizado e indiscriminado, podem gerar resistência em humanos e animais, tornando-se então, motivo de preocupação para a saúde única. Questões como essas motivam a busca por outras alternativas, como as preparações à base de plantas, já que são mais baratas e seguras em comparação com os modernos sistemas de saúde animal (CHANDAR *et al.*, 2017).

Compostos biologicamente ativos têm sido reconhecidos quanto as suas propriedades farmacológicas, contudo vários desses compostos não puderam ser introduzidos em terapêutica devido às suas propriedades toxicológicas, carcinogênicas e mutagênicas (AMES, 1983; TAVARES, 1996). Nesse contexto, os ensaios para avaliação da atividade mutagênica das plantas, bem como suas substâncias isoladas, são necessários e importantes para estabelecer medidas de controle no uso indiscriminado. Além disso, é preciso esclarecer os mecanismos e as condições que mediaram o efeito biológico, antes que as plantas sejam consideradas como agentes terapêuticos (VARANDA, 2006).

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Fitoterapia em Medicina Veterinária

As plantas e suas preparações são amplamente utilizadas durante toda a história da humanidade e, por muitos anos, foi a única forma de cura, tratamento e prevenção de diversas doenças (ABO-EL-SOUD, 2018). Para isso, em todas as épocas e culturas, aprendeu-se a utilizá-las por conhecimento obtido a partir de experiências partilhadas ou pela observação de sua utilização pelos animais (OLIVEIRA; SIMÕES; SASSI, 2006; FEITOSA *et al.*, 2016; MATTOS, 2018). Em 78 d.C., o botânico grego Pedânios Dioscórides apresentou em sua obra “De Matéria Médica”, 600 espécies de plantas medicinais, que foram referência na área farmacológica por mais de quatorze séculos. Atualmente, o seu uso é uma prática mundialmente disseminada, sendo encorajada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), especialmente em países em desenvolvimento.

A OMS define a fitoterapia como “terapêutica caracterizada pela utilização de plantas medicinais em suas diferentes preparações farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal”, e fitoterápico, como “medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade” (WHO, 2014).

Medicamentos fitoterápicos veterinários compreendem aqueles à base de plantas e sua aplicação terapêutica ou profilática em cuidados de saúde animal. Nas áreas rurais, os fitoterápicos veterinários cobrem conhecimentos, habilidades, métodos, práticas e crenças dos agricultores sobre como cuidar de seus rebanhos. Os pequenos produtores não conseguem custear os gastos gerados pela medicina tradicional, já que estes serviços são atendidos principalmente por medicamentos sintéticos, que são eficazes, no entanto, são caros e geram efeito colateral. Os efeitos colaterais dessas drogas, como a presença de metabólitos tóxicos e resíduos de antibióticos que permanecem na carne, geram resistência, tornando-se assim, motivo de preocupação. Questões como essas motivam a busca pelo uso de alternativas como as preparações à base de plantas, já que são baratas e mais seguras em comparação com os modernos sistemas de saúde animal (CHANDAR *et al.*, 2017).

A planta como um todo, bem como suas variadas partes anatômicas, folha, semente, caule, raiz e flor, apresentam princípios ativos que são utilizados na medicina veterinária (RASTOGI *et al.*, 2015). Algumas das plantas com múltiplas indicações em cuidados de saúde animal são: *Allium cepa*, *Azadirachta indica*, *Curcuma doméstica*, *Piper nigrum*, *Trachyspermum ammi*, *Trigonella foenum-graecum*, *Zingiber officinale* (RASTOGI *et al.*, 2015), *Momordica charantia*, *Lepidium didymum* (COELHO *et al.*, 2017), *Citrullus colocynthis*, *Saccharum spontaneum*, *Moringa oleífera*, e podem ser empregadas

para tratamento de doenças digestivas, feridas e lesões, doenças parasitárias, virais, fúngicas, bacterianas, nutricionais, entre outras (JAYAKUMAR *et al.*, 2017).

No entanto, a padronização de medicamentos fitoterápicos veterinários é necessária para estabelecer sua qualidade, consistência e reprodutibilidade, para assegurar que um ou mais dos principais ingredientes fitoquímicos estejam presentes em uma quantidade definida, além da uniformidade de dosagem, estabilidade e detecção de contaminação/adulteração (WANI; PARAKH; DEGHAN, 2007). A preocupação entre farmacologia e toxicologia é significativa, uma vez que a eficácia terapêutica ocorre com uma dose mais baixa, onde a superdosagem pode provocar toxicidade. No entanto, plantas tóxicas podem conter compostos ativos com atividades biológicas úteis, certas plantas quando usadas em pequenas quantidades são úteis como medicamentos veterinários, enquanto que em grandes quantidades são tóxicas, por exemplo, *Abrus precatorius* (BOTH & PENRITH, 2008; ABO-EL-SOUD, 2018).

4.2. Doenças bacterianas e fúngicas

Inúmeras doenças que acometem os animais são de origem bacteriana e fúngica (RUEGG, 2017; WILLEMS *et al.*, 2017). Dentre as doenças de origem bacteriana, encontra-se a mastite, que é definida como a inflamação da glândula mamária, geralmente decorrente de uma infecção causada por diversos tipos de microrganismos. É a doença mais importante dos rebanhos leiteiros em todo o mundo devido à alta incidência de casos clínicos, alta incidência de infecções subclínicas, além dos prejuízos econômicos que acarreta (ADKINS & MIDDLETON, 2018). Vários microrganismos foram associados à sua causa, como *Streptococcus agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *Escherichia coli* e alguns bacilos (AMER *et al.*, 2018). No entanto, a espécie *Staphylococcus aureus* é a principal responsável pela mastite em bovinos (HARAN, 2012). A capacidade desse microrganismo de causar uma multiplicidade de infecções é provavelmente devido à expressão de fatores de virulência, como toxinas e proteínas de adesão na parede celular, fatores que possibilitam sua sobrevivência a fagocitose (VON EIFF; PETERS; BECKER, 2006). Conseqüentemente, o impacto econômico da mastite por *S. aureus* é devido ao aumento de células somáticas no leite, diminuição da sua produção, aumento dos custos do tratamento veterinário e abate prematuro dos animais infectados (SEEGERS; FOURICHON; BEAUDEAU, 2003). A resistência de *S. aureus* a agentes antibacterianos apresenta um desafio crescente e pode complicar o tratamento de infecções (MONECKE *et al.*, 2007). A alta prevalência de resistência a antibióticos foi observada em isolados de *S. aureus* bovinos (EL-JAKEE *et al.*, 2011), devido ao seu uso generalizado, descontrolado e indiscriminado. Estas cepas geralmente mostram resistência contra todos os tipos de

antibióticos β -lactâmicos que são frequentemente usados para o tratamento da mastite (VANDERHAEUGHEN *et al.*, 2010; SCHLOTTER *et al.*, 2012).

Um número crescente de doenças fúngicas em animais também tem sido relatado, principalmente nas duas últimas décadas, originando-se de fungos oportunistas e patogênicos (SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2018). As leveduras do gênero *Candida* sp. são encontradas como parte da microbiota de animais saudáveis (AL-YASIRI *et al.*, 2016), e as mais descritas como causas de doença são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (MAUBON *et al.*, 2014), afetando principalmente os animais domésticos (QUINN *et al.*, 2002). A candidíase cutânea é bastante frequente em cães, geralmente em associação com atopia, outras doenças imunes ou tratamento médico que leva à imunossupressão. Em aves, a candidíase ocorre principalmente na mucosa oral e gastrointestinal. Ela é caracterizada por manchas branco-acinzentada, muitas vezes acompanhadas de hiperqueratose (DHAMA *et al.*, 2013). Distúrbios semelhantes foram descritos em cavalos, bois, gatos e suínos, geralmente associados a idade jovem, uso de antibióticos ou imunossupressão (ZLOTOWSKI *et al.*, 2006). A candidíase do trato urinário também ocorre em cães e gatos, manifestando-se como candidúria e cistite, geralmente associada ao tratamento com antibióticos, infecções bacterianas prévias ou *diabetes mellitus* (ALVAREZ-PEREZ *et al.*, 2016). Espécies como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*, podem causar aborto em equinos e bovinos (STEFANETT *et al.*, 2014) e também estão relacionadas a casos de mastite em bovinos (DWORECKA-KASZAK *et al.*, 2012).

O grande desafio em relação as infecções fúngicas tem sido relacionado às suas limitações terapêuticas, como a toxicidade farmacológica, diversos efeitos colaterais, alto custo, além da negligência ou abandono da terapia (ZUZARTE *et al.*, 2013). Esses são fatores que contribuíram para o surgimento de resistência fúngica (WALLER *et al.*, 2017).

4.3. *Handroanthus impetiginosus*

H. impetiginosus (Mart. ex DC.) Mattos é uma árvore perene, com flores rosadas (ou roxas), encontrada em florestas tropicais em toda a América Central e do Sul (ZHANG; HASEGAWA; OHTA, 2016). Popularmente conhecida como ipê roxo, apresenta sinônimos como: *Gelsemium avellanadae* (Lorentz ex Griseb.) Kuntze, *Handroanthus avellanadae* (Lorentz ex Griseb.) Mattos, *Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Griseb., *Tabebuia dugandii* Standl., *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl., *Tabebuia nicaraguenses* S.F. Blake, *Tabebuia palmeri* Rosa, *Tabebuia schunkevigoi* D.R. Simpson, *Tecoma adenophylla* Bureau & K. Schum., *Tecoma avellanadae* (Lorentz ex Griseb.) Speg., *Tecoma integra* (Sprague) Hassl.; família: Bignoniaceae).

Historicamente, sua casca púrpura (“Taheebo”) era usada como remédio por tribos milenares (Callawaya) (CASTELLANOS; PRIETO; HEINRICH, 2009). Entre suas aplicações etnofarmacológicas, a casca de *H. impetiginosus* era usada externamente como cataplasma ou oralmente como chá concentrado para o tratamento de inúmeras patologias (PINTO *et al.*, 2000). No Brasil, essa árvore atraiu grande atenção na década de 1960 e na Argentina é chamada de "droga milagrosa" (HEINRICH, 1998). No início de 1967, o ipê foi usado em ensaios clínicos, nos quais foi relatado que pacientes com câncer foram curados no Hospital Municipal de Santo André (JONES, 1995; CASTELLANOS; PRIETO; HEINRICH, 2009).

4.3.1. Atividades farmacológicas

As atividades farmacológicas associadas ao *H. impetiginosus* e seus compostos químicos estão listados na **tabela 1**:

Tabela 1: Atividades farmacológicas de *H. impetiginosus* e seus compostos.

Atividade	Matriz Biológica	Autor (es)
Antiangiogênica	EAhy926, HUVEC	Kung <i>et al.</i> , 2007
Antibacteriano	<i>Treponema</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Helicobacter</i> sp., <i>E. coli</i> , <i>Bifidobacterium</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Clostridium</i> sp.	Park <i>et al.</i> , 2006; Pereira <i>et al.</i> , 2006; Machado <i>et al.</i> , 2003
Anticoagulante e laxativa		Lee <i>et al.</i> , 2012
Anticonceptiva		Guerra <i>et al.</i> , 1999
Antifúngica	<i>Candida</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Neurospora</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Saccharomyces</i> sp., <i>Trichophyton</i> sp.	Höfling <i>et al.</i> , 2010; Portillo <i>et al.</i> , 2001
Anti-inflamatória		Ma <i>et al.</i> , 2017
Antineoplásica	CL1-1, CL1-5, A549, U937, K562, HL60, THP-1, HepG2, Hep3B, T24, DU145, PC-3, HCT-116, ARH-77, HSC3	Kung <i>et al.</i> , 2014; Kim <i>et al.</i> , 2007; Lee <i>et al.</i> , 2006; Dias <i>et al.</i> , 2018
Antiedematogênica		Lee <i>et al.</i> , 2012
Antioxidante		Suo <i>et al.</i> , 2013
Antiparasitária	<i>Schistosoma</i> sp., <i>Leishmania</i> sp., <i>Plasmodium</i> sp., <i>Trypanosoma</i> sp.	Teixeira <i>et al.</i> , 2001; Santos <i>et al.</i> , 2001; Pinto <i>et al.</i> , 2000
Antitérmica		Castellanos <i>et al.</i> , 2009
Antiulcerogênica		Pereira <i>et al.</i> , 2013
Antiviral	HIV-1	Li <i>et al.</i> , 1993
Cicatrizante		Lipinski <i>et al.</i> , 2012; Kung <i>et al.</i> , 2008
Condroprotetor		Park <i>et al.</i> , 2017
Diurético e adstringente		Yamashita <i>et al.</i> , 2009
Imunossupressor		Böhler <i>et al.</i> , 2008
Inibidor da hiperpigmentação da pele		Kim <i>et al.</i> , 2015
Inibidor de sistemas de reparo do DNA		Silva <i>et al.</i> , 2003

Dentre as diversas atividades farmacológicas que o *H. impetiginosus* 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 por larvas de (*Cochliomyia hominivorax*), gerando prejuízos substanciais para os produtores. O efeito do *H. impetiginosus* 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 *H. impetiginosus* na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar, mostrou que ele favoreceu o processo de cicatrização das feridas cutâneas, quando comparado com o controle (COELHO *et al.*, 2010). A aplicação de pomada com e sem β -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 β -lapachona do que nos controles negativo. Além disso, a β -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 β -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 (KUNG *et al.*, 2008).

4.3.2. Fitoquímica

Os compostos quinonas, flavonóides, saponinas, cumarinas, dialdeídos, derivados ciclopenteno, ácido benzoico, derivados benzênicos, ácidos orgânicos, glicídeos, proteínas, lipídeos, vitaminas e sais minerais foram extraídos de *H. impetiginosus* (CHOI; CHEONG; CHOI, 2003; PEREIRA *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2013; ZHANG; HASEGAWA; OHTA, 2016; PARK *et al.*, 2018).

Dentre os compostos majoritários de *H. impetiginosus*, estão as quinonas, que representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural. Nos últimos anos intensificou-se o interesse nestas substâncias, não só devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior que apresentam em variados estudos farmacológicos (HUSSAIN & GREEN, 2017). Com base na sua estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídica: benzoquinonas – um anel benzênico; naftoquinonas – um anel naftalênico; antraquinonas – um anel antracênico linear ou angular. De modo muito peculiar, em decorrência de diferentes arranjos quinonoídicos (isomeria),

com um mesmo tipo de anel pode-se ter, dependendo das disposições relativas das carbonilas, diferentes quinonas. Estas formas isoméricas diferem muito em suas propriedades físicas, químicas e quanto à sua atuação biológica (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

Dentre as várias quinonas relatadas na literatura, o lapachol e β -lapachona são os constituintes de maior interesse pela comunidade científica, visto seus inúmeros efeitos biológicos, principalmente atividade anti-cancerígena (HUSSAIN & GREEN, 2017).

O lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona, $C_{15}H_{14}O_3$, PM: 242,27 g/mol), foi o primeiro composto natural isolado de *H. impetiginosus*, e é conhecido por ser o mais abundante composto quinona da família Bignoniaceae (THOMSON, 1971). Até o momento, estudos comprovam a sua atividade anti-câncer, analgésica, antioxidante, anti-metastática, anti-inflamatória e antimicrobiana (HUSSAIN *et al.*, 2007), quando associado ao bismuto (III), o lapachol também apresentou efeito anti-angiogênico. Além disso, alguns análogos de lapachol possuem dez vezes mais efeitos anticancerígenos do que o seu composto original (EPIFANO *et al.*, 2014).

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 PM: 242,27 g/mol), é um produto natural obtido de *H. impetiginosus*, e é um isômero do lapachol (CASTELLANOS; PRIETO; HEINRICH, 2009). Estudos demonstram sua ação antimicrobiana (MEDEIROS *et al.*, 2010), anti-inflamatória (MOON *et al.*, 2007) e anticancerígena (TERAI *et al.*, 2009). Foi relatado que a β -lapachona atua seletivamente nas células tumorais, induzindo a apoptose dessas sem matar as células normais (HUSSAIN & GREEN, 2017). Além disso, em terapia combinada com o taxol (base de fármacos antineoplásico), tem o seu efeito anticancerígeno potencializado, demonstrando atividade contra as células cancerígenas do ovário, próstata, pulmão, mama, cólon, melanoma e pâncreas (LI *et al.*, 1999).

4.3.3. Aspectos citotóxicos e genotóxicos

Resultados de eventos espontâneos, as mutações podem ser induzidas por agentes químicos, físicos ou biológicos que podem afetar processos vitais como a duplicação e a expressão gênica, bem como alterações cromossômicas, levando a processos cancerígenos e morte celular. Pelo fato de causarem lesões no material genético, essas substâncias são conhecidas como genotóxicas e/ou mutagênicas (LOURENÇO *et al.*, 2010). Os organismos vivos estão frequentemente expostos à substâncias mutagênicas, sendo que muitas delas podem ter origem natural, como por exemplo, os fitoterápicos. Considerando que muitos extratos e princípios ativos já descritos de plantas têm sido utilizados como agentes terapêuticos, há um interesse considerável em determinar os riscos que estes podem causar à saúde, levando ao aparecimento de doenças ou mesmo morte em animais e seres

humanos. Assim, a avaliação do potencial citotóxico e mutagênico são necessários para assegurar o uso relativamente seguro de plantas medicinais (SURH & FERGUSON, 2003). Por outro lado, o consumo destas plantas também pode suprimir, obstruir, ou inverter os processos envolvidos na mutagênese e, finalmente, na carcinogênese que estejam atuando sobre o organismo humano e/ou animal (SILVA *et al.*, 2004).

A citotoxicidade das quinonas leva à 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 & FISHER, 1990).

Sob ação enzimática, um substrato quinonoídico reduz-se com um elétron para formar o ânion semiquinona ($Q^{\bullet-}$), catalisada pelas enzimas flavinas NADPH citocromo P-450 redutase, NADPH citocromo b5 redutase ou NADPH ubiquinona oxidoreductase. A cinética desta redução depende de vários fatores, incluindo o potencial de redução da quinona. Uma vez formada a espécie semiquinona $Q^{\bullet-}$, esta reduz o oxigênio molecular ao ânion-radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que, na presença da enzima superóxido dismutase, é transformado em H_2O_2 . Este ânion-radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), por catálise com metais de transição (Reação de Fenton), gera HO^{\bullet} no interior da célula. Embora o H_2O_2 não seja um radical livre, é uma substância bastante reativa, podendo promover também a oxidação de algumas biomoléculas (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003). Foi observado que muitas quinonas possuem um grupo de saída que pode ser ativado por redução das carbonilas quinonoídicas, gerando intermediários alquilantes (agentes antineoplásicos biorredutores) (LIN *et al.*, 2001; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

As quinonas, também tem a capacidade de inibir o complexo das topoisomerases, através da indução do estresse oxidativo. Em sua ação natural, as topoisomerases assentam-se na estrutura do DNA por uma supertorção topológica, quando fazem cortes, permitindo que as funções de transcrição, reparo, replicação e estruturação do cromossomo ocorram normalmente. Após esta abertura, as células dividem-se seguindo uma série de etapas bem definidas (G1, G2 e M). Nas células cancerígenas não existem os pontos de checagem G1, G2 e M e isto evita a apoptose, mesmo tendo ocorrido um acúmulo de danos genéticos. Uma estratégia de combate às células cancerígenas seria o uso de substâncias que induzissem a formação de pontos de checagem artificiais no processo da divisão celular. Se assim ocorrer, haverá a indução da morte das células cancerígenas. Por se multiplicarem com rapidez, as células neoplásicas se tornam um alvo mais sensível a esses inibidores. Nestas condições, qualquer agente (ou inibidor) que afete nas neoplasias o complexo DNA-topoisomerase, poderia induzir este processo letal (BAMFORD; WALKINSHAW; BROWN, 2000; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Fitoterápico

O extrato hidroalcoólico da casca de *Handroanthus impetiginosus* (H.i.) foi obtido comercialmente e armazenado de acordo com as recomendações do fabricante (BioTae Ind. e Com.). Alíquotas (0,5 L) desse extrato foram submetidas ao processo de remoção de solvente por evaporação rotativa. O produto final foi transferido para um frasco de reação de 0,5 L e mantido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas a fim de avaliar o congelamento do produto final e a eficácia do processo de evaporação do solvente (BRASIL, 2010; BORIOLLO *et al.*, 2014ab, 2018). Em seguida, alíquotas (20 mL) do produto final foram transferidas para frascos de vidro tipo penicilina (50 mL), liofilizadas e suas massas secas foram medidas. O produto final liofilizado foi preparado em solvente aquoso (água tipo 1) em concentração de 1× (solução a 10%), esterilizado por filtração, e estocados em tubos estéreis de polipropileno (50 mL) a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de uso.

5.2. Análise qualitativa por Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa

O produto final de H.i. foi parcialmente dissolvido com etanol. As dispersões foram filtradas e analisadas por GC-MS usando as seguintes condições cromatográficas: (i) Amostra: volume injetado de 2,0 μL ; (ii) Coluna: HP-5MS, 5% difenil, 95% dimetil polisiloxano (30m \times 0,25mm \times 0,25 μm); (iii) Gás de arraste: He (99.9999) \rightarrow 1 mL/min; (iv) Injetor: 280 $^{\circ}\text{C}$, Split 1:1; (v) Forno: 50 $^{\circ}\text{C}$ (2 min) \rightarrow 250 $^{\circ}\text{C}$ (5 $^{\circ}\text{C}/1\text{ min}$); 250 $^{\circ}\text{C}$ (10 min); e (vi) Detector: Espectrofotômetro de Massas tipo Quadruple Linear, Fonte de Ionização (Impacto por Elétrons \rightarrow 70 eV), Modo Varredura (0,5 seg/scan), Faixa de Massas [33–500 Daltons (u)], Linha Transferência (280 $^{\circ}\text{C}$) e Filamento (ligado a 7,0 min). O banco de dados espectral de massa (NIST 11) foi usado para identificar compostos detectados nos cromatogramas.

5.3. Ensaio antimicrobianos

5.3.1. Leveduras

Foram utilizadas as cepas de referência e controle de qualidade: *C. albicans* ATCC® 90028, *C. albicans* ATCC® 10231, *C. albicans* ATCC® 2876, *C. albicans* CBS 562, *C. glabrata* ATCC® 5207, *C. glabrata* IZ 07, *C. rugosa* ATCC® 10571, *C. tropicalis* ATCC® 750, *C. guilliermondii* CBS 566, *C. krusei* CBS 573, *C. tropicalis* CBS 99, *C. lusitaniae* IZ 06 e *C. lusitaniae* IZ 12. Essas foram gentilmente cedidas

pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia, do Departamento de Diagnóstico Oral, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), e foram adequadamente armazenadas em sistemas de criogenia a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento de uso.

5.3.2. Bactérias

Foram utilizadas as cepas de referência e controle de qualidade: *Staphylococcus aureus* ATCC® 43300; *S. aureus* ATCC® 25923; *S. aureus* ATCC® 29213; *S. epidermidis* ATCC® 12228; *S. epidermidis* ATCC® 14990; *S. saprophyticus* ATCC® 15305; *E. coli* ATCC® 25922; *E. coli* ATCC® 35218; *Acinetobacter* sp. ATCC® 14293; *B. cereus* ATCC® 11778; *B. subtilis* ATCC® 23859; *P. mirabillis* ATCC® 25933; *S. marcescens* ATCC® 8100; *S. typhimurium* ATCC® 14028; *P. aeruginosa* ATCC® 25619 e *P. aeruginosa* ATCC® 27853. Essas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia, do Departamento de Diagnóstico Oral, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), e foram adequadamente armazenadas em sistemas de criogenia a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento de uso.

5.3.3. Teste de sensibilidade antifúngica

Espécies de *Candida* foram avaliadas quanto ao perfil de sensibilidade quantitativo frente ao H.i. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram investigadas pelo método de microdiluição em caldo (CLSI M27-A3, 2008; CLSI M27-S4, 2012). As concentrações testadas abrangeram àquelas dos pontos de corte dos antifúngicos padrões, bem como àquelas referente aos resultados para as cepas de referência e de controle de qualidade.

Os antifúngicos anfotericina B (Sigma chemical) e nistatina (Calbiochem) foram empregados como controles de qualidade e de referência, e parâmetros comparativos. Soluções padrão dos antifúngicos e de H.i. foram preparadas, esterilizadas por filtração e estocadas em tubos de polipropileno de 50 mL estéreis a uma temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 6 meses. Os testes foram conduzidos em sistemas triplicatas usando placas de microdiluição descartáveis e estéreis, com múltiplos poços, contendo 100 μL por poço de meio de cultura RPMI-1640 [RPMI-1640 1,04% m/v (com glutamina e vermelho fenol, sem bicarbonato: esterilização por filtração), 165 mM MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propano sulfônico; esterilização por filtração), glicose 2% m/v, pH 7,0 a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ajustado com 1 M NaOH)] adicionados dos produtos que foram testados em concentração de $2\times$ (concentrações finais de anfotericina B e nistatina: de 0,0625 até 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; concentrações finais de H.i.: de 0,25 até 128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou, alternativamente, 200 até 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Previamente aos ensaios, as leveduras foram cultivadas em Agar Sabouraud Dextrose (SDA) a 35 °C por 24 horas. Em seguida, um inóculo (alça de 10 µL) de cada amostra foi adicionado em 5 mL de solução salina estéril (145 mM NaCl) e ajustado a uma turbidez da escala 0.5 McFarland (1×10^6 a 5×10^6 UFC.mL⁻¹) ou equivalente a uma transmitância de 79,4 – 83,1% usando espectrofotômetro com comprimento de onda de 530 nm ($T = 79,4\%-83,1\% \rightarrow A_{530\text{ nm}} = 2 - \log_{10} \%T \rightarrow A_{530\text{ nm}} = 0,100-0,080$). Essa suspensão celular foi agitada em vórtex durante 15 segundos e diluída 1:50 em solução salina estéril (2×10^4 a 1×10^5 UFC.mL⁻¹), seguida de uma nova diluição 1:20 em meio líquido RPMI-1640 (1×10^3 a 5×10^3 UFC.mL⁻¹), a fim de se produzir o inóculo de trabalho [2×]. Durante os ensaios, alíquotas de 100 µL de cada inóculo de trabalho [2×] foram inseridas nos poços das placas de microdiluição, contendo 100 µL/poço de meio RPMI-1640 adicionados dos produtos que foram testados em concentração de 2× (anfotericina B, nistatina e *H. impetiginosus*), previamente preparadas conforme descrito acima: concentração final do inóculo igual a 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹. Então, essas placas de microdiluição foram incubadas a 35 °C por 48 horas.

Após o período de incubação, alíquotas de 70 µL de solução de cloreto de trifeniltetrazólio – TTC – (5 mg.mL⁻¹ de água tipo 1, esterilizada por filtração) foram assepticamente adicionadas aos poços daquelas placas e, novamente, incubadas a 35 °C por 24 horas.

A interpretação dos pontos de interrupção (*breakpoints*) foi realizada seguindo as diretrizes estabelecidas pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI M27-A3, 2008; CLSI M27-S4, 2012). A CIM foi definida como a menor concentração capaz de produzir uma diminuição proeminente do crescimento fúngico (inibição $\geq 90\%$) quando comparada com os controles de crescimentos. As cepas de *Candida albicans* (Robin) Berkhout (ATCC® 90028™) — *Reference Strain* — foi empregada no ensaio como Cepas de Referência e de Controle de Qualidade.

5.3.3.1. Concentração fungicida mínima (CFM)

A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada conforme as modificações propostas por Cantón *et al.* (2003). Para cada cepa de levedura, alíquotas (200 µL) do volume total do poço correspondente a CIM foram homogeneizadas com o auxílio de uma pipeta e cultivadas em placas de Petri contendo meio CHROMagar Candida® (100 µL/placa). Cada alíquota foi depositada gentilmente em um determinado ponto sobre o meio de cultura e mantida a temperatura ambiente para a sua completa absorção. Então, a placa foi estriada (*streaked*), a fim de separar as leveduras e removê-las das fontes de droga (*H. impetiginosus*) (MOORE; WALLS; DENNING, 2001), e incubada a 35 °C por 48 horas. A CFM (atividade fungicida) foi a menor concentração da droga (extrato) capaz de eliminar $\geq 99,9\%$ do

inóculo final (0,05 - 0,25 colônia), ao passo que a atividade fungistática foi definida a partir da redução de $\leq 99,9\%$ do inóculo final. A cepa de *C. albicans* ATCC® 90028 foi empregada no ensaio como Cepas de Referência e de Controle de Qualidade (CANTÓN *et al.*, 2003; MARCOS-ARIAS *et al.*, 2009).

5.3.4. Teste de sensibilidade antibacteriana

A concentração inibitória mínima (CIM) de H.i. contra cepas bacterianas foi determinada pelo método de microdiluição em caldo (CLSI M07-A9, 2012; CLSI M27-A3, 2008; CLSI M27-S4, 2012), com algumas adaptações (SILVA *et al.*, 2014). As concentrações testadas compreenderam o intervalo entre (200 – 0,097 mg.mL⁻¹), sendo (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,097 mg.mL⁻¹). Estes testes foram realizados em sistemas de ensaio em triplicata, utilizando placas de microdiluição com múltiplos poços, contendo 50 µL de caldo MH estéril, pH 7,2 a 7,4. A cepa *S. aureus* ATCC® 25923 e o antibiótico oxacilina (Sigma chemical) foram empregados como controle de qualidade e de referência, e parâmetros comparativos.

Previamente aos ensaios:

(i) Soluções padrão do extrato liofilizado (concentração de 20x) foram diluídos em meio de cultura Mueller Hinton. Assim, alíquotas de 50 µL dessas diluições foram aplicadas nos primeiros poços de cada fileira das placas de microdiluição contendo meio de cultura líquido MH (50 µL), de acordo com os procedimentos de diluições seriadas (2x), para criar diferentes concentrações dos extratos a ser testado;

(ii) As bactérias foram cultivadas em ágar BHI, a 35 °C por 24 h. Em seguida, um inóculo de 10 µL de cada amostra microbiana foi ressuspenso em 5 mL de solução salina estéril (NaCl 145 mM) e ajustado para uma turbidez de 0,5 na escala McFarland (bactérias: 1 ± 10^8 UFC.mL⁻¹) ou equivalente a uma transmitância de 79,5-83,2% utilizando um espectrofotômetro com um comprimento de onda de 625 nm. A suspensão de células bacterianas foi agitada em vórtex durante 15 segundos e diluída em uma proporção de 1:10 em solução salina esterilizada (1×10^7 UFC.mL⁻¹). Durante os ensaios, alíquotas de 5 µL de cada inóculo de trabalho (5% do volume do poço) foram colocadas nos poços de microdiluição, contendo 100 µL/poço de meio de cultura líquido e diferentes concentrações dos produtos a serem testados (H.i.). A concentração final do inóculo bacteriano foi igual a 5×10^5 UFC.mL⁻¹.

Posteriormente, as placas de microdiluição foram incubadas a 35 °C por 24 h. Logo após o período de incubação, alíquotas de 30 µL de solução de resazurina (Sigma-Aldrich), previamente preparadas em 0,02% (m/v) em água Tipo 1, esterilizada por filtração e armazenada a 4 °C, foram adicionadas a cada poço e as placas foram reincubadas durante a noite. A interpretação dos resultados foi feita através da leitura visual das placas teste. Uma mudança na cor de azul para rosa indicou

crescimento microbiano. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato que impediu essa alteração de cor (MARTIN *et al.*, 2003).

5.3.4.1. Concentração bactericida mínima

A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada de acordo com as modificações propostas por Cantón *et al.* (2003). Para cada cepa microbiana, alíquotas de 50 µL do volume total do poço correspondente à CIM foram homogeneizadas com pipeta e cultivadas em placas de Petri contendo ágar BHI.

Cada alíquota foi depositada suavemente em um determinado ponto do meio de cultura e mantida à temperatura ambiente para completa absorção. Portanto, a placa foi semeada para separar microrganismos e removê-los de fontes de drogas (H.i.) (MOORE; WALLS; DENNING, 2001) e incubados a 35 °C por 48 h. A CBM foi a menor concentração do fármaco (extrato) capaz de eliminar ≥99,9% do inóculo final (0,05 – 0,25 colônia), enquanto a atividade bacteriostática foi definida a partir da redução de ≤99,9% do inóculo final (CANTÓN *et al.*, 2003; MARCOS-ARIAS *et al.*, 2009).

5.4. Ensaio citotóxicos e mutagênicos

5.4.1. Citotoxicidade *in vitro* – atividade antiproliferativa (*HaCat cells*)

As células (*HaCat*) foram incubadas (concentração entre 3×10^4 e 6.5×10^4 células.mL⁻¹) em placas de microdiluição estéreis, descartáveis, com múltiplos poços, contendo 100 µL meio de cultura RPMI-1640 por poço suplementado com soro fetal bovino, a 37 °C por 24 horas em uma atmosfera de 5% de CO₂ (FEIRIA *et al.*, 2016).

Logo após a incubação, volumes de RPMI-1640 (~100 µL) foram cuidadosamente aspirados dos poços e, então, 100 µL de RPMI-1640 + H.i. (concentrações variadas dependente da CIM) foram inseridos nos mesmos. Então, essas placas de culturas foram incubadas a 37 °C por 24 horas em uma atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, essas culturas foram fixadas em solução de ácido tricloroacético a 10% por 1 hora a 4 °C, lavadas 4× com água tipo 1, e secas completamente à temperatura ambiente. Culturas celulares foram coradas com 50 µL de sulforodamina B a 0,4% em ácido acético a 1% por 1 hora a 4 °C, lavadas 4× em ácido acético a 1% e secas completamente à temperatura ambiente. O corante SRB associado com as proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL de solução de 10 µM Trizma Base pH 10,5 (Sigma). Essas placas foram analisadas em espectrofotômetro com

comprimento de onda de 540 nm. Esse teste foi realizado em sistemas de ensaios triplicatas (FEIRIA *et al.*, 2016).

A interpretação dos resultados foi realizada com base nos valores médios de densidade óptica ($A_{540\text{ nm}}$), expressos em termos percentuais de viabilidade celular relativa em relação ao controle de crescimento celular (100%). As concentrações de H.i. capazes de causar 50% e 100% de lise ou morte celular (índices de citotoxicidade: IC_{50} e IC_{100}) foram calculadas por meio da análise de regressão (FEIRIA *et al.*, 2016).

5.5. Ensaio de *DNA Nicking*

5.5.1. Grupos experimentais

O ensaio *DNA Nicking* foi conduzido conforme protocolo descrito por Leba *et al.* (2014), com algumas adaptações.

Para o ensaio genotóxico ou pró-oxidante, alíquotas de 4 μL de cada concentração da solução de H.i. foram misturadas com 0,5 μL de DNA plasmidial (pBR322 Plasmid DNA – Sigma), 4 μL de 50 mM H_2PO_4 pH 7,4 e água tipo 1 (q.s.p. 24 μL).

Para o ensaio antioxidante genômico, alíquotas de 4 μL de cada concentração da solução de H.i. foram misturadas com 0,5 μL de DNA plasmidial pBR322, 4 μL de 50 mM H_2PO_4 pH 7,4, 4 μL de 3,75 mM EDTA- Na_2 , 4 μL de 2 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 μL de 30 mM H_2O_2 (Solução 30 % em H_2O), e água tipo 1 (q.s.p. 24 μL).

A qualidade dos ensaios genotóxico ou pró-oxidante e antioxidante genômico também foram assegurados empregando os seguintes sistemas controles:

- Controle de integridade do DNA plasmidial (C1): 0,5 μL de DNA plasmidial pBR322, 4 μL de 50 mM H_2PO_4 pH 7,4 e água tipo 1 (q.s.p. 24 μL). Forma esperada: *Form I* — *supercoiled double stranded DNA*.
- Controle de integridade do DNA plasmidial na presença do solvente (C2): 0,5 μL de DNA plasmidial pBR322, 4 μL de 50 mM H_2PO_4 pH 7,4, 4 μL de DMSO (15%) e água tipo 1 (q.s.p. 24 μL). Forma esperada: *Form I* — *supercoiled double stranded DNA*.
- Controle de integridade do DNA plasmidial na presença do antioxidante (C3): 0,5 μL de DNA plasmidial pBR322, 4 μL de 50 mM H_2PO_4 pH 7,4, 4 μL de 39,9 μM TROLOX (0,01g.L de DMSO 1% em água tipo 1) e água tipo 1 (q.s.p. 24 μL). Forma esperada: *Form I* — *supercoiled double stranded DNA*.
- Controle pró-oxidante do DNA plasmidial (C4) – reação de Fenton: 0,5 μL de DNA plasmidial pBR322, 4 μL de 50 mM H_2PO_4 pH 7,4, 4 μL de 3,75 mM EDTA- Na_2 , 4 μL de 2 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 μL de 30

mM H₂O₂ e água tipo 1 (q.s.p. 24 µL). Formas esperadas: *Form II* — *open circular DNA* e *Form III* — *nicked linear DNA*.

- Controle antioxidante 1 do DNA plasmidial (C5): 0,5 µL de DNA plasmidial pBR322, 4 µL de 50 mM H₂PO₄ pH 7,4, 4 µL de 3,75 mM EDTA-Na₂, 4 µL de 2 mM FeSO₄ • 7H₂O, 4 µL de 30 mM H₂O₂, 4 µL de 39,9 µM TROLOX e água tipo 1 (q.s.p. 24 µL). Forma esperada: *Form I* — *supercoiled double stranded DNA*.

- Controle antioxidante 2 do DNA plasmidial (C6): 0,5 µL de DNA plasmidial pBR322, 4 µL de 50 mM H₂PO₄ pH 7,4, 4 µL de 3,75 mM EDTA-Na₂, 4 µL de 2 mM FeSO₄ • 7H₂O, 4 µL de 30 mM H₂O₂, 4 µL de DMSO (15%) e água tipo 1 (q.s.p. 24 µL). Forma esperada: *Form I* — *supercoiled double stranded DNA*.

Todas as misturas produzidas no ensaio foram preparadas em tubos eppendorf de 1,5 ml, centrifugadas 1.500 × *g* por 15 segundos a -4 °C, e incubadas a 37 °C por 20 min, sob agitação de 150 r.p.m.

5.5.2. Eletroforese em gel de agarose e fotodocumentação

Logo após o período de incubação, os produtos foram misturados com 3 µL de 6X DNA Loading Dye, contendo SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain, e separados em gel de agarose a 1% (m/v), previamente preparado com 0,5× de solução tampão TBE (5× TBE: 445 mM Tris-base, 445 mM boric acid e 10 mM EDTA). A eletroforese foi conduzida em sistema horizontal e contínuo contendo 0,5× TBE. Alíquotas de 20 µL de cada produto foram aplicadas ao gel e submetidas a uma voltagem de 1,5 volts/cm por 2 horas. Após os procedimentos eletroforéticos, o gel foi visualizado em transiluminador UV e fotodocumentado.

5.5.3. Análises das formas pBR322

A fim de qualificar a capacidade genotóxica ou pró-oxidante e antioxidante genômica *in vitro* de *H. impetiginosus*, as bandas de DNA plasmidial pBR322 foram analisadas quanto aos formatos I, II e III, correspondentes ao DNA dupla fita super helicoidal (*Form I* — *supercoiled double stranded DNA*), DNA circular aberto (*Form II* — *open circular DNA*) e DNA linear nicado (*Form III* — *nicked linear DNA*), respectivamente, bem como a intensidade de luz visualmente produzida por cada banda de DNA [intensidade equivalente aos controles ou ***; intensidade abaixo dos controles ou ** (leve degradação genômica); intensidade muito abaixo dos controles ou * (degradação genômica intensa)].

5.6. Ensaio do Micronúcleo

5.6.1. Sistema – teste *in vivo*

Camundongos heterogênicos *Swiss albinus* (Unib:SW) adultos jovens (entre 6 e 10 semanas – período púbere), machos e fêmeas, com massa corporal entre 30 g e 40 g (i.e., a variação de peso entre os animais, para cada sexo, não deverá exceder a $\pm 20\%$ da massa média) e saudáveis, provenientes do Biotério da Universidade José do Rosário Vellano foram utilizados no teste do micronúcleo em eritrócitos da medula óssea (BORIOLLO *et al.*, 2014ab, 2018; OECD, 2016).

Os animais foram mantidos em grupos do mesmo sexo, em caixas de polipropileno, em ambiente climatizado a $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar igual a 50-60%, e em ciclos de luminosidade de 12 horas (12 horas claro/12 horas escuro). Esses animais foram tratados com ração comercial Labina Purina® e água *ad libitum*, e aclimatados às condições do biotério por 7 dias (período de triagem) antes da realização do experimento. Ao final do período de triagem, a massa corpórea de cada animal foi mensurada e, de acordo com a massa, eles receberam 1 mL do líquido indicado para cada 100g de massa corporal (controle negativo, controles positivos e extrato vegetal). Após o tratamento experimental, os animais foram eutanasiados por asfixia com CO₂ em câmara de acrílico adaptada (BORIOLLO *et al.*, 2014ab, 2018; OECD, 2016). Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais (Protocolo no. 26A/2018).

5.6.2. Grupos experimentais

Grupos de animais (consistindo em 5 machos e 5 fêmeas) foram tratados utilizando um regime de dosagem único administrado por gavagem (controle negativo e H.i.) ou intraperitoneal (ciclofosfamida – CP, e cloridrato de doxorubicina – DXR) e dois tempos de eutanásia (24 e 48 h) (BORIOLLO *et al.*, 2014ab, 2018; OECD, 2016):

- Grupos controle: 150 mM NaCl (controle negativo), 40 mg.kg de CP (controle positivo) (OECD, 2016) e 5 mg.kg de DXR (BORIOLLO *et al.*, 2014ab, 2018; VENKATESH *et al.*, 2007);
- Teste de genotoxicidade (extrato vegetal): 500; 1,000; 1,500 e 2,000 mg.kg de H.i. A dose máxima tolerada (DMT) do extrato foi definida como a maior dose tolerada sem evidência de toxicidade limitante ao estudo, referente ao período experimental (p.ex., redução de massa corpórea ou citotoxicidade sistêmica hematopoiética, porém sem morte ou evidência de dor, sofrimento ou angústia necessitando de eutanásia), ou 2.000 mg.kg/massa corpórea/dia (<14 dias) (BORIOLLO *et al.*, 2014ab, 2018; OECD, 2016).

- Teste de antigenotoxicidade: 500 mg.kg de H.i. + 5 mg.kg de DXR (BORIOLLO *et al.*, 2014ab, 2018; VENKATESH *et al.*, 2007).

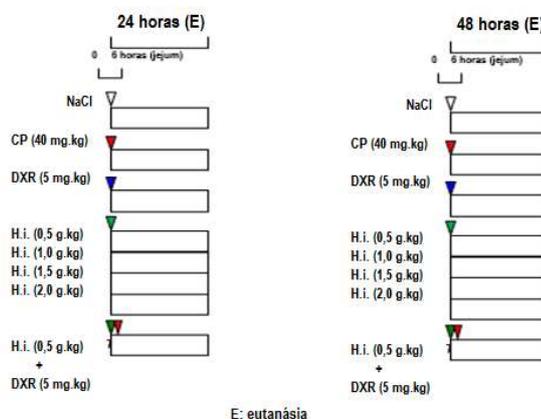


Figura 1: Tratamentos do Ensaio do Micronúcleo.

5.6.3. Processamento de medula óssea e análise de células

Logo após a eutanásia, os fêmures foram removidos de forma asséptica através de cirurgia, os animais e a maravalha utilizada foram apropriadamente descartados. Os dois fêmures de cada animal foram seccionados na extremidade proximal e o conteúdo do canal medular foi lavado com 3,0 mL de solução de NaCl (150 mM) e transferido para um tubo de centrifuga de 15 mL (BORIOLLO *et al.*, 2014ab, 2018; OECD, 2016).

Esse material foi ressuscitado com o auxílio de uma pipeta Pasteur a fim de assegurar uma distribuição ao acaso das células da medula óssea. Então, a suspensão foi centrifugada a 1.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante foi ressuscitado em 500 μ L de solução de 150 mM NaCl adicionado de formaldeído a 4%. As lâminas foram preparadas por meio de esfregaço (2 lâminas por animal), secas a temperatura ambiente por 24 horas, e coradas em cuba de coloração contendo corante de Leishman eosina-azul de metileno [corante puro por 3 min, seguido pelo corante diluído em água destilada (1:6) por 15 min], a fim de diferenciar eritrócitos policromáticos (PCE) de eritrócitos normocromáticos (NCE).

Os PCEs foram observados em aumento de 1.000 \times empregando-se microscopia óptica, contados (no mínimo 4.000 PCEs) com o auxílio de um contador de células digital, e fotografados. O número de PCEs e NCEs e o número e a frequência de PCEs micronucleados foram relatados. A fim de avaliar a toxicidade da medula óssea, a razão entre PCEs e NCEs também foi observada (BORIOLLO *et al.*, 2014ab, 2018; OECD, 2016).

5.6.4. Análise estatística

Os dados obtidos no ensaio do micronúcleo foram submetidos à análise da variância *one-way* (ANOVA), em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial $8 \times 2 \times 2$ (tratamento \times sexo \times tempo), e comparação de médias por meio do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) empregando o sistema computacional SAS® versão 9.2.

6. RESULTADOS

6.1. Análise qualitativa por Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa

Perfis cromatográficos e espectros de massa de H.i. foram resumidos (Tabela 2 e Figura 2).

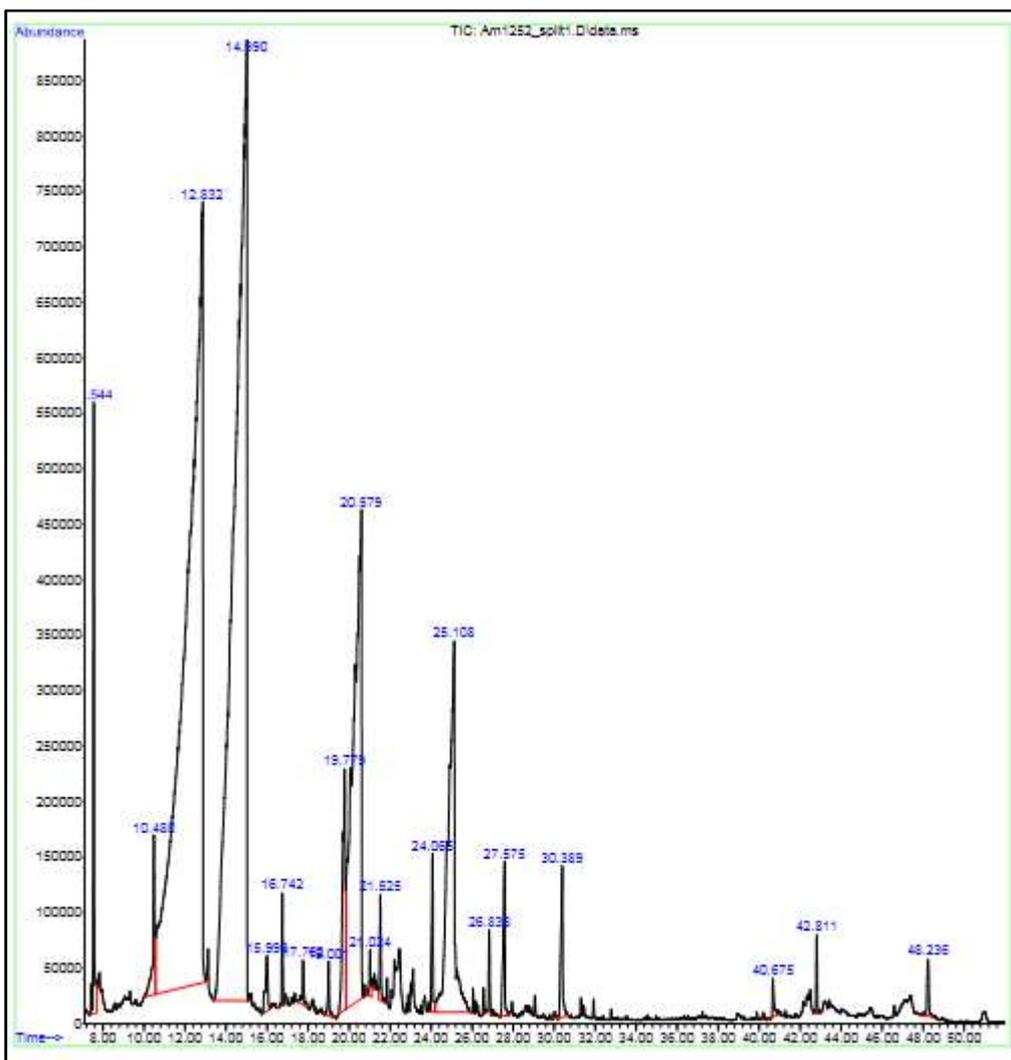


Figura 2. Triagem fitoquímica (análise qualitativa) de H.i. por GC-MS.

Tabela 2. Triagem fitoquímica (análise qualitativa) de H.i. por GC-MS.

Pico ¹	t _R ²	Nome do composto ³	%A ⁴	Qualidade ⁵
1	0.544	Phenol	1.59	94
2	10.480	Phenol, 2-methoxy-	0.87	93
3	12.832	Sorbic Acid	37.27	98
4	14.990	Benzoic acid	34.56	96
5	15.993	Benzenemethanol, 4-methoxy-	0.42	97
6	16.742	2-Methoxy-4-vinylphenol	0.32	95
6	16.742	3-Methoxyacetophenone	0.32	72
7	17.76	Phenol, 2,6-dimethoxy-	0.23	97
8	19.00	Benzaldehyde, 3-hydroxy-4-methoxy-	0.22	96
8	19.00	Vanillin	0.22	96
9	19.779	Phenol, 3,4-dimethoxy-	1.86	94
9	19.779	Benzoic acid, 4-methoxy-	1.86	60
10	20.579	Benzoic acid, 4-methoxy-	11.68	97
11	21.024	Benzaldehyde, 3,4-dimethoxy-	0.16	96
12	21.525	Benzenemethanol, 3,4-dimethoxy-	0.35	98
13	24.065	Phenol, 3,4,5-trimethoxy-	0.66	94
13	24.065	3,4-Dimethoxy-6-methylpyrocatechol	0.66	52
14	25.108	Benzoic acid, 3,4-dimethoxy-	7.21	96
14	25.108	3,4-Dimethoxy-5-hydroxybenzaldehyde	7.21	59
15	26.838	4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol	0.26	94
15	26.838	4-Methylphenylthio)acetone	0.26	46
15	26.838	5-(Acetylaminoethyl)-4-amino-2-methylpyrimidine	0.26	43
16	27.575	Benzoic acid, 3,4,5-trimethoxy-	0.79	99
17	30.389	1 3,4-Dimethoxycinnamic acid	0.84	98
17	30.389	2-Propenoic acid, 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-, (E)-	0.84	98
18	40.675	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester	0.17	87
18	40.675	Glycerol 1-palmitate	0.17	46
18	40.675	Dodecanedioic acid	0.17	38
19	42.811	4-Methoxy-4',5'-methylenedioxybiphenyl-2-carboxylic acid	0.23	80
19	42.811	6-Methoxy-8-nitro-4-trifluoromethylquinoline	0.23	72
19	42.811	9,10-Anthracenedione, 1,2,5,8- tetrahydroxy-	0.23	64
20	48.236	Benzaldehyde, 2,4-dihydroxy-	0.31	53

¹Pico na ordem de eluição da coluna. ²Tempo de retenção do composto na coluna (minutos). ³O nome mais comum do composto identificado. ⁴Percentagem da área normalizada que indica a distribuição relativa dos compostos na amostra. ⁵Índice de pesquisa no banco de dados que reflete a similaridade do espectro de massa obtido com os registros nas bibliotecas utilizadas. Índices de qualidade > 70 foram adotados.

6.2. Ensaio antimicrobianos

6.2.1. Sensibilidade antifúngica

Os testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro* foram determinados contra H.i., utilizando as cepas de referência (*C. albicans* ATCC® 90028, *C. albicans* ATCC® 10231, *C. albicans* ATCC® 2876, *C. albicans* CBS 562, *C. glabrata* ATCC® 5207, *C. glabrata* IZ 07, *C. rugosa* ATCC® 10571, *C. tropicalis* ATCC® 750, *C. guilliermondii* CBS 566, *C. krusei* CBS 573, *C. tropicalis* CBS 99, *C. lusitanae* IZ 06 e *C. lusitanae* IZ 12).

A concentração inibitória mínima (CIM) revelou valores de sensibilidade entre 100 e 0,1953 mg.mL⁻¹. Nas concentrações testadas (200 – 0,097 mg.mL⁻¹), o extrato liofilizado não apresentou efeito inibitório para as cepas (*C. albicans* ATCC® 10231, *C. albicans* CBS 562 e *C. lusitanae* IZ 06). A cepa (*C. albicans* ATCC® 2876) apresentou CIM de 100 mg.mL⁻¹. Neste ensaio, o CIM mais baixo – 0,1953 mg.mL⁻¹ – foi observado para a cepa (*C. rugosa* ATCC® 10571). Valores intermediários foram encontrados para as demais cepas, sendo CIM de 50 mg.mL⁻¹ para (*C. glabrata* ATCC® 5207, *C. glabrata* IZ 07 e *C. tropicalis* CBS 99), CIM de 25 mg.mL⁻¹ para (*C. lusitanae* IZ 12 e *C. tropicalis* ATCC® 750), CIM de 12,5 mg.mL⁻¹ para (*C. guilliermondii* CBS 566), CIM de 0,7812 mg.mL⁻¹ (*C. krusei* CBS 573), e CIM de 0,3906 mg.mL⁻¹ para (*C. albicans* ATCC® 90028) (Tabela 3). De acordo com as concentrações testadas, o H.i. apresentou atividade fungistática para todas as cepas testadas (exceto: *C. albicans* ATCC® 10231, *C. albicans* CBS 562 e *C. lusitanae* IZ 06).

Tabela 3: Concentração inibitória mínima - Leveduras

Amostragem	100 mg.mL ⁻¹	50 mg.mL ⁻¹	25 mg.mL ⁻¹	12,5 mg.mL ⁻¹	0,78 mg.mL ⁻¹	0,39 mg.mL ⁻¹	0,19 mg.mL ⁻¹
<i>C. albicans</i> ATCC® 2876	+						
<i>C. glabrata</i> ATCC® 5207		+					
<i>C. glabrata</i> IZ 07		+					
<i>C. tropicalis</i> CBS 99		+					
<i>C. lusitanae</i> IZ 12			+				
<i>C. tropicalis</i> ATCC® 750			+				
<i>C. guilliermondii</i> CBS 566				+			
<i>C. krusei</i> CBS 573					+		
<i>C. albicans</i> ATCC® 90028						+	
<i>C. rugosa</i> ATCC® 10571							+

As amostras *C. albicans* ATCC® 10231, *C. albicans* CBS 562 e *C. lusitanae* IZ 06, cresceram em todas as concentrações testadas.

6.2.2. Sensibilidade antibacteriana

O perfil de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* das cepas de referência (*S. aureus* ATCC® 43300; *S. aureus* ATCC® 25923, *S. aureus* ATCC® 29213, *S. epidermidis* ATCC® 12228; *S. epidermidis* ATCC® 14990; *S. saprophyticus* ATCC® 15305; *E. coli* ATCC® 25922; *E. coli* ATCC® 35218; *Acinetobacter* sp. ATCC® 14293; *B. cereus* ATCC® 11778; *B. subtilis* ATCC® 23859; *P. mirabilis* ATCC® 25933; *S. marcescens* ATCC® 8100; *S. typhimurium* ATCC® 14028; *P. aeruginosa* ATCC® 25619 e *P. aeruginosa* ATCC® 27853) foi determinado contra o extrato liofilizado da casca de *H. impetiginosus*.

A concentração inibitória mínima (CIM) revelou valores de sensibilidade entre 50 e 12,5 mg.mL⁻¹. Nas concentrações testadas (200 – 0,097 mg.mL⁻¹), as cepas (*Acinetobacter* sp. ATCC® 14293 e *P. aeruginosa* ATCC® 25619) apresentaram CIM de 50 mg.mL⁻¹; as cepas (*S. aureus* ATCC® 25923; *S. aureus* ATCC® 29213; *E. coli* ATCC® 25922; *E. coli* ATCC® 35218; *B. cereus* ATCC® 11778; *B. subtilis* ATCC® 23859; *P. mirabilis* ATCC® 25933; *S. marcescens* ATCC® 8100; *S. typhimurium* ATCC® 14028 e *P. aeruginosa* ATCC® 27853) apresentaram CIM de 25 mg.mL⁻¹, e as menores CIM foram encontradas para as cepas (*S. epidermidis* ATCC® 12228; *S. epidermidis* ATCC® 14990 e *S. aureus* ATCC® 43300), com CIM de 12,5 mg.mL⁻¹ (**Tabela 4**). De acordo com as concentrações testadas, o H.i. apresentou atividade bacteriostática para todas as cepas utilizadas.

Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima - Bactérias

Amostragem	50 mg.mL ⁻¹	25 mg.mL ⁻¹	12,5 mg.mL ⁻¹
<i>Acinetobacter</i> sp. ATCC® 14293	+		
<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 25619	+		
<i>E. coli</i> ATCC® 25922		+	
<i>E. coli</i> ATCC® 35218		+	
<i>B. cereus</i> ATCC® 11778		+	
<i>B. subtilis</i> ATCC® 23859		+	
<i>P. mirabilis</i> ATCC® 25933		+	
<i>S. marcescens</i> ATCC® 8100		+	
<i>S. typhimurium</i> ATCC® 14028		+	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853		+	
<i>S. aureus</i> ATCC® 25923		+	
<i>S. aureus</i> ATCC® 29213		+	
<i>S. aureus</i> ATCC® 43300			+
<i>S. epidermidis</i> ATCC® 12228			+
<i>S. epidermidis</i> ATCC® 14990			+

6.3. Ensaio citotóxicos e mutagênico

6.3.1. Citotoxicidade *in vitro* – atividade antiproliferativa (*HaCat cells*)

O efeito de H.i. sobre a viabilidade de células *HaCat* são apresentados na **Figura 3**. Até a concentração de 0,78 mg.mL⁻¹ o H.i. não foi citotóxico. No entanto, na concentração de 1,56 mg.mL⁻¹ o extrato inviabilizou 50 % das células, sendo definido como IC50. As maiores reduções da viabilidade

celular ocorreram a partir de ($\geq 3,12 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), sugerindo dessa forma, um efeito citotóxico dose-dependente.

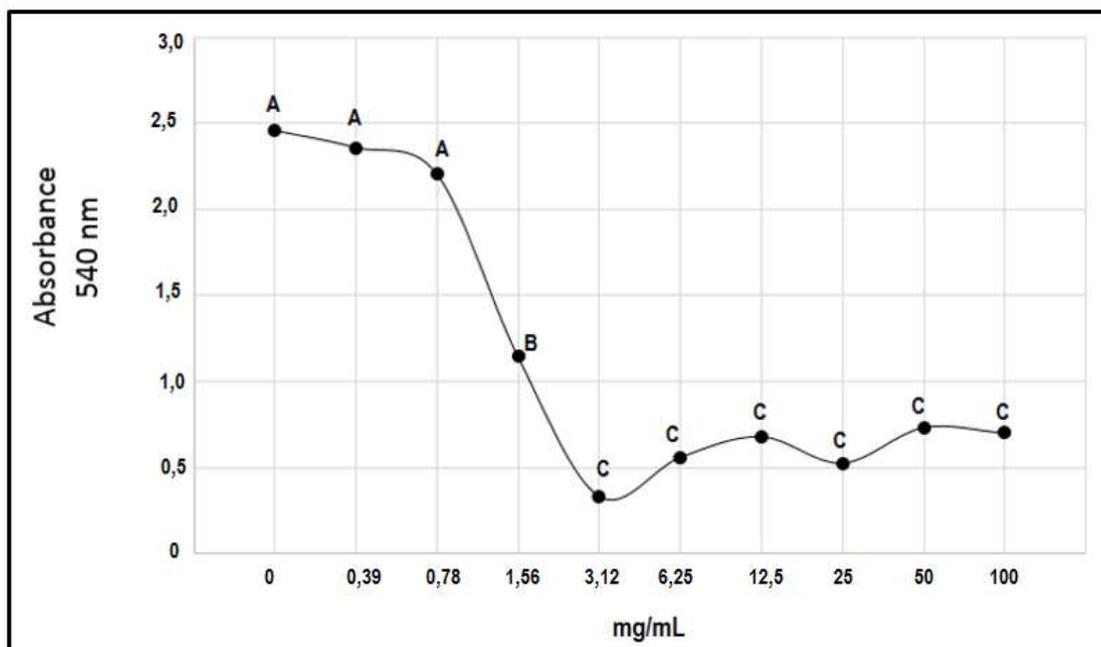


Figura 3. Atividade antiproliferativa (*HaCat cells*).

6.3.2. Ensaio *DNA Nicking*

No ensaio antioxidante genômico, as concentrações mais altas ($5.000 - 3.600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de H.i. não protegeram o DNA dos danos causados pela Reação de Fenton, gerando a forma III (DNA nicado). Em concentrações menores ($1.000 - 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), o H.i. protegeu parcialmente o DNA, resultando nas formas I e II (DNA superenrolado e DNA desenrolado, respectivamente).

No ensaio genotóxico, o H.i. foi pró-oxidante em sua maior concentração ($5.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), gerando a forma III (DNA nicado), no entanto, nas concentrações ($3.160 - 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) não causou qualquer efeito pró-oxidante, resultando na forma I (DNA superenrolado).

A intensidade das bandas do DNA permaneceu íntegra (***) em ambos os ensaios, independentemente das concentrações testadas ($5.000 - 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (**Figura 4**).

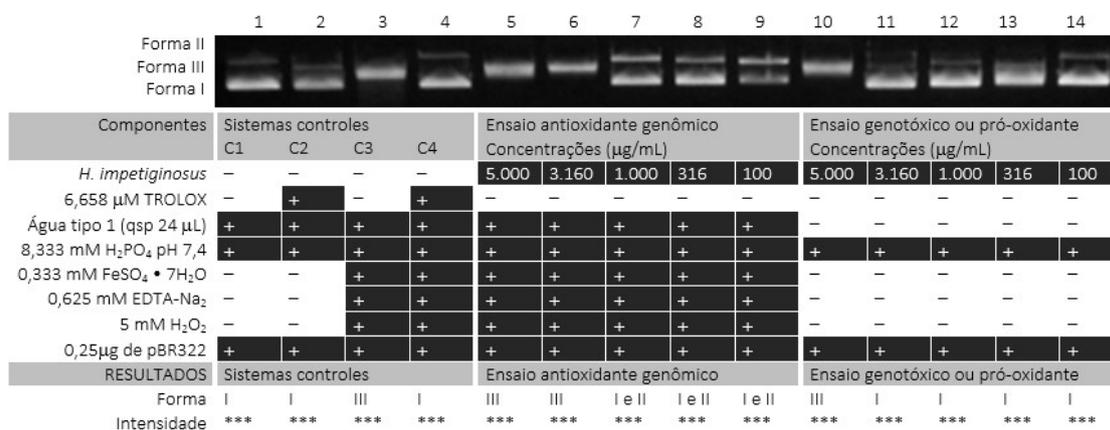


Figura 4. Perfil eletroforético do DNA plasmidial pBR322 após ensaios genotóxico ou pró-oxidante e antioxidante genômico de H.i.

Bandas de DNA plasmidial coradas SYBR™ Gold em gel de agarose a 1%. Lane 1: Controle de integridade do DNA plasmidial pBR322 (C1); Lane 2: Controle de integridade do DNA plasmidial na presença do antioxidante TROLOX (C2); Lane 3: Controle pró-oxidante do DNA plasmidial (C3) – reação de Fenton; Lane 4: Controle antioxidante (TROLOX) do DNA plasmidial (C4); Lane 5: Ensaio antioxidante genômico de H.i. (5.000 µg.mL⁻¹); Lane 6: Ensaio antioxidante genômico de H.i. (3.160 µg.mL⁻¹); Lane 7: Ensaio antioxidante genômico de H.i. (1.000 µg.mL⁻¹); Lane 8: Ensaio antioxidante genômico de H.i. (316 µg.mL⁻¹); Lane 9: Ensaio antioxidante genômico de H.i. (100 µg.mL⁻¹); Lane 10: Ensaio genotóxico ou pró-oxidante de H.i. (5.000 µg. µg.mL⁻¹); Lane 11: Ensaio genotóxico ou pró-oxidante de H.i. (3.160 µg.mL⁻¹); Lane 12: Ensaio genotóxico ou pró-oxidante de H.i. (1.000 µg.mL⁻¹); Lane 13: Ensaio genotóxico ou pró-oxidante de H.i. (316 µg.mL⁻¹); Lane 14: Ensaio genotóxico ou pró-oxidante de H.i. (100 µg.mL⁻¹). Forma I (DNA dupla fita superenrolado); Forma II (DNA circular aberto); Forma III (DNA linear nicado). *** intensidade de banda de DNA equivalente aos controles; ** intensidade abaixo dos controles (leve degradação genômica); * intensidade muito abaixo dos controles (degradação genômica intensa).

6.3.3. Ensaio do Micronúcleo

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 H.i. – ensaio genotóxico, – e para cada um dos grupos tratados com fitoterápicos e agente quimioterápico DXR (H.i. + DXR) – ensaios antígenotóxicos – bem como os grupos controle.

Para os grupos de animais tratados com H.i., a análise dos MNPCEs não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todas as doses de tratamento (0,5 – 2,0 g.kg⁻¹) e controle negativo (NaCl). Estes resultados sugerem ausência de genotoxicidade de H.i., independentemente da dose de administração (0,5 – 2,0 g.kg⁻¹), tempo de tratamento (24 e 48 h) ou o sexo do animal (macho e fêmea). Camundongos experimentalmente tratados com 5 mg.kg⁻¹ de DXR induziu MNPCE após tratamento de 24 e 48 horas, para ambos os sexos, cujas frequências MNPCE foram significativamente superiores (p

< 0,05) aos observados no controle positivo CP (40 mg.kg⁻¹). No entanto, observou-se a redução em MNPCE ($p < 0,05$) quando o H.i. (0,5 g.kg⁻¹) foi administrado em combinação com o agente quimioterápico DXR (5 mg.kg⁻¹), sugerindo efeitos antígenotóxicos (anticlastogênico e/ou antianeugênico). Portanto, H.i. fornece uma proteção contra os efeitos genotóxicos induzidos por DXR na medula óssea de camundongos, independentemente do tempo de tratamento (24 e 48 h) ou o sexo do animal (**Figura 5**).

A análise obtida a partir da razão PCE/NCE não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o quimioterápico DXR (5 mg.kg⁻¹) e todas as doses de H.i. (0,5 – 2,0 g.kg⁻¹) ou controle negativo (NaCl), mas houve diferença significativa entre todas as doses de H.i. (0,5 – 2,0 g.kg⁻¹) e controle negativo (NaCl), assim como existem diferenças significativas entre o controle positivo CP (40 mg.kg⁻¹) e todos ensaios. Portanto, estes resultados sugerem que há moderada toxicidade sistêmica de H.i. nas condições de estudo do ensaio MN, independentemente das doses terapêuticas, mas tempo e sexo-dependente. Curiosamente, a proporção PCE/NCE observada no tratamento em associação de H.i. (0,5 g.kg⁻¹) e DXR (5 mg.kg⁻¹) – ensaios antígenotóxicos – não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) com o controle negativo. Estes resultados sugerem que o H.i. associado com DXR pode reduzir ou cancelar qualquer efeito tóxico induzido pelo H.i. ou DXR na medula óssea de camundongos, tempo e sexo dependente. No entanto, efeitos potencialmente antígenotóxicos (quimioterápico + fitoterápico) associados à ausência de toxicidade sistêmica de H.i. poderiam ser explorados a partir de dosagens > 0,5 g.kg⁻¹, ou então, a partir da identificação, purificação e exploração de seus compostos fitoquímicos.

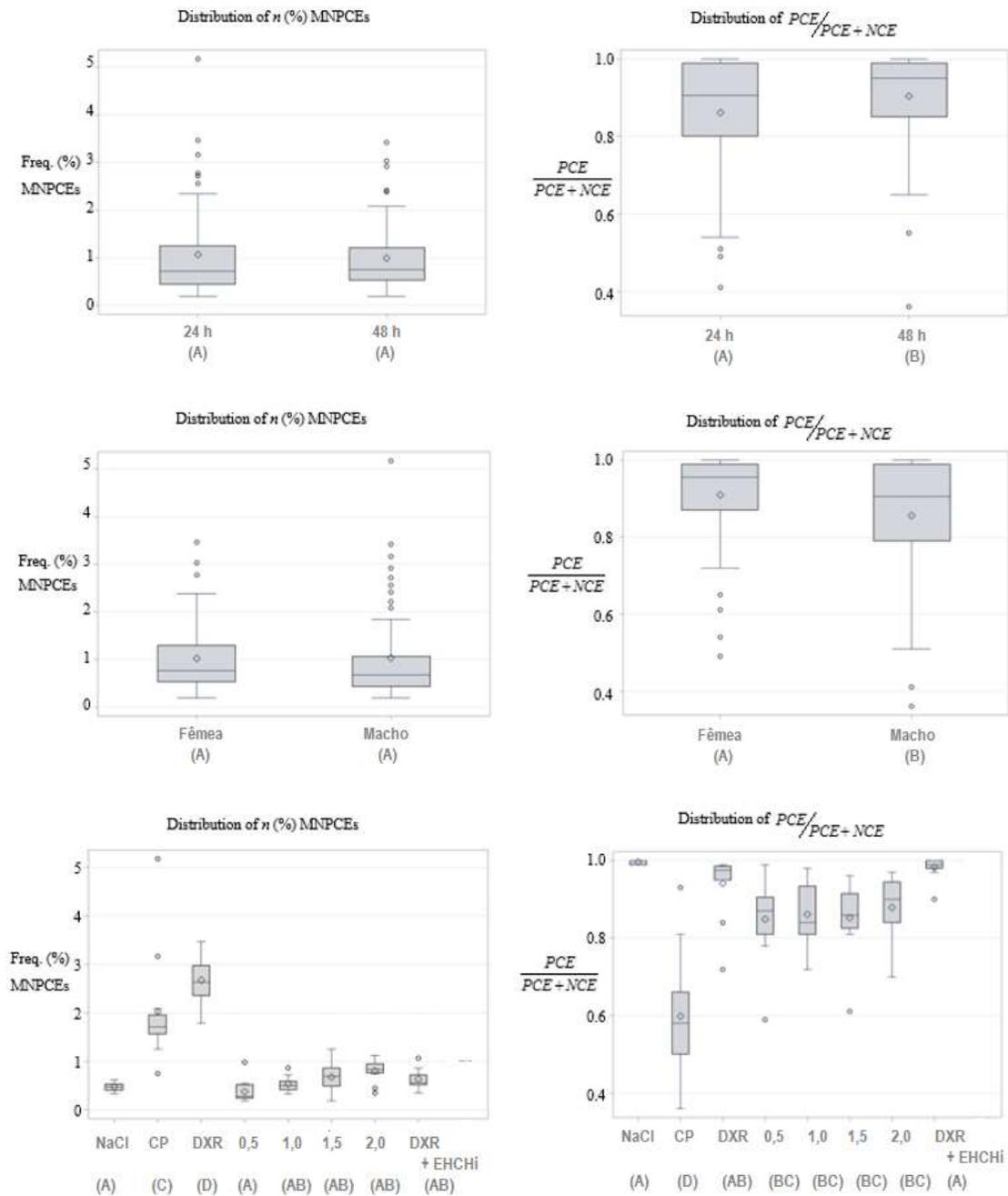


Figura 5. Ensaio mutagênico e antimutagênico de H.i., utilizando o ensaio do Micronúcleo.

7. DISCUSSÃO

As plantas e suas preparações têm sido amplamente utilizadas durante toda a história para o tratamento e prevenção de diferentes doenças. Os fitoterápicos também passaram a ser recomendado para uso na medicina veterinária, devido à sua promissora eficácia terapêutica, menores efeitos colaterais, além de diminuir os resíduos de drogas em produtos animais (GURIB-FAKIM, 2006; ABO-EL-SOUD, 2018).

Diversas pesquisas descrevem o potencial fitoterapêutico de *H. impetiginosus* e seus compostos. No entanto, não há estudos que têm como objetivo compreender os efeitos antimicrobianos, genotóxicos e mutagênicos do extrato hidroalcoólico dessa planta, além de não ter uma dose limite de exposição pré-estabelecida. Esse fato levou a avaliar as propriedades citotóxicas, genotóxicas (i.e, clastogênese e/ou aneugenicidade) e antimicrobiana (antibacteriana e/ou antifúngica) do extrato hidroalcoólico da casca de H.i.

7.1. Fitoquímica

A partir da análise qualitativa de H.i. por cromatografia gasosa, 30 compostos foram encontrados em nosso trabalho. Vários estudos relataram o isolamento e a identificação de inúmeras classes de compostos de *H. impetiginosus*, incluindo quinonas (DE OLIVEIRA *et al.*, 1993), iridóides, cumarinas, derivados do ácido benzóico (WARASHINA; NAGATANI; NORO, 2004), derivados de benzaldeídos (PARK; LEE; TAKEOKA, 2004), dialdeídos ciclopenteno (KOYAMA *et al.*, 2000) e flavonoides (JIM; JEONG; LEE, 2018), o que corroborou nossos achados.

Alguns estudos correlacionaram a estrutura química com a atividade biológica de *H. impetiginosus*. Ma *et al.* (2017), relataram que os polifenóis de *H. impetiginosus* apresentaram atividade anti-inflamatória seletiva, regulando os macrófagos e inibindo a atividade da ciclooxigenase-2 (COX-2), sem afetar a atividade da ciclooxigenase-1 (COX-1). Esses efeitos poderiam ser atribuídos ao acteosídeo dos polifenóis, que poderia se ligar à zona catalítica da COX-2.

Também foram isolados, cinco novos glicosídeos iridóides a partir do extrato aquoso de *H. impetiginosus*. Os compostos apresentaram a capacidade de suprimir citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β em células do mieloma humano (THP-1) co-estimuladas com lipopolissacárido (LPS). O estudo também revelou, que esses compostos inibiram a atividade da enzima citocromo CYP3A4, sugerindo que o grupo hidroxila se liga ao sítio ativo da enzima, desempenhando a atividade inibitória (SUO & YAN, 2016).

Fazendo o uso de técnicas cromatográficas, Zhang *et al.* (2016) isolaram e caracterizaram 8 novos ésteres iridóides. Os efeitos anti-inflamatórios foram determinados em células leucêmicas de murinos (RAW 264.7) estimulada por LPS. Três compostos exibiram atividade anti-inflamatória por inibição da produção de NO e PGE₂ de forma dependente da dose, mas sem alteração da viabilidade celular.

Três novos compostos glicosídeos fenilpropanóides obtidos de *H. impetiginosus* junto a outros 3 compostos da mesma classe, já conhecidos foram isolados. Esses compostos apresentaram diminuição dos níveis de radical livre DPPH e forte atividade antioxidante (SUO *et al.*, 2013). Um composto neolignana e quatro compostos benzoil apiosídeos do extrato aquoso de *H. impetiginosus*, também exibiram forte atividade anti-inflamatória (SUO *et al.*, 2012).

Awale *et al.* (2005) descreveram dois novos iridóides e um novo glicosídeo feniletanóide, em conjunto com doze compostos conhecidos. Todos os compostos isolados foram capazes de inibir a produção de NO em macrófagos ativados por LPS em células de macrófagos murinos (J774.1). Os compostos apresentaram atividade inibidora mais potente (IC₅₀: 13,8 - 26,1 mg.mL⁻¹) quando comparado com o controle positivo [NG-monometil-L-arginina/ L-NMMA] (IC₅₀: 27,4 mg.mL⁻¹).

7.2. Atividade antimicrobiana

Estudos antimicrobianos, determinado pelo método de diluição em caldo, mostraram atividade antimicrobiana do H.i. contra cepas de *Candida* sp. (exceto: *C. albicans* ATCC® 10231, *C. albicans* CBS 562 e *C. lusitanae* IZ 06), e contra todas as amostras bacterianas avaliadas (Gram-positivas e Gram-negativas). O melhor efeito inibitório foi observado para as cepas de *Staphylococcus* sp. (*S. aureus* ATCC® 43300; *S. epidermidis* ATCC® 12228; *S. epidermidis* ATCC® 14990), que apresentaram CIM de 12,5 mg.mL⁻¹, e para *C. rugosa* ATCC® 10571, com CIM 0,19 mg.mL⁻¹.

O extrato etanólico total da casca de *H. impetiginosus*, suas frações hexânica, de clorofórmio e seus derivados (α -lapachona; α -xyloidone; α -nor-lapachona; α -nor-hydroxylapachona) apresentaram atividade antibacteriana contra cepas de *S. aureus* (MRSA; MSSA; ATCC 33591 e ATCC 29213), no entanto, o lapachol, a principal naftoquinona presente na fração hexânica, foi inativo contra todas as amostragem. Os menores CIM's foram observados para os análogos (α -nor-lapachona e α -nor-hydroxylapachona), com o valor de 15,6 mg.L. Acredita-se que a maior lipossolubilidade desses compostos possa ser a responsável pela inibição do crescimento bacteriano observada (MACHADO *et al.*, 2003).

A inibição do crescimento bacteriano por naftoquinonas mostrou que os compostos sintéticos (α -lapachona), (β -lapachona) e [(\pm) 3-hidroxi- β -N-lapachona] foram mais efetivos que seu precursor lapachol, contra as cepas *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA) e ATCC 33591 (MRSA), *S. epidermidis* 228 (MRSE) e *S. haemolyticus* 225 (MRSH). O composto (\pm) 3-hydroxy- β -N-lapachona foi o mais potente, com o menor CIM (8; 8; 4 e 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente). Pela análise em SDS-PAGE, observou-se que houve um aumento nos níveis de proteínas de peso molecular de 100, 70, 60 e 10 kDa. Estas proteínas estão associadas ao estresse oxidativo induzido pelas naftoquinonas em todas as cepas de *Staphylococcus*, fator que pode ser responsável pela atividade antimicrobiana encontrada (PEREIRA *et al.*, 2006).

O lapachol, β -lapachona e α -lapachona apresentaram efeito antimicrobiano contra cepas de *S. aureus*, sendo que a β -lapachona teve os menores CIM's (8; 16 e 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Quando a β -lapachona foi associada aos antimicrobianos (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefoxitina, gentamicina, ciprofloxacina e meropenem), também apresentou ação sinérgica contra as cepas MRSA, tendo uma redução nos valores de CIM $\geq 87,5\%$ para todos os antibióticos testados (MACEDO *et al.*, 2013). As naftoquinonas aumentam a geração de ROS, além de formarem complexos irreversíveis com aminoácidos nucleofílicos em proteínas, frequentemente levando à sua inativação (COWAN, 1999). De acordo com Olufunmiso e Afolayan (2012), quando o extrato vegetal está associado a agentes antimicrobianos, eles atingem diferentes sítios-alvo na célula, o que pode superar os mecanismos de resistência microbiana.

Frações obtidas do extrato metanólico da casca de *H. impetiginosus* inibiram o crescimento das bactérias intestinais: *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Clostridium paraputrífico*, *C. perfringes* e *Escherichia coli*. No entanto, não obtiveram qualquer efeito inibitório para as cepas de *B. adolescentis*, *B. bifidum* e *B. infantis*. A análise espectroscópica identificou dois compostos que foram considerados responsáveis por essa atividade, o lapachol e ácido antraquinona-2-carboxílico (PARK *et al.*, 2005).

Pelo método de microdiluição o extrato metanólico de *H. impetiginosus* apresentou atividade antifúngica para as cepas (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. utilis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata* e *C. rugosa*, com valores de CIM entre 0,001 – 0,015 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (HOFLING *et al.*, 2010).

Portillo *et al.* (2001) avaliaram a atividade antifúngica dos extratos aquoso, metanólico e de diclorometano da casca de *H. impetiginosus*, pelo método de disco difusão. O extrato diclorometano (5 e 10 mg) apresentou atividade contra *Cryptococcus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Candida sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Microsporum sp.*, *Neurospora sp.*, *Penicillium sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Trichophyton sp.*

Além disso, os extratos metanólico e aquoso exibiram importante atividade contra as cepas *Cryptococcus* sp., *Microsporium* sp., *Penicillium* sp. e *Trichophyton* sp.

7.3. Citotoxicidade e Genotoxicidade

O potencial citotóxico e genotóxico das plantas é um importante aspecto da toxicologia, visto que alterações na maquinaria celular, bem como no DNA, podem resultar em morte celular, mau funcionamento dos tecidos, mutações, desenvolvimento de câncer, e/ou comprometimento da fertilidade (GEORGE *et al.*, 2017).

A atividade antiproliferativa de compostos naturais e sintéticos obtidos a partir da casca de *H. impetiginosus* foram avaliadas em células de queratinócitos humano (*HaCat*) *in vitro*. O composto 2-acetil-8-hidroxi-nafto [2,3-b] furan-4,9-diona apresentou forte efeito inibidor celular, com um valor de IC₅₀ de 0,35 µM. Além disso, outros compostos (dehydro-iso-α-lapachona, β-lapachona, 2-Ethyl-6-hydroxynaphtho[1,2-b]furan-4,5-diona e 2-Ethyl-8-hydroxynaphtho[2,3-b]furan-4,9-diona) também inibiram o crescimento dos queratinócitos, com valores de IC₅₀ entre 0,5 – 3,0 µM. O tratamento de células *HaCat* com os compostos de *H. impetiginosus* causaram notáveis danos à membrana plasmática (MULLER; SELLMER; WIEGREBE, 1999). Sabe-se que um dos mecanismos que levam a citotoxicidade das naftoquinonas é a capacidade de gerar ROS durante o processo redox entre a quinona e os produtos de redução (MUNDAY, 1997). As quantidades relativamente elevadas de LDH liberadas após o tratamento com compostos de *H. impetiginosus* provocaram danos a membrana plasmática, o que indica que estes compostos são estimuladores da peroxidação lipídica (DOCAMPO *et al.*, 1979).

A β-lapachona foi citotóxica para células de osteossarcoma canino, diminuindo a sua viabilidade. A capacidade de proliferação celular foi menor após a exposição ao composto, diminuindo dessa forma, a possibilidade de recidivas. O mecanismo de ação da substância foi pela indução da apoptose, relacionada com a ruptura da integridade do potencial de membrana das mitocôndrias e o bloqueio do ciclo celular na fase G₀/G₁ (PIMENTA, 2015).

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 200 mg.kg em ratos, e 100 mg.kg em cães. Doses acima dessas concentrações causam úlceras gástricas e perda de eritrócitos, mas não são sinais de supressão da medula óssea (LI; LI; PARDEE, 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 de *H. impetiginosus* e β -lapachona, atue em sinergia com outros fatores, tais como as citocinas específicas (KAMATA & HIRATA, 1999; QUEIROZ *et al.*, 2008).

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).

Os compostos Lapachol, α -lapachona, β -lapachona e (\pm) 3-hydroxy- β -*N*-lapachona apresentaram citotoxicidade *in vitro* para as células epiteliais de rim de macaco (BSC-40). O composto (\pm) 3-hydroxy- β -*N*-lapachona apresentou maior atividade citotóxica, sendo que a concentração de 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi suficiente para matar 80% das células BSC-40. No entanto, quando foram utilizados para preparações tópicas em coelhos saudáveis, nenhum efeito tóxico foi observado. Estes compostos também haviam apresentado atividade antibacteriana contra cepas de *S. aureus*, dessa forma, pode-se inferir que estas substâncias podem ser usadas em preparações tópicas para infecções de feridas causadas por *S. aureus* (PEREIRA *et al.*, 2006).

A β -lapachona foi citotóxica (em células em fase S) e genotóxica (induz quebras na cadeia de DNA) em células CHO logaritmicamente crescentes, em concentrações de cerca de 10 μM . Ela desregulou as funções de PARP (aumento da atividade) e da topoisomerase I (inibição). Além disso, esses resultados sugeriram que a β -lapachona não é um agente de danificação direta do DNA. É possível que o forte potencial genotóxico observado neste estudo reflete a interferência de 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 β -lapachona induz um pequeno número de quebras da cadeia de DNA devido à sua capacidade para produzir espécies reativas de oxigênio (DOCAMPO *et al.*, 1979; PORTELA MOLINA *et al.*, 1996ab).

O potencial genotóxico do extrato das flores de *H. impetiginosus*, e sua associação com o quimioterápico (DXR) – ensaio antimutagênico – foi avaliado pelo ensaio do micronúcleo em células do sangue periférico de ratos Wistar macho. Após 24 horas de tratamento, não houve qualquer efeito citotóxico ou mutagênico, independentemente da concentração testada (100, 300 e 500 mg.kg). No

ensaio antimutagênico, não houve efeito protetivo do extrato em relação aos danos provocados pelo DXR (90 mg.kg). Acredita-se que a ausência das atividades mutagênica e antimutagênica, possa ser resultado dos efeitos sinérgicos, antagônicos além de outros efeitos interativos entre os componentes biologicamente ativos (LOURENÇO *et al.*, 2010).

Boriollo *et al.* (2018) avaliaram a genotoxicidade da tintura liofilizada da casca de *H. impetiginosus* pelo ensaio do micronúcleo na medula óssea de camundongos, 24 e 48 horas após o tratamento. Nenhum efeito genotóxico foi observado nas dosagens (0,5 – 2 g.kg), independentemente do sexo e tempo de tratamento. Toxicidade sistêmica relativamente baixa (aguda e crônica na medula óssea) foi observada nas condições do teste, pela proporção de dados de PCE/NCE. Entretanto, o tratamento combinado de *H. impetiginosus* (0,5 g.kg) e DXR (5 mg.kg) apresentou efeitos antígenotóxicos e uma redução significativa na toxicidade, sugerindo que a tintura fornece proteção contra os efeitos tóxicos e genotóxicos induzidos pela DXR, tempo e sexo-dependente. Machos e fêmeas reagem de forma diferente em presença de determinadas substâncias. O ciclo estral pode interferir no resultado do ensaio, uma vez que nessa fase a fêmea libera grande quantidade de hormônios (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

8. CONCLUSÃO

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

- O H.i. apresentou ação antimicrobiana (estática) contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*; *Acinetobacter* sp.; *P. mirabilis*; *S. marcescens*; *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*), Gram-positivas (*S. aureus*; *S. epidermidis*; *S. saprophyticus*; *B. cereus* e *B. subtilis*) e leveduras (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. lusitanae*), com os respectivos CIM's (50 – 25 mg.mL⁻¹; 25 – 12,5 mg.mL⁻¹ e 100 – 0,19 mg.mL⁻¹).
- A análise qualitativa de H.i. por Cromatografia Gasosa identificou 30 compostos químicos, sendo que 90% desses compostos apresentaram índice de qualidade ≥ 70 .
- Os dados do MN apontam para a ausência de genotoxicidade (i.e., clastogenia e/ou aneugenia) de H.i., dose (0,5 – 2 g.kg⁻¹), tempo (24 – 48 h) e sexo (macho e fêmea) independente. Houve toxicidade sistêmica relativamente leve (i.e., aguda e crônica) de H.i., sob as condições do ensaio MN, conforme os dados de proporção PCE/NCE. A interação dos tratamentos de H.i. (0,5 g.kg⁻¹) com DXR (5 mg.kg⁻¹) revelou efeitos antigenotóxicos e uma redução significativa da toxicidade, sugerindo também que o H.i. fornece uma proteção contra os efeitos genotóxicos e tóxicos induzidos pela DXR na medula óssea de camundongos (i.e., efeito antigenotóxico tempo e sexo independente; efeito antitóxico tempo e sexo dependente).
- No ensaio de viabilidade celular *in vitro*, observou-se uma citotoxicidade dose-dependente de H.i., em concentrações $\geq 1,56$ mg.mL⁻¹, contra células *HaCat*.
- No ensaio antioxidante genômico, as concentrações (1.000 – 100 μ g.mL⁻¹) de H.i. protegeu parcialmente o DNA dos danos causados pela Reação de Fenton; no ensaio genotóxico, o H.i. foi pró-oxidante em sua maior concentração (5.000 μ g.mL⁻¹), no entanto, nas concentrações (3.160 – 100 μ g.mL⁻¹) não causou qualquer efeito.
- De acordo com esta pesquisa observou-se que o H.i. apresenta inúmeras atividades farmacológicas, no entanto, outros estudos envolvendo a genotoxicidade de *H. impetiginosus*, bem como dos seus compostos, devem ser conduzidos, objetivando-se caracterizar os efeitos potencialmente genotóxicos e antigenotóxicos, os mecanismos moleculares envolvidos e, mais importante, estabelecer limites para o seu consumo (dosagem adequada), delinear os potenciais riscos a sua exposição, e implementar estratégias racionais e medidas quimio-preventivas.

REFERÊNCIAS

ABO-EL-SOLOUD, K. Ethnoveterinary perspectives and promising future. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, Cairo, v. 6, n. 1, p. 1–7, apr. 2018.

ADKINS, P R F; MIDDLETON, J R. Methods for Diagnosing Mastitis. **The Veterinary clinics of North America: Food animal practice**, Philadelphia, v. 34, n. 3, p. 479–491, nov. 2018.

ALVAREZ-PEREZ, S *et al.* Acquired multi-azole resistance in *Candida tropicalis* during persistent urinary tract infection in a dog. **Medical Mycology Case Reports**, Amsterdam, v.2, n. 11, p. 9–12, feb. 2016.

AL-YASIRI, M H *et al.* Gut yeast communities in *Larus michahellis* from various breeding colonies. **Medical Mycology**, Oxford, v. 4, n. 55, p. 436–444, may 2016.

AMER, S *et al.* Prevalence and etiology of mastitis in dairy cattle in El Oro Province, Ecuador. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 80, n. 6, p. 861–868, apr. 2018.

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

ANDRADE, A; PINTO, S C; OLIVEIRA, R S. **Animais de Laboratório: criação e Experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002.

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.

BAMFORD, M; WALKINSHAW, G; BROWN, R. Therapeutic applications of apoptosis research. **Experimental Cell Research**, New York, v. 256, n. 1, p. 1-11, apr. 2000.

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, apr. 2014a.

BORIOLO, 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, n. 121, p. 1–15, apr. 2014b.

BORIOLO, M F G *et al.* Reduction of doxorubicin-induced genotoxicity by *Handroanthus impetiginosus* in mouse bone marrow revealed by micronucleus assay. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 78, n. 1, p. 1–12, feb. 2018.

BOTHA, C J; PENRITH, M L. Poisonous plants of veterinary and human importance in southern Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 119, n. 3, p. 549–58, oct. 2008.

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.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. **Farmacopéia Brasileira**. Brasília: FIOCRUZ, 2010.

CANTÓN, E *et al.* Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 45, n. 3, p. 203–206, mar. 2003.

CASTELLANOS, J R G; 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.

CHANDAR, B *et al.* Inhibition of New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1)-producing *Escherichia coli* IR-6 by selected plant extracts and their synergistic actions with antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. 1580, aug. 2017.

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

CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. **CLSI document M07-A9**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement*. **CLSI document M27-S4**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard—Third Edition*. **CLSI document M27-A3**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

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.

COELHO, M D G *et al*. Avaliação do uso de extratos vegetais para controle da hemonose em ovinos naturalmente infectados. **Ambiente & Água – An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, Taubaté, v. 12, n. 2, p. 331–339, apr. 2017.

COWAN, M M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564–582, oct. 1999.

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

DHAMA, K *et al*. Fungal/mycotic diseases of poultry-diagnosis, treatment and control: a review. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v. 16, n. 23, p. 1626–1640, dec. 2013.

DIAS, R B *et al*. β -Lapachone and its iodine derivatives cause cell cycle arrest at G2/M phase and reactive oxygen species-mediated apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cells. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 126, p. 87–100, oct. 2018.

DOCAMPO, R *et al*. Esquível, β -lapachone enhancement of lipid peroxidation and superoxide formation by sarcoma 180 ascites tumor cells. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 28, n. 6, p. 723–738, mar. 1979.

DWORECKA-KASZAK, B. *et al*. High prevalence of *Candida* yeast in milk samples from cows suffering from mastitis in poland. **The Scientific World Journal**, New York, v. 2012, n. 2012, p. 196347, apr. 2012.

EL-JAKEE, J K *et al.* Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bovine and human sources in Egypt. **Global Veterinaria**, Deira, v. 7, n. 6, p. 581–586, 2011.

EPIFANO, F *et al.* Lapachol and its congeners as anticancer agents: a review. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 13, n. 1, p. 37–49, apr. 2014.

FEIRIA, S N B *et al.* Essential oil composition of *Mentha* spp. extracted seasonally and their effects against *Candida* yeast growth and biofilm formation. **Advancement in Medicinal Plant Research**, Sapele, v. 4, n. 4, p. 106-115, oct. 2016.

FEITOSA, H A *et al.* Inclusion of Phytotherapy Content in Health Training Courses. **Revista Brasileira de Educação Médica**, Montes Claros, v. 40, n. 2, p. 197–203, apr. 2016.

GEORGE, J M *et al.* From the cover: An investigation of the genotoxicity and interference of gold nanoparticles in commonly used *in vitro* mutagenicity and genotoxicity assays. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 156, n. 1, p. 149–166, mar. 2017.

GUERRA, M O *et al.* Interceptive effect of lapachol in rats. **Contraception**, Los Altos, v. 60, n. 5, p. 305–307, nov. 1999.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 1–93, feb. 2006.

HARAN, K P. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota dairy farms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 13, p. 688–695, mar. 2012.

HEINRICH, M. Roter Lapacho-Tee. **Zeitschrift für Phytotherapie**, Amsterdam, v. 19, p. 99–100, 1998.

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.

HUSSAIN, H; Green, I. Lapachol and lapachone analogs: A journey of two decades of patent research (1997-2016). **Expert opinion on Therapeutic Patents**, London, v. 27, n. 10, p. 1111–1121, oct. 2017.

HUSSAIN, H *et al.* Lapachol: an overview. **Arkivoc**, Zurich, n. 2, p. 145–171, 2007.

JAYAKUMAR, S *et al.*, Ethno-veterinary Practices in Southern India for Captive Asian Elephant Ailments. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 22, n. 200, p. 182–204, mar. 2017.

JIM, Y; JEONG, K M; LEE, J. Development and Validation of an Analytical Method Readily Applicable for Quality Control of *Tabebuia impetiginosa* (Taheebo) Ethanolic Extract. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 101, n. 3, p. 695–700, may 2018.

JONES, K. Pau d'Arco: Immune Power from the Rain Forest. **Healing Arts Press**, Rochester, v. 3, n. 15, p. 33–66, mar. 1995.

KAMATA, H; HIRATA, H. Redox regulation of cellular signalling. **Cellular Signalling**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 1–14, jan. 1999.

KIM, J H *et al.* Melanogenesis inhibition of β -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**, v. 71, n. 9, p. 2169–2176, sept. 2007.

KOYAMA, J *et al.* Cyclopentene dialdehydes from *Tabebuia impetiginosa*. **Phytochemistry**, London, v. 53, n. 8, p. 869–872, apr. 2000.

KUNG, H N *et al.* *In vitro* and *in vivo* wound healing-promoting activities of β -lapachone. **American Journal of Physiology, Cell physiology**, 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, p. e88122, feb. 2014.

LEBA, L J *et al.* Optimization of a DNA Nicking Assay to Evaluate *Oenocarpus bataua* and *Camellia sinensis* Antioxidant Capacity. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 15, n. 10, p. 18023–18039, oct. 2014.

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**, Morion, 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 avellanedae*. **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, J *et al.* Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 24, p. 17325–17333, jun. 1999.

LI, Y; LI, C J; PARDEE, A B. 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, J *et al.* Mechanisms of antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, n. 34, feb. 2016.

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**, Osun, v. 9, n. 4, p. 542–547, jul. 2012.

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

MA, S *et al.* Taheebo Polyphenols Attenuate Fatty Acid-Induced Inflammation in Murine and Human Macrophage Cell Lines As Inhibitor of Cyclooxygenase-2. **Frontiers in Nutrition**, Lausanne, v. 4, n. 63, dec. 2017

MACEDO, L *et al.* β -Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 21, n. 1, p. 25-29, dec. 2013.

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.

MARCOS-ARIAS C, *et al.* Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 127–131, feb. 2009.

MARTIN A, *et al.* Resazurin microtiter assay plate testing of *Mycobacterium tuberculosis* susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 47, n. 11, p. 3616–3619, nov. 2003.

MATTOS, G. Medicinal plants and herbal medicines in Primary Health Care: the perception of the professionals. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 11, p. 3735-3744, nov. 2018.

MAUBON, D *et al.* Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? **Intensive Care Medicine**, New York, v. 40, n. 9, p. 1241–1255, sept. 2014.

MEDEIROS, C S *et al.* Antifungal activity of the naphthoquinone β -lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 345-349, apr. 2010.

MONECKE, S *et al.* Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 1-2, p. 128–140, nov. 2007.

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.

MOORE, C B; WALLS, C M; DENNING, D W. *In vitro* activities of terbinafine against *Aspergillus* species in comparison with those of itraconazole and amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 45, n. 6, p. 1882–1885, jun. 2001.

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

MULLER, K; SELLMER, A; WIEGREBE, W. Potential Antipsoriatic Agents: Lapacho Compounds as Potent Inhibitors of HaCaT Cell Growth. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 62, n. 8, p. 1134-1136, mar. 1999.

MUNDAY, R. Autoxidation of naphthohydroquinones: effects of metals, chelating agents, and superoxide dismutase. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 22, n. 4, p. 689-695, 1997.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. **Guideline for the Testing of Chemicals: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**. [S.l.: s.n.], 2016. 474p.

OLIVEIRA, M J R; SIMÕES, M J S; SASSI, C R R. Fitoterapia no sistema de saúde pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 39-41, 2006.

OLUFUNMISO, O; AFOLAYAN, A J. Synergistic interaction of methanolic extract of *Acacia mearnsii* De Wild. With antibiotics against bacteria of clinical relevance. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 7, p. 8915–8932, jul. 2012.

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.

PARK, B S *et al.* Selective Growth-Inhibiting Effects of Compounds Identified in *Tabebuia impetiginosa* Inner Bark on Human Intestinal Bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 4, p. 1152-1157, feb. 2005.

PARK, B S; LEE, K W; TAKEOKA, G R. Comparison of three sample preparation methods on the recovery of volatile from Taheebo (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC). **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 19, n. 4, p. 287–292, mar. 2004.

PARK, J G *et al.* Tabetri™ (*Tabebuia avellanedae* Ethanol Extract) Ameliorates Osteoarthritis Symptoms Induced by Monoiodoacetate through Its Anti-Inflammatory and Chondroprotective Activities. **Mediators of Inflammation**, Oxford, v. 2017, p. 3619879, nov. 2017.

PARK, J G *et al.* Tabetri™ (*Tabebuia avellanedae* Ethanol Extract) Ameliorates Atopic Dermatitis Symptoms in Mice. **Mediators of Inflammation**, Oxford, v. 15, p. 9079527, mar. 2018.

PEREIRA, E M *et al.* *Tabebuia avellanedae* naphthoquinones: Activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, London, v. 5, n. 5, p. 5–11, mar. 2006.

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

PIMENTA, V S C. **Propriedades citotóxicas da β -lapachona em células de osteossarcoma canino *in vitro***. 2015. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Goiânia, 2015.

PINTO, C N *et al.* Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti-trypanosomal efficacy. **Arzneimittelforschung**, Aulendorf, v. 50, n. 12, p. 1120–1128, dec. 2000.

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, 1996b.

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, 1996a.

PORTILLO, A *et al.* Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 76, n. 1, p. 93–98, jun. 2001.

QUEIROZ, M L *et al.* Comparative studies of the effects of *Tabebuia avellanedae* 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.

QUINN, B K M *et al.* **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. Oxford, UK: Blackwell Science, 2002.

RASTOGI, S *et al.* Veterinary herbal medicines in India. **Pharmacognosy Reviews**, Mumbai, v. 9, n. 18, p. 155-63, jul. 2015.

RUEGG, P. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 100, n. 12, p. 10381-10397, dec. 2017.

SANTOS, A F *et al.* Molluscicidal and trypanocidal activities of lapachol derivatives. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 67, n. 1, p. 92, feb. 2001.

SCHLOTTER, K *et al.* Leukocidin genes *lukF-P83* and *lukM* are associated with *Staphylococcus aureus* clonal complexes 151, 479 and 133 isolated from bovine udder infections in Thuringia, Germany. **Veterinary Research**, Paris, v. 43, p. 42–49, may 2012.

SEEGERS, H; FOURICHON, C; BEAUDEAU, F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Veterinary Research**, Paris, v. 34, p. 475–491, may 2003.

SEYEDMOUSAVI, S *et al.* Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. **Medical Mycology**, Oxford, v. 56, p. S165–S187, apr. 2018.

SILVA, J J *et al.* *In vitro* screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* Linné and *Annona crassiflora* Mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic. **Revista do Instituto de Medicina Tropical do estado de São Paulo**, São Paulo, v. 56, n. 4, p. 333-340, jul. 2014.

SILVA, C R *et al.* Absence of mutagenic and cytotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 14, n. 1-2, p. 1-3, dec. 2004.

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, may 2003.

STEFANETTI, V *et al.* A case of *Candida guilliermondii* abortion in an Arab mare. **Medical Mycology Case Reports**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 19–22, mar. 2014.

SUO, M R; YAN, SY. 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.

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

SURH, Y; FERGUSON, L R. Dietary and medicinal antimutagens and anticarcinogens: molecular mechanisms and chemopreventive potential – highlights of a symposium. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 523, n. 4, p.1-8, feb. 2003.

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

TEIXEIRA, M J *et al.* *In vitro* and *in vivo* Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1, 4-naphthoquinone (lapachol). **Phytotherapy Research**, London, v. 15, p. 44–48, feb. 2001.

TERAI, K *et al.* Cisplatin enhances the anticancer effect of β -lapachone by upregulating NQO1. **Anticancer Drugs**, London, v. 20, n. 9, p. 901–909, dec. 2009.

THOMSON, R H. **Napthoquinones. Naturally Occurring Quinones**. London: Academic Press, 1971.

VANDERHAEGHEN, W *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 1-2, p. 166–171, jul. 2010.

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, aug. 2006.

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.

VON EIFF, C; PETERS, G; BECKER, K. The small-colony variant (SCV) concept—The role of staphylococcal SCVs in persistent infections. **Injury**, Bristol, v. 37, n. 2, p. S26–S33, may 2006.

WALLER, S B *et al.* Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine. **Microbial Pathogenesis**, London, v.104 , n. 1, p. 232-237, mar. 2017.

WANI, M S; PARAKH, S R; DEHGHAN, M H. Herbal medicines and its standardization. **Pharmaceutical Reviews**, New Delhi, v. 5, n. 1, p. 1-6, jan. 2007.

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

WILLEMS, N *et al.* Disseminated Candidiasis in a Young, Previously Healthy, Dog and Review of Literature. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 182, n. 5-6, p. 591–596, nov. 2017.

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 avaluation of bioactive naphthoquinones from the Brazilian medicinal plant, *Tabebuia avellanedae*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 17, n.17, p. 6289-6291, sept. 2009.

ZHANG, L; HASEGAWA, I; OHTA, T. Anti-inflammatory cyclopentene derivates from the inner bark of *Tabebuia avellanedae*. **Fitoterapia**, Amsterdan, v. 109, n. 1, p. 217-223, mar. 2016b.

ZLOTOWSKI, P *et al.* Muco-cutaneous candidiasis in two pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. **The Veterinary Journal**, London, v. 171, n. 3, p. 566–569, may 2006.

ZUZARTE, M *et al.* Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. **Industrial Crops and Products**, Amsterdan, v. 44, n. 177, p. 97-103, jan. 2013.