

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 30/10/2018.



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



PG-BGA

# INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DO EXTRATO DE *Salix alba* L.: ANÁLISES *IN VITRO*, *IN VIVO* E HISTOLÓGICAS

**PETERSON MENEZES TERRAZAS**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do  
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Geral e Aplicada, Área de  
concentração *Biomoléculas: estrutura e função*.

*Orientador: Prof. Dr. Edson Luis Maistro*

**BOTUCATU – SP**

**2017**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Botucatu



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICO E GENOTÓXICO  
DO EXTRATO DE *Salix alba* L. ANÁLISES *IN VITRO*, *IN VIVO* E  
HISTOLÓGICAS

**PETERSON MENEZES TERRAZAS**

**EDSON LUIS MAISTRO**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,  
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do  
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Geral e Aplicada, Área de  
concentração *Biomoléculas: estrutura e função*.

*Orientador: Prof. Dr. Edson Luis Maistro*

**BOTUCATU – SP**

**2017**



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Terrazas, Peterson Menezes.

Investigação dos efeitos citotóxicos e genotóxico do extrato de *Salix alba* : análises *in vitro*, *in vivo* e histológicas / Peterson Menezes Terrazas. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Edson Luis Maistro  
Capes: 20206003

1. Salgueiro (Botânica). 2. Ensaio cometa. 3. Testes para micronúcleos. 4. Técnicas *in vitro*. 5. Extratos vegetais. 6. Cascas.

Palavras-chave: Ensaio cometa; Salgueiro branco; *Salix alba*; Teste do micronúcleo.



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



PG-BGA

## **PETERSON MENEZES TERRAZAS**

### INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DO EXTRATO DE *Salix alba* L. ANÁLISES *IN VITRO*, *IN VIVO* E HISTOLÓGICAS

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas: estrutura e função*.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luis Maistro

#### **Comissão Examinadora**

---

Prof. Dr. Edson Luis Maistro  
Fonoaudiologia/UNESP-Marília

---

Prof Dr Regildo Márcio Gonçalves da Silva  
Biotecnologia/UNESP-Assis

---

Profa Dra Marilanda Ferreira Bellini  
USC-Bauru

---

Profa Dra Cíntia Regina Rodrigues Carignatto  
Instituto de Ciências da Saúde/UNIP-Assis

---

Profa Dra Mariana Casteleti Beraldo Massoli  
Instituto de Ciências da Saúde/UNIP-Assis

**Botucatu, 2017**

*Dedico este trabalho...*

*...A minha querida esposa.*

## *AGRADECIMENTOS*

*Primeiramente a Deus, pela força, saúde e por tornar esse sonho realidade.*

*Aos meus pais, José Enrique (in memoriam) e Marilene, pelo esforço, amor e dedicação. Obrigado pelo amor incondicional, mesmo quando eu não merecia. Pai, depois de tantas brigas bobas, que bom que antes de partir, nos tornamos grandes amigos.*

*À minha família, em especial, minha querida e linda avó "Nêna", aos meus tios, "Manôlo" e Fernanda, e aos meus sogros, "Seu Paulo" (in memoriam) e "Dona Lucília", pela confiança, conselhos, exemplos e ótimas conversas.*

*À minha incrível e amada esposa Areadny, pelo amor, companheirismo e dedicação. Esse doutorado não seria possível sem você. Obrigado por esses quase 7 anos juntos. Amo muito você minha "Amorinha".*

*Aos meus amigos Adrian e Julian, pela força e camaradagem. E ao meu amigo Martins, por me ajudar no desenvolvimento desse projeto e claro, pelas boas risadas. Valeu meus amigos.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Luís Maistro, pela orientação e confiança. Obrigado pela oportunidade e por compartilhar seus conhecimentos e experiências profissionais.*

*Aos professores, Dr. Fábio Ferreira Perazzo, Dra. Maria Izabel Camargo Mathias, Dra. Patrícia Rosa de Oliveira e Dra. Cláudia Momo, pela colaboração no desenvolvimento dessa pesquisa.*

*Aos meus parceiros e amigos de laboratório, Camila, Eduardo e Larissa, pelo convívio, amizade, companheirismo e pelo conhecimento compartilhado.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu e ao seu corpo docente. Obrigado pela oportunidade.*

*A todos da Seção de Pós-Graduação, em especial, ao Davi Müller, pela paciência e comprometimento.*

*À FAPESP, pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa.*

*Aos professores Dra. Mariana Casteletti Beraldo Massoli e Dra. Cíntia Regina Rodrigues Carignatto, por participarem de minha banca de qualificação.*



*E por fim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente,  
para a realização desse trabalho. Muito obrigado.*

*O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período  
mais difícil da vida de alguém. (Dalai Lama)*

## RESUMO

A *Salix alba* L. (SA), popularmente conhecida como Salgueiro Branco, é uma planta utilizada na medicina popular para o tratamento de inflamações crônicas e agudas, infecções, dores, febre, entre outros. A caracterização fitoquímica do extrato da casca desta planta revelou que seu principal componente é a salicina, com uma concentração de 4,94 mg/mL, um precursor do anti-inflamatório ácido acetilsalicílico. Considerando que existem poucos estudos que avaliam a ação tóxica e citotóxica do extrato da SA, o presente estudo foi elaborado visando investigar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da SA em células mononucleares do sangue periférico humano e de hepatocarcinoma humano HepG2 *in vitro*, e em diferentes células de camundongos *in vivo*, utilizando alguns dos testes tradicionais na área de mutagênese, como o teste do MTT, o Ensaio do Cometa e o Teste do Micronúcleo, bem como a verificação de potencial citotoxicidade por meio de análises histológicas e histoquímicas. Os testes de viabilidade celular e citotoxicidade (azul de tripan e MTT) permitiram a escolha de 3 concentrações do extrato da SA para serem analisadas nos ensaios de genotoxicidade *in vitro*: 5, 50 e 100 µg/mL. Pelo ensaio cometa com as células mononucleares de sangue periférico, pôde-se observar que as concentrações de 50 e 100 µg/mL acarretaram um aumento estatisticamente significativo de danos no DNA, em comparação ao controle negativo. Já no teste do micronúcleo, as 3 concentrações avaliadas (5, 50 e 100 µg/mL) não produziram aumentos significativos de células binucleadas micronucleadas, nem alterações no índice de divisão nuclear, em comparação ao controle negativo, indicando ausência de efeitos clastogênico/aneugênico e citotoxicidade da SA. Já nas culturas de células HepG2, expostas as 3 diferentes concentrações do extrato, não foram encontrados efeitos citotóxico, genotóxico e clastogênico/aneugênico da SA. Nos experimentos *in vivo*, após tratamento dos camundongos durante 7 dias consecutivos (24 horas de intervalo) com as doses de 500, 1000 e 2000 mg/Kg de SA, o ensaio cometa evidenciou que não houve aumento significativo de danos ao DNA em nenhuma das diferentes células somáticas e germinativas analisadas, em comparação ao controle negativo. O mesmo resultado foi observado no teste do micronúcleo, onde não foi encontrado um aumento significativo no número de eritrócitos policromáticos micronucleados e nem alteração na razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos, indicando ausência de efeitos clastogênico/aneugênico e citotoxicidade da substância teste. Nas células hepáticas dos camundongos, também não foram encontradas alterações histológicas e histoquímicas. Frente as condições experimentais, os resultados obtidos permitem concluir que, o extrato de *Salix alba*, sem a metabolização por enzimas hepáticas, produziu efeitos genotóxicos em células mononucleares de sangue periférico humano em cultura. Por outro lado, o extrato, após metabolização por enzimas hepáticas das células HepG2 em cultura, e administrado via oral aos animais, não acarretou efeitos citotóxicos e/ou genotóxicos.

**Palavras-Chave:** *Salix alba* L. Salgueiro Branco. Ensaio cometa. Teste do micronúcleo.

## ABSTRACT

*Salix alba* L. (SA), popularly known as White Willow, is a plant used in folk medicine for the treatment of chronic and acute inflammations, infections, pains, fever, among others. The phytochemical characterization of the bark extract of this plant revealed that its main component is salicin, with a concentration of 4.94 mg/mL, a precursor of the anti-inflammatory acetylsalicylic acid. Considering that there are few studies evaluating the toxic and cytotoxic action of SA extract, the present study was designed to investigate the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential of SA bark wood extract in human peripheral blood mononuclear cells and human hepatoma cell line HepG2 *in vitro* and in different mouse cells *in vivo* using some of the traditional mutagenesis tests such as the MTT test, the Comet assay and the Micronucleus test, and cytotoxicity in the liver of mice also by histological and histochemical analysis. Cell viability and cytotoxicity tests (trypan blue and MTT) allowed the choice of 3 concentrations of the SA extract to be analyzed in the *in vitro* genotoxicity assays: 5, 50 and 100 µg/mL. By the comet assay with the peripheral blood mononuclear cells, it was observed that concentrations of 50 and 100 µg/ml resulted in a statistically significant increase in DNA damage, as compared to the negative control. In the micronucleus test, the 3 concentrations evaluated (5, 50 and 100 µg/mL) did not produce significant increases of micronucleated binucleate cells, as well as alterations in the nuclear division index, in comparison to the negative control, indicating absence of clastogenic/aneugenic effects and cytotoxicity of SA. In the cultures of HepG2 cells exposed to the 3 different concentrations of the extract, no cytotoxic, genotoxic and clastogenic/aneugenic effects of SA were found. In the *in vivo* experiments, after treatment of the mice for 7 consecutive days (24 hour intervals) at doses of 500, 1000 and 2000 mg/kg of SA, the comet assay showed that there was no significant increase of DNA damage in any of the somatic and germ cells analyzed, compared to the negative control. The same result was observed in the micronucleus test, where there was no significant increase in the number of micronucleated polychromatic erythrocytes and no change in the ratio between polychromatic and normochromatic erythrocytes, indicating absence of clastogenic/aneugenic effects and cytotoxicity of the test substance. In the hepatic cells of mice, histological and histochemical changes also were not found. Under the experimental conditions employed in the present study, the results obtained allow us to conclude that *Salix alba* bark wood extract, without the metabolism by hepatic enzymes, produced genotoxic effects in human peripheral blood mononuclear cells in culture. On the other hand, the extract, after being metabolized by hepatic enzymes from HepG2 cells in culture, and administered orally to the animals, did not cause cytotoxic and/or genotoxic effects.

Keywords: *Salix alba* L. White Willow. Comet assay. Micronucleus test.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Salgueiro branco e suas folhas.....	24
Figura 2 - Estrutura química da Salicina .....	25
Figura 3 - Estrutura química do Ácido Acetilsalicílico.....	25
Figura 4 - Classes de cometas, A - classe 0, B - classe 1, C - classe 2 e D - classe 3. A cabeça em destaque azul e a cauda em destaque vermelho.....	31
Figura 5 - Cultura de células HepG2 com citocalasina-B. A - Célula HepG2 binucleada com a presença de micronúcleo, B - Célula HepG2 binucleada com a presença de broto nuclear e C - Células HepG2 binucleada com a presença de ponte nucleoplasmática. Alterações destacadas pelas setas. ....	33
Figura 6 - Doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência .....	36
Figura 7 - Camadas dos elementos sanguíneos após centrifugação .....	37
Figura 8 - Cálculo da densidade celular pela regra de 3.....	37
Figura 9 - Teste do MTT. 1 (coluna com controle positivo); 2 (coluna com controle negativo); 3 (coluna com a concentração de 100 µg/mL); 4 (coluna com a concentração de 50 µg/mL) ; 5 (coluna com a concentração de 5 µg/mL) e 6 (coluna com o branco). ....	39
Figura 10 - Teste do azul de Tripán. Coradas e marcadas pelas setas, as célula mortas. As células vivas não estão coradas. ....	40

Figura 11 - Camadas dos elementos sanguíneos após repouso .....42

Figura 12 - Teste do MTT. Porcentagem de células do hepatocarcinoma humano (HepG2) viáveis após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de *Salix alba*.....55

Figura 13 - Secções histológicas do fígado de camundongo tratados com o extrato da *Salix alba*. Coloração pela hematoxilina-eosina. A-B. Grupo controle negativo, C-D. Grupo tratado com 500 mg/Kg, E-F. Grupo tratado com 1000 mg/Kg, G-H. Grupo tratado com 2000 mg/Kg. Todo foram seccionados com espessura de 3 µm. ....56

Figura 14 - Secções histológicas do fígado de camundongo tratados com o extrato da *Salix alba*. Coloração pelo Azul do Nilo. A-B. Grupo controle negativo, C-D. Grupo tratado com 500 mg/Kg, E-F. Grupo tratado com 1000 mg/Kg, G-H. Grupo tratado com 2000 mg/Kg. Todo foram seccionados com espessura de 3 µm. ....58

Figura 15 - Secções histológicas do fígado de camundongo tratados com o extrato da *Salix alba*. Coloração pelo PAS. A-B. Grupo controle negativo, C-D. Grupo tratado com 500 mg/Kg, E-F. Grupo tratado com 1000 mg/Kg, G-H. Grupo tratado com 2000 mg/Kg. Todo foram seccionados com espessura de 3 µm.....60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Migração de DNA (média $\pm$ DP) no ensaio cometa para estudo de genotoxicidade do extrato de <i>Salix alba</i> (SA) em diferentes células de camundongos machos Suíços <i>in vivo</i> . .....	49
Tabela 2 - Número de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (EPM) observados nas células de medula óssea de camundongos machos Suíços (M1-6) tratados com <i>Salix alba</i> (SA), e respectivos controles. Quatro mil células analisadas. DP = Desvio Padrão. ....	50
Tabela 3 - Migração de DNA (média $\pm$ DP) no ensaio cometa para estudo de genotoxicidade do extrato de <i>Salix alba</i> em células mononucleares de sangue periférico humano.....	51
Tabela 4 - Frequência de micronúcleos (MN) e índice de divisão nuclear (IDN) em células mononucleares de sangue periférico humano tratados com <i>Salix alba</i> .....	52
Tabela 5 - Migração de DNA (média $\pm$ DP) no ensaio cometa para estudo de genotoxicidade do extrato de <i>Salix alba</i> em células de hepatocarcinoma humano (HepG2). ....	53
Tabela 6 - Frequência de micronúcleos (MN) e índice de divisão nuclear (IDN) em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) tratadas com <i>Salix alba</i> .....	54

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% – Por cento

°C – Grau celsius

µg/mL – Micrograma por mililitro

µL - Microlitro

µL/mL – Microlitro por mililitro

µm– Micrometro

µM - Micromolar

a.C. - Antes de Cristo

ANVISA - Agência nacional de vigilância sanitária

Bap – Benzo(a)Pireno

BMC - Bleomicina

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

COX-2 - Ciclo-oxigenase 2

d.C. - Depois de Cristo

DMSO 1% - Dimetilsulfóxido a 1%.

DNA -Ácido Desoxirribonucleico

DPPH - Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

*E. coli* - Escherichia coli

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPC/ENC - Eritrócitos policromáticos/Normocromáticos

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FRAP - Poder antioxidante de redução do ferro

g - Gramas

HepG2 – Hepatocarcinoma humano

ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular-1

IDN - Índice de divisão nuclear

IL - 1 - Interleucina 1

IL- 6 - Interleucina 6

IMS/PPP - Intercontinental marketing statistics/Pharmacy purchase price

KCL - Cloreto de potássio

LMP – baixo ponto de fusão (agarose)



**M**- Molar

**MEM** - Meio mínimo essencial

**mg** – Miligramas

**mg/kg** – Miligramas por quilogramas

**mg/mL** - Miligramas por mililitros

**mL**- Mililitro

**mL/Kg** - Mililitros por quilogramas

**MMS** - Metanossulfonato de metila

**MTC** - Mitomicina C

**MTT** - Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]

**NaCl** - Cloreto de sódio

**NaHCO<sub>3</sub>** - Bicarbonato de sódio

**NF-κB** - Fator de transcrição nuclear kappa B

**nm** - Nanômetro

**OECD** - Organização para a cooperação e desenvolvimento econômico

**OMS** - Organização mundial da saúde

**ORAC** - Capacidade de absorvância do radical oxigênio

**PAS** - Ácido periódico de Schiff

**PBS** - Tampão fosfato salino

**pH** - Potencial hidrogeniônico

**RENISUS** - Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS

**RDC** - Resolução de diretoria colegiada

**rpm** - Rotação por minuto

**RPMI 1640** - Roswell park memorial institute 1640

**SnCl<sub>2</sub>** - Cloreto estanoso

**SUS** - Sistema único de saúde

**TBHP** - Hidroperóxido tert- butil

**TNF-α** - Fator de necrose tumoral Alfa

**VNC** - Vincristina

**WOMAC** - Western Ontario and McMaster Universities

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Plantas Medicinais.....	20
1.2 Considerações gerais sobre plantas do gênero <i>Salix</i> e a espécie <i>Salix alba</i> L.....	23
1.3 Genética toxicológica e Mutagênese .....	28
1.3.1 Ensaio do Cometa.....	30
1.3.2 Ensaio do Micronúcleo (MN).....	32
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo Geral .....	34
2.2 Objetivos Específicos .....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Comitê de Ética e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	35
3.2 O extrato de <i>Salix alba</i> .....	35
3.3 Ensaio <i>in vitro</i> .....	36
3.4 Obtenção das Células mononucleares do sangue periférico humano para o teste do MTT e o Ensaio do Cometa.....	36
3.5 Determinação da citotoxicidade pelo teste de conversão do MTT e pelo teste do Azul de tripan .....	38
3.6 Cultura celular e tratamentos para o ensaio do cometa <i>in vitro</i> .....	40
3.7 Obtenção das Células mononucleares do sangue periférico humano para o teste do micronúcleo .....	41
3.8 Cultura celular e tratamentos para o teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese <i>in vitro</i> .....	42
3.9 Ensaio <i>in vivo</i> .....	43
3.10 Ensaio do Cometa <i>in vivo</i> .....	44
3.11 Teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos <i>in vivo</i> .....	44
3.12 Avaliação Histológica: Técnica da Hematoxilina-Eosina (diferenciação das células e matriz extracelular).....	45
3.13 Avaliação Histológica: Técnica do Azul de Nilo (detecção de lipídeos).....	45
3.14 Avaliação Histológica: Técnica da coloração PAS (detecção de polissacarídeos) .....	46
3.15 Análise estatística .....	46
4 RESULTADOS .....	46
4.1 Testes de citotoxicidade e genotoxicidade <i>in vivo</i> .....	47

4.2 Testes de citotoxicidade e genotoxicidade <i>in vitro</i> .....	50
4.3 Análises histológicas e histoquímicas .....	55
4.3.1 Técnica da Hematoxilina-Eosina.....	55
4.3.2 Técnica do Azul do Nilo.....	57
4.3.3 Técnica da coloração PAS.....	59
5 DISCUSSÃO.....	61
6 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	79
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ( <i>in vitro</i> ).....	81
ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ( <i>in vivo</i> ).....	83

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Plantas Medicinais

As plantas medicinais são historicamente utilizadas no tratamento, cura e prevenção de diferentes patologias. As propriedades terapêuticas dessas plantas foram descobertas por meio de observação e experimentação, e o conhecimento sobre sua utilização foi propagado como parte da cultura popular, apesar de seus constituintes químicos serem desconhecidos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; PEREIRA et al., 2016). Existem relatos do uso de plantas medicinais a milhares de anos, onde os primeiros registros foram encontrados em tabuletas de argila sumérios, que foram escritos há cerca de 5000 anos. Nessas tabuletas foram encontradas referências de mais de 250 tipos de plantas utilizadas em 12 receitas para o preparo de drogas. No livro chinês Pen T'Sao, escrito por volta de 2500 a.C. e no papiro de Ebers, escrito por volta de 1550 a.C. no Egito, foram descritos o uso de diferentes plantas medicinais, como a cânfora, o ginseng, a casca de canela, a romã, a cebola, o alho, coentro, o salgueiro, entre outros, sendo que muitas dessas são utilizadas da mesma maneira até hoje (PETROVSKA, 2012; PEREIRA et al., 2016). O médico e farmacologista do exército romano, Dioscórides, estudava as plantas medicinais enquanto viajava com o exército de Nero. Por volta de 70 d.C., Dioscórides escreveu a obra *De Materia Medica*, onde descreveu o efeito terapêutico de 657 medicamentos de origem vegetal, entre eles o alho, a cebola, a camomila e também o salgueiro, onde esse último era usado como antipirético. Durante a Idade Média, entre os séculos XVI e XVIII, as plantas medicinais, além de serem usadas de forma isoladas, passaram a ser utilizadas como drogas compostas, o que incluía o uso conjunto de drogas de origem animal e vegetal. No início do século XIX, as substâncias químicas encontradas nas plantas medicinais começaram a ser isoladas e identificadas (PETROVSKA, 2012).

Nos países em desenvolvimento, até 80% da população são dependentes das plantas medicinais nos cuidados básicos da saúde, onde aproximadamente um terço dos medicamentos a base de plantas são utilizados no tratamento de feridas. A demanda de medicamentos de origem natural aumenta a cada dia nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, pois esses são considerados seguros, bem tolerados e de baixo custo quando comparados aos medicamentos sintéticos (QURESHI; KHATOON; AHMED, 2015). O aumento do uso de plantas medicinais como terapia alternativa, também está

relacionado às regiões com pouco ou nenhum acesso ao atendimento primário à saúde, devido à distância dos centros de referência ou ao alto custo dos medicamentos alopáticos e dos tratamentos tradicionais (NASCIMENTO JÚNIOR et al., 2016). Apesar do desenvolvimento de novos medicamentos sintéticos, o uso de medicamento de origem natural tem aumentado nas últimas duas décadas, sendo que mais de 25% dos medicamentos usados no mundo derivam direta ou indiretamente das plantas (HOSTETTMANN; MARSTON, 2002; FARINACCI et al., 2008).

No Brasil, as plantas medicinais são amplamente utilizadas, tanto nas regiões mais pobres como nos grandes centros, sendo essas encontradas facilmente em feiras e mercados populares, além de também serem cultivadas em casa (RATES, 2001; TRESVENZOL et al., 2006). No comércio, podemos encontrar partes, produtos e subprodutos de diferentes espécies de plantas medicinais. Essas plantas, na maioria das vezes, são vendidas apenas por seus nomes populares e muitas não tiveram seus princípios ativos identificados e avaliados (LIMA; NASCIMENTO; SILVA, 2016).

As plantas medicinais, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), são aquelas que apresentam em sua composição pelo menos um princípio ativo com propriedades terapêuticas ou que sejam precursoras de medicamento sintético (CARVALHO, 2015; LIMA; NASCIMENTO; SILVA, 2016) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define os fitoterápicos como medicamentos originados exclusivamente de plantas medicinais.

Os medicamentos fitoterápicos devem ser registrados na ANVISA, seguindo as normas da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) número 26, de 13 de maio de 2014. Para o registro ser aprovado, esses medicamentos precisam comprovar sua segurança e eficácia através da literatura técnico-científica (NASCIMENTO JÚNIOR et al., 2016). Uma planta medicinal possui diferentes substâncias e o seus efeitos terapêuticos podem estar relacionados a uma ou mais dessas substâncias. Nesse caso, são escolhidos marcadores, que são as substâncias que possuem alguma atividade biológica, estão em maior volume e podem ser quantificadas, para comprovarem seus efeitos terapêuticos, sua segurança e eficácia (MANFIO; BRUM JUNIOR, 2017).

No Brasil, o mercado de fitoterápicos é economicamente relevante e está em crescimento. De acordo com o IMS health/PPP, em 2014 o faturamento desse mercado foi de R\$ 1,1 bilhão de reais, representando 2,8% do faturamento do mercado total de medicamentos (MANFIO; BRUM JUNIOR, 2017).

Em dezembro de 2008, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi instituído no Brasil, disponibilizando aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), os fitoterápicos (quadro 1). O governo também disponibilizou uma lista de medicamentos fitoterápicos que são disponibilizados a população pelo Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), incluindo o extrato da casca da *Salix alba* L.(BRASIL, 2008; BRASIL, 2009).

**Quadro 1** - Lista de Fitoterápicos distribuídos pelo SUS

NOME POPULAR	NOME CIENTÍFICO	INDICAÇÃO/USO
Alcachofra	<i>Cynara scolymus</i>	Ação colagoga e colerética.
Aroeira	<i>Schinus terebenthifolius</i>	Anti-inflamatória, antisséptica
Babosa	<i>Aloe vera</i>	Cicatrizante (queimaduras de 1º e 2º graus).
Cáscara Sagrada	<i>Rhamnus purshiana</i>	Constipação intestinal
Espinheira-santa	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Dispepsias, gastrite e úlcera gastroduodenal
Garra-do-diabo	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Ação anti-inflamatória
Guaco	<i>Mikania glomerata</i>	Expectorante e broncodilatador
Hortelã-pimenta	<i>Mentha piperita</i>	Antiespasmódica intestinal
Isoflavona-de-soja	<i>Glycine max</i>	Alívio do climatério
Plantago	<i>Plantago ovata</i>	Constipação intestinal
Salgueiro Branco	<i>Salix alba</i>	Ação anti-inflamatória, analgésica e antitérmica
Unha-de-gato	<i>Uncaria tomentosa</i>	Ação anti-inflamatória e imunomoduladora

Vale lembrar que, apesar de fazer parte da tradição popular e de muitas vezes existir a comprovação científica de seus efeitos benéficos, o uso de plantas medicinais e fitoterápicas deve ser realizado com cautela, pois existem diversas plantas perigosas e tóxicas para consumo humano, além de existirem poucos ou conflitantes dados toxicológicos sobre muitas delas (YUNES; CALIXTO, 2001; ZHOU et al., 2004; SOUZA et al., 2009).

Podemos citar alguns exemplos de plantas medicinais, que fazem parte dos fitoterápicos distribuídos pelos SUS e que parecem possuir efeitos citotóxicos. Um exemplo é a popularmente conhecida como espinheira-santa, a *Maytenus ilicifolia*. Essa planta é utilizada na medicina popular no tratamento de gastrite, úlceras e dispepsia. Essa planta medicinal possui trabalhos científicos que comprovam sua ação terapêutica, mas também encontramos um trabalho onde o extrato dessa planta nas concentrações de 500 e 1000 µg/ml demonstrou toxicidade em cultura de hemácias (COLACITE, 2015).. A *Schinus terebinthifolia*, conhecida popularmente como aroeira, é utilizada na medicina popular no tratamento de inflamações e diarreias, e apesar de possuir trabalhos científicos que comprovem sua ação terapêutica, essa também demonstrou toxicidade em cultura de hemácias nas mesmas concentrações da espinheira-santa. (DEGÁSPARI; WASYCZNSKY; PRADO, 2005). Mais um exemplo é a *Aloe vera*, conhecida popularmente como babosa, muito utilizada em preparados farmacêuticos e cosméticos. É uma planta utilizada popularmente no tratamento de lesões na pele, no tratamento de úlceras e como antiviral. O extrato dessa planta apresentou atividade mutagênica, no teste de Ames, na concentração de 5 mg/placa (PARRA et al., 2000).

Levando em consideração que muitas substâncias podem provocar ou evitar danos ao material genético, torna-se de extrema importância a realização de testes citogenéticos para identificar os possíveis efeitos mutagênicos e antimutagênicos da administração aguda e crônica de extratos de plantas, em suas diversas concentrações, e avaliar a sua influência no genoma dos organismos. Poucos estudos a respeito da ação tóxica e citotóxica do gênero *Salix* são encontrados na literatura, e em relação à toxicidade genética, são mais escassos ainda.

## 6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, os efeitos genotóxicos e mutagênicos do extrato da casca da *Salix alba* L. foram avaliados *in vivo* através do ensaio cometa e do teste do micronúcleo, e os resultados obtidos demonstraram que o extrato não acarretou efeitos genotóxicos significativos nas doses testadas e condições do experimento. Já na avaliação *in vitro*, foi observado, pelo ensaio do cometa, efeito genotóxico nas doses de 50 e 100 µg/mL do extrato, em células mononucleares do sangue periférico. Tal efeito não foi observado em células HepG2, quando o extrato foi metabolizado pelas enzimas hepáticas. As análises histológicas e histoquímicas também não evidenciaram citotoxicidade do extrato em células hepáticas de camundongos. A observação de toxicidade genética *in vitro* quando o extrato não é metabolizado por enzimas hepáticas, indicam que é necessário cautela com seu uso por seres humanos, e também apontam para a necessidade de realização de mais estudos focando os efeitos do extrato da casca de *Salix alba* L. com e sem metabolização hepática sobre as células de mamíferos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNOLET, S.; WIESE, S.; VERPOORTE, R.; STAERK, D. Comprehensive analysis of commercial willow bark extracts by new technology platform: Combined use of metabolomics, high-performance liquid chromatography–solid-phase extraction–nuclear magnetic resonance spectroscopy and high-resolution radical scavenging assay. **J. Chromatogr. A**, v. 1262, p. 130 - 137, 2012.

ALMEIDA, I.V.; DOMINGUES, G.; SOARES, L.C.; DUSMAN, E.; VICENTINI, V.E.P. Evaluation of cytotoxicity and mutagenicity of the benzodiazepine flunitrazepam in vitro and in vivo. **Braz. J. Pharmac. Sci.**, v. 50, n. 2, p. 251-256, 2014.

ALVES, E.A.; GUIMARÃES, A.C.R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R.(Orgs). **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV-IOC, 2010. p. 215-252.

AVELAR-FREITAS, B.A.; ALMEIDA, V.G.; PINTO, M.C.X.; MOURA, F.A.G.; MASSENSINI, A.R.; MARTINS-FILHO, O.A.; ROCHA-VIEIRA, E.; BRITO-MELO, G.E.A. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 47, n. 4, p. 307-315, 2014.

BARREIRO, E. J., BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quím. Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quím. Nova**. v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BILANI, N.; BAHMAD, H.; ABOU-KHEIR, W. Prostate Cancer and Aspirin Use: Synopsis of the Proposed Molecular Mechanisms. **Front. Pharmacol.**, v. 8, p. 1-8, 2017.

BONATERRA, G.A.; HEINICH, E.U; KELBER, O.; WEISER, D.; METZ, J.; KINSCHERF, R. Anti-inflammatory effects of the willow bark extract STW 33-I (Proaktiv®) in LPS-activated human monocytes and differentiated macrophages. **Phyomed**, v. 17, p. 1106–1113, 2010.

BRAMBILLA, G.; MARTELLI, A. Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. **Mutat. Res.**, v. 681, n. 2-3, p. 209–229, 2009.

BRASIL, 2009. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS)**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 20 março 2017.

BRASIL, 2008. Portaria Interministerial Nº 2.960, de 9 de Dezembro de 2008. Aprova Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 dez. 2008. Seção 1. p. 56.

CARVALHO, L.M. **Orientações Técnicas para o Cultivo de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares**. Circular Técnica n. 70, Embrapa, Nov. 2015.

CHEN, W.; LEE, M.K.; JEFCOATE, C.; KIM, S.C.; CHEN, F.; YU, J.H. Fungal Cytochrome P450 Monooxygenases: Their Distribution, Structure, Functions, Family Expansion, and Evolutionary Origin. **Genome Biol. Evol.**, v. 6, n. 7, p. 1620-1634, 2014.

CHOY, W.N. **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assesment**. Marcel Dekker, Inc, New York: 2001.

CHRUBASIK, S.; KUNZEL, O.; MODEL, A.; CONRADT, C.; BLACK, A. Treatment of low back pain with a herbal or synthetic anti-rheumatic: a randomized controlled study. Willow bark extract for low back pain. **Rheumatol.**, v. 40, p.1388–1393, 2001.

COLACITE, J. TRIAGEM FITOQUÍMICA, ANÁLISE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA E DOS EXTRATOS DAS PLANTAS: *Schinus terebinthifolia*, *Maytenus ilicifolia* REISSEK, *Tabebuia avellaneda*, *Anadenanthera colubrina* ( Vell.) BRENAN. **Rev. Saud. Pesq.**, v. 8, n. 3, p. 509-516, 2015.

DE FLORA, S.; FERGUNSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutat. Res.**, v. 591, p. 8-15, 2005.

DEGÁSPARI, C.H.; WASYCZNSKY, L.N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolia* Raddi. **Ciênc. Agrotec.**, v. 29, n. 3, p. 617-622, 2005.

DENIZOT, F; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **J. Immunol. Methods**. v. 89, n. 2, p. 271–277, 1986.

DHAWAN, A.; BAIPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell. Biol. Toxicol.**, v. 25, p. 5-32, 2008.

DIAS, R.P.; TEIXEIRA, M.F.S.; COSTA, E.C.; FARIAS, A.C.; AZEVEDO, D.A.A.; AGUIAR, T.D.F.; PINHEIRO, M.A. Potential for in vitro mesoderm differentiation of Wharton's jelly cells from ovine umbilical cord isolated in different culture media. **Pesq. Vet. Bras**, v. 36, n. 1, p. 79-88, 2016

DOLAI, N.; ISLAM, A.; HALDAR, P. K. **Antiproliferative Activity and Apoptosis Inducing Mechanism of *Anthocephalus cadamba* on Dalton's Lymphoma Ascites Cells. Iran. J. Pharm. Res.**, v. 15, n. 2, p. 505-514, 2016

DRUMMOND, E. M.; HARBOURNE, N.; MARETE, E.; MARTYN, D.; JACQUIER, J. C.; O'RIORDAN, D.; GIBNEY, E.R. Inhibition of Proinflammatory Biomarkers in THP1 Macrophages by Polyphenols Derived From Chamomile, Meadowsweet and Willow bark. **Phytother. Res.**, v. 27, p. 588–594, 2013.

DUNN, T.L.; GARDINER, R.A.; SEYMOUR, G.J.; LAVIN, M.F. Genotoxicity of analgesic compounds assessed by an in vitro micronucleus assay. **Mutat. Res.**, v. 189, n. 3, p. 299-306, 1987.

DUSMAN, E.; BERTI, A.P.; SOARES, L.C.; VICENTINI, V.E.P. Principais Agentes Mutagênicos e Carcinogênicos de Exposição Humana. **Rev. Saúde e Biol.**, v. 7, n.2, p. 66-81, 2012.

EL-SHEMY, H. A., ABOUL-ENEIN A. M.; ABOUL-ENEIN K. M.; FUJITA K. Willow Leaves' Extracts Contain Anti-Tumor Agents Effective against Three Cell Types. **PLoS ONE**. v. 2(1), p. 178, 2007.

ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 23 – 46.

FARINACCI, M.; COLITTI, M.; SGORLON, S.; STEFANON, B. Immunomodulatory activity of plant residues on ovine neutrophils. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 126, p. 54–63, 2008.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutat. Res.**, v. 600, p. 58-66, 2006.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat. Res.**, v. 147, n.1-2, p. 29–36, 1985.

FERGUSON, L.R.; PHILPOTT, M; KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. **Toxicol.**, v. 198, p. 147-159, 2004.

FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como**

**sistemas testes**.2005. 212f. Dissertacao (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociencias, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

FRANCY-GUILFORD, J. PEZZUTO, J.M. Mechanisms of Cancer Chemopreventive Agents: A Perspective. **Planta Med.**, v.74, p.1644-1650, 2008.

FREIMOSER, F.M.; JAKOB, C.A.; AEBI, M.; TUOR, U. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, n.8, p. 3727–3729, 1999.

FREISCHMIDT, A.; JURGENLIEMK, G.; KRAUS, B.; OKPANYI, S.N.; MULLER, J.; KELBER, O.; WEISER, D.; HEILMANN, J. Contribution of flavonoids and catechol to the reduction in ICAM-1 expression in endothelial cells by standardized Willow bark extract. **Phymed**, v. 19, p. 245–252, 2012.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**. 7 ed. New Jersey: Wiley Blackwell, 2016.

GARRIOTT, M.L., BRUNNY, J.D.; KINDIG, D.E.; PARTON, J.W.;SCHWIER, L.S. The in vivo rat micronucleus test: integration with a 14-day study. **Mutat. Res.**, v. 342, n. 1-2, p. 71-76, 1995.

GICHNER, T.; PLEWA, M. Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. **Mutat. Res.**, v. 401, p. 143-52, 1998.

GOMES, F.S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Rev. Nutr.**, v. 20, n. 5, p. 537-548, 2007.

GOMES, J.N.C. **Estabelecimento e caracterização in vitro e in vivo de linhas celulares de tumores da mama de cadela**. 2007. Dissertacao (Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular) – Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, 2007

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 247 – 271.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos Mutações, Câncer e Reprodução**. Editora da UNB. Brasília, 392p. 2005.

GUIDOTI, D.G.G.; GUIDOTI, D.T.; BERTI, A.P.; DUSMAN, E.; VICENTINI, V.E.P. Potencial mutagênico do extrato aquoso de *Allium cepa* L. em células hematopoiéticas de ratos Wistar. **R. bras. Bioci.**, v. 12, n. 1, p. 42-45, 2014

HAMADA, T.; CAO, Y.; QIAN, Z. R., MASUGI, Y.; NOWAK, J. A.; YANG, J.; SONG, M.; MIMA, K.; KOSUMI, K.; LIU, L.; SHI, Y.; DA SILVA, A.; GU, M.; LI, W.; KEUM, N.; ZHANG, X.; WU, K.; MEYERHARDT, J. A.; GIOVANNUCCI, E.L.; GIANNAKIS, M.; RODIG, S.J.; FREEMAN, G.J.; NEVO, D.; WANG, M.; CHAN, A.T.; FUCHS, C.S.; NISHIHARA, R.; OGINO, S. Aspirin Use and Colorectal Cancer Survival According to Tumor CD274 (Programmed Cell Death 1 Ligand 1) Expression Status. **J. Clin. Oncol.**, p. 1 - 11, 2017.

HEDDLE, J.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutat. Res.**, v. 18, p. 187-190, 1973.

HEDNER, T.; EVERTS, B. The early clinical history of salicylates in rheumatology and pain. **Clin. Rheumatol.**, v. 17, p. 17–25, 1998.

HOSTANSKA, K.; JURGENLIEMK, G.; ABEL, G.; NAHRSTEDT, A.; SALLER, R. Willow bark extract (BNO1455) and its fractions suppress growth and induce apoptosis in human colon and lung cancer cells. **Cancer. Detect. Prev.**, v. 31, p. 129–139, 2007.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Twenty years of research into medicinal plants: results and perspectives. **Phytoch. Reviews**, v. 1, p. 275-285, 2002.

ISHIKADO, A.; SONO, Y.; MATSUMOTO, M.; ROBIDA-STUBBS, S.; OKUNO, A.; GOTO, M.; KING, G.L; BLACKWELL, T.K.; MAKINO, T. Willow bark extract increases antioxidant enzymes and reduces oxidative stress through activation of Nrf2 in vascular endothelial cells and *Caenorhabditis elegans*. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 65, p. 1 - 22, 2012.

JUKIC, M.; BURCUL, F.; CAREV, I.; POLITEO, O.; MILOS, M. Screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of selected plants from Croatia. **Nat. Prod. Res.**, v. 26, n. 18, p.1703–1707, 2012.

KATIKI, L.M.; FERREIRA, J.F.; GONZALEZ, J.M ; ZAJAC, A.M.; LINDSAY, D.S.; CHAGAS, A.C.; AMARANTE, A.F. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. **Vet. Parasitol.**, v.192, p.218-227, 2013.

KENSTAVICIENE, P.; NENORTIENEL, P.; GUODA, K.; ZEVZIKOVAS, A.; LUKOSIUS, A.; KASLAUSKIENE, D. Application of high-performance liquid chromatography for research of salicin in bark of different varieties of *Salix*. **Med. (Kaunas)**. v.45(8), p. 644 – 651, 2009.

KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS, G.; ELHAJOUJI, A.; LUKAMOWICZ, M.; GONZALEZ, L.; LOOCK, K.V.; DECORDER, I. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Arch.Toxicol.** v. 85, p. 873-899, 2011.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: Mechanisms and technical considerations. **Mutat. Res.**, v.363, p.89-96, 1996.

LEWIN, B. (Ed) *Genes VII*. USA: Oxford University Press, 2000. In: NEGRAES, P. D. **Mutagenicidade e Antimutagenicidade da Clorofilina – Uma avaliação do seu mecanismo de ação in vitro**. Dissertação de Mestrado. UEL. Londrina: 2003.

LIEBEL, S.; RIBEIRO, C.A.O.; MAGALHÃES, V.F.; SILVA, R.C.; ROSSI, S.C.; RANDI, M.A.F.; NETO, F.F. Low concentrations of cylindrospermopsin induce

increases of reactive oxygen species levels, metabolism and proliferation in human hepatoma cells (HepG2). **Toxicol. in Vitro**, v. 29, p. 479-488, 2015

LIMA, I.E.O.; NASCIMENTO, L.A.M.; SILVA, M.S. Comercialização de Plantas Medicinais no Município de Arapiraca-AL. **Rev. Bras. Pl. Med**, v.18, n. 2 p. 462-472, 2016.

LIU,N.; GUAN,Y.; XUE,L.; YU,Y.; XIAO,J.; CHANG, Z.; LI,Q.; BAI,Y.; LI,B.; GUAN,;W. Assessment of DNA/Chromosome Damage in the Peripheral Blood Lymphocytes of Workers Exposed to Indium Compounds. **Toxicol. Sci.**, p. 1-9, 2017.

MACGREGOR, J.T.; CASCIANO, D.; MULLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutat. Res.**, v. 455, n. 1-2, p. 3-20, 2000.

MAISTRO, E. L., 2014. The *in vivo* rodent micronucleus test, in: Sierra, L.M., Gaivão, I. (Eds.), Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach, Methods in Pharmacology and Toxicology. Springer Science+Business Media, New York. pp. 103-113.

MALACINSKI, G. M. **Fundamentos de Biologia Molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

MANFIO, J.L.; BRUM JUNIOR, L. Desafios do desenvolvimento dos dossiês de registro de medicamentos fitoterápicos. **Arq. Cienc. Saúde UNIPAR**, v. 21, n. 1. p. 47-52, 2017.

MARTIN, G.M. Somatic mutagenesis and antimutagenesis in aging research. **Mutat. Res.**, v. 350, n. 1, p. 35-41, 1996.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDER, I.; KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochim.** v. 88, p. 1515 – 1531, 2006.



McKELVEY-MARTIN, V.J.; GREEN, M.H.; SCHMEZER, P.; POOL-ZOBEL, B.L.; DE MÉO, M.P.; COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. **Mutat. Res.**, v. 288, n. 1, p. 47-63, 1993.

MERSCH-SUNDERMANN, V.; KNASMULLER, S.; WU, X.J.; DARROUDI, F.; KASSIE, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicol.**, v. 198, n. 1-3, p. 329-340, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAJAFZADEH, M.; NORMINGTON, C.; JACOB, B. K.; ISREB, M.; GOPALAN, R. C.; ANDERSON, D. DNA Damage in Healthy Individuals and Respiratory Patients after Treating Whole Blood In vitro with the Bulk and Nano Forms of NSAIDs. **Front. Mol. Biosci.**, v. 3, n. 50, p. 1-11, 2016.

NASCIMENTO, D. F.; SANTANA, A. P. M.; LEITE, I. O.; VIANA, F. A. C.; SILVA LEITE, A. L. A.; MORAES, R. A.; JAMACARU, F. V. F.; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. O.; MORAES, M. E. A. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico contendo *Passiflora incarnata* L., *Crataegus oxyacantha* L., *Salix alba* L. em voluntários saudáveis. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 19, p. 261-268, 2009.

NASCIMENTO JÚNIOR, B.J.; TÍNEL, L.O.; SILVA, E.S.; RODRIGUES, L.A.; FREITAS, T.O.N.; NUNES, X.P.; AMORIM, E.L.C. Avaliação do conhecimento e percepção dos profissionais da estratégia de saúde da família sobre o uso de plantas medicinais e fitoterapia em Petrolina-PE, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 18, n. 1, p. 57-66, 2016.

NIEMAN, D.C.; SHANELY, R.A.; LUO, B.; DEW, D.; MEANEY, M.P.; SHA, W. A commercialized dietary supplement alleviates joint pain in community adults: a double-blind, placebo-controlled community trial. **Nutr. J.**, v. 12, n. 154, p. 1-9, 2013.

NIZARD, C.; NOBLESSE, E.; BOISDÉ, C.; MOREAU, M.; FAUSSAT, A.M.; SCHNEBERT, S.; MAHÉ, C. H. Heat Shock Protein 47 Expression in Aged Normal

Human Fibroblasts: Modulation by *Salix alba* Extract. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1019, p. 223-227, 2004.

NOVICK, A.; SZILARD, L. Anti-mutagens. **Nat.**, v.170, p. 926-927, 1952.

OECD, 487. 2014. *In vitro* mammalian cell micronucleus test. OECD Guideline for the testing of Chemicals.

OECD, 474. 2014. Mammalian erythrocyte micronucleus test. OECD Guideline for the testing of Chemicals.

OLIVE, P. L.; BANATH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. **Radiat. Res.**, Oak Brook, v. 122, p. 86-94, 1990

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.123, p.291-298, 1984.

PACHECO, A. B. F.; KRÜGER, W. M. V.; FERREIRA, L. C. S. **Apostila Mutagênese**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2009.

PARRA, A.V.; LÓPEZ, A.G.; RUIZ, A.R.; FERRER, J.P.; MARTINEZ, R.R. Derivados antraquinónicos del *Aloe vera* L. tamizaje genotóxico. **Rev. Cubana Plant. Med.**, v. 5, n. 2, p. 46-50, 2000.

PEREIRA, A. R. A.; VELHO, A. P. M.; CORTEZ, D. A. G.; SZERWIESKI, L. L. D.; CORTEZ, L. E. R. Traditional use of medicinal plants by elderly. **Rev. Rene.**, v. 17, n. 3, p. 427-434, 2016.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacogn. Rev.**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.

PINTO, B.; CACIAGLI, F.; RICCIO, E.; REALI, D.; SARIC, A.; BALOG, T.; LIKIC, S.; SCARPATO, R. Antiestrogenic and antigenotoxic activity of bee pollen from *Cystus incanus* and *Salix alba* as evaluated by the yeast estrogen screen and the micronucleus assay in human lymphocytes. **Eur. J. Med. Chem.** v. 45, p. 4122-4128, 2010.

PINTO, L.F.R.; FELZENSZWALB, I. Genética do câncer humano. In: **Mutagênese Ambiental**. Capítulo 2, Ed. Ulbra, Canoas, 2003.

QURESHI, M. A.; KHATOON, F.; AHMED, S. An Overview on Wounds Their Issues and Natural Remedies for Wound Healing. **Biochem. Physiol.**, v. 4, p. 1-9, 2015.

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

ROGERO, S. O.; LUGAO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROUX, G. L.; MOCHE, H.; NIETO, A.; BENOIT, JP.; NESSLANY, F.; LAGARCE, F. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid nanocapsules. **Toxicol. in Vitro**, v. 41, p. 189-199, 2017

RYDBERG, B.; JOHANSON, K. J. Estimation of single strand break in single mammalian cells in: P. C. Hanawalt, E. C. Friedbers. **DNA Repair Mechanisms**. New York: C. F. Fox, 1978. p. 465.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, P. D. O. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciênc. Rural**, v. 35, n. 3, p. 510-514, 2005.

SARASIN, A. An overview of the mechanisms of mutagens and carcinogens. **Mutat. Res.**, v. 544, p. 99-106, 2003.

SCCNFP – THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON COSMETIC PRODUCTS AND NON-FOOD PRODUCTS INTENDED FOR CONSUMERS. Proposal for

recommended mutagenicity/genotoxicity tests for the safety testing of cosmetic ingredients to be included in the annexes to Council Directive 76/768/EEC.

**SCCNFP/0755/03**, notas do guia, 9/12/2003, 12p.

SCHMID, B.; LUDTKE, R.; SELBMANN, H-K.; KOTTER, I.; TSCHIRDEWAHN, B.; SCHAFFNER, W.; HEIDE, L. Efficacy and tolerability of a standardized willow bark extract in patients with osteoarthritis: randomized placebo-controlled, double blind clinical trial. **Phytother. Res.**, v. 15, p. 344–350, 2001.

SCHMID, W.; ARAKAKI, D.T.; BRESLAU, N.A.; CULBERTSON, J.C. Chemical mutagenesis. The chinese hamster bone marrow as an in vivo test system, I. Cytogenetic results on basic aspects of the methodology, obtained with alkylating agents. **Humangen.**, v. 11, n. 2 p. 103-118, 1971.

SHAKIBAEI, M.; ALLAWAY, D.; NEBRICH, S.; MOBASHERI, A. Botanical Extracts from Rosehip (*Rosa canina*), Willow Bark (*Salix alba*), and Nettle Leaf (*Urtica dioica*) Suppress IL-1 $\beta$ -Induced NF- $\kappa$ B Activation in Canine Articular Chondrocytes. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v. 2012, p. 1-16, 2012.

SHARA, M.; STOHS, S.J. Efficacy and Safety of White Willow Bark (*Salix alba*) Extracts. **Phytother. Res.**, v. 29, p. 1112–1116, 2015

SHARPE, P. A.; GRANNER, M. L.; CONWAY, J. M.; AINSWORTH, B. E.; DOBRE, M. Availability of Weight-Loss Supplements: Results of an Audit of Retail Outlets in a Southeastern City. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 106, n. 12, p. 2045-2051, 2006.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **J. Ethnopharmacol.**, v. 99, p 69–73, 2005.

SILVA, J.; FREITAS, T.R.O.; MARINHO, J.R.; SPEIT, G.; ERDTMANN. An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genet. Mol. Biol.**, v. 23, n. 1, p. 241-245, 2000.

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

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification or low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SOUZA, R. S. S.; ALMEIDA, M. C.; MANOEL C. V.; SANTOS-FILHO, S. D.; FONSECA, A. S.; BERNARDO-FILHO, M. Biological effects of an aqueous extract of *Salix alba* on the survival of *Escherichia coli* AB1157 cultures submitted to the action of stannous chloride. **Biol. Res.** v. 42, 199-203, 2009.

SPEIT, G.; HANELT, S.; HELBIG, R.; SEIDEL, A.; HARTMANN, A. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicol. Lett.**, v. 88, p. 91 – 98, 1996.

SPORN, M.B.; SUH, N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 537-543, 2002.

THOOLEN, B.; MARONPOT, R.R.; HARADA, T.; NYSKA, A.; ROUSSEAUX, C.; NOLTE, T.; MALARKEY, D.E.; KAUFMANN, W.; KUTTLER, K.; DESCHL, U.; NAKAE, D.; GREGSON, R.; VINLOVE, M.P.; BRIX, A.E.; SINGH, B.; BELPOGGI, F.; WARD, J.M. Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Hepatobiliary System. **Toxicol. Pathol.**, v. 38, p. 5s-81s, 2010.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TRESVENZOL, L.M.; PAULA, J.R.; RICARDO, A.F.; FERREIRA, H.D.; ZATTA, D.T. Estudo Sobre o Comércio Informal de Plantas Medicinais em Goiânia e Cidades Vizinhas. **Rev. El. Farm**, v. 3, n. 1, p.23-28, 2006.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

VALENTIN – SEVERIN, I.; HEGARAT, L. L.; LHUGUENOT, J. C.; BON, A. M; L.; CHAGNON. M; C. Use of HepG2 cell line for direct and indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutat. Res.**, v. 536. p. 79-90, 2003.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 27, n.1, p.1-7, 2006.

WILLIAMSON, E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phymed.**, v. 8, n. 5, p. 401–409, 2001.

WITTE, I.; PLAPPERT, U.; WALL, H.; HARTMANN, A. Genetic Toxicity Assessment: Employing the best science for human evaluation Part III: The Comet Assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicol. Sci.**, v. 97, p. 21-26, 2007.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais Sob a Ótica da Química medicinal Moderna**. 1 ed. Chapecó: Editora Aros, 2001.

ZHOU, S.; KOH, H.; GAO, Y.; GONG, Z.; LEE, E.J.D. Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. **Life Sci.**, v. 74, p. 935-968, 2004.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos realizando uma pesquisa na Faculdade de Filosofia e Ciências, Departamento de Fonoaudiologia, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Marília, intitulada “Investigação dos efeitos citotóxico e genotóxico do extrato de *Salix alba*: análises *in vitro*, *in vivo* e histológicas”, e gostaríamos que participasse da mesma. O(s) objetivo(s) desta é (são): Avaliar o potencial genotóxico e mutagênico do extrato da *Salix alba*, com e sem metabolização pela fração S9, em linfócitos humanos *in vitro*, por intermédio do ensaio cometa e do teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese. Participar desta pesquisa é uma opção. A única participação dos sujeitos humanos na pesquisa, será através da doação de 15 mL de sangue periférico. O sujeito doador poderá, a qualquer momento, solicitar que as células coletadas para os experimentos de mutagênese e antimutagênese não sejam mais utilizadas na referida pesquisa.

Caso aceite participar deste projeto de pesquisa, gostaríamos que soubesse que:

- a) Sua única participação na pesquisa será na doação de 15 mL de sangue periférico para estabelecimento de cultura temporária de linfócitos;
- b) Nos linfócitos em cultura, será verificado se o extrato da *Salix alba* é capaz de causar genotoxicidade no DNA das mesmas;
- c) A divulgação dos resultados científicos será feita através de resumos em Congressos e publicação de artigo científico em periódico internacional, sendo que, em nenhuma etapa, será divulgado o nome dos sujeitos doadores do sangue periférico utilizado para a cultura de linfócitos.

Eu, \_\_\_\_\_ portador do RG \_\_\_\_\_, autorizo a utilização dos linfócitos do sangue periférico que doei para o desenvolvimento da pesquisa intitulada “ Investigação dos efeitos citotóxico e genotóxico do extrato de *Salix alba*: análises *in vitro*, *in vivo* e histológicas” a ser realizada no Laboratório CEPEN, localizado no CEES, Campus II da UNESP de Marília. Declaro ter recebido as devidas explicações sobre os objetivos e

procedimentos metodológicos da referida pesquisa e informo que estou ciente que poderei solicitar a qualquer momento que as células por mim doadas não sejam mais utilizadas no referido experimento científico.

Nome do doador do sangue:

\_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Certos de poder contar com sua autorização, colocamo-nos à disposição para esclarecimentos, através do (s) telefone (s) 34021300 (Ramal 1676) ou 981282719, falar com Peterson Menezes Terrazas (aluno doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, UNESP, Botucatu) ou Dr. Edson Luis Maistro (Coordenador e Orientador do projeto, alocado no departamento de Fonoaudiologia da UNESP, FFC, Marília).

Autorizo,

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



\_\_\_\_\_  
Edson Luis Maistro – Docente responsável pelo projeto

\_\_\_\_\_  
Doador do sangue



## ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (*in vitro*)

### Parecer do Projeto nº. 0840/2013

IDENTIFICAÇÃO
1. Título do Projeto: Investigação dos efeitos genotóxico e protetor de danos ao DNA do extrato de Salix alba: análises in vitro e in vivo, histológicas e ultra-estruturais.
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:
Autor(a): Edson Luis Maistro
3. Instituição do Pesquisador: Faculdade de Filosofia e Ciências – UNESP/Marília
4. Apresentação ao CEP: 08/10/2013
5. Apresentar relatório em: Semestralmente durante a realização da pesquisa.
Objetivos
a) Avaliar o potencial genotóxico e antigenotóxico do extrato hidroalcoólico de folhas de Salix alba in vitro em linfócitos e células HepG2 humanas; b) Avaliar o potencial genotóxico do referido extrato in vivo em diferentes células somáticas (leucócitos de sangue periférico, fígado, cérebro e medula óssea) e germinativas (testículos) de camundongos; c) Analisar os efeitos citotóxicos e/ou protetores do extrato em células do fígado e da tireóide de camundongos, por meio da utilização de técnicas histológicas e ultraestruturais; d) Analisar a capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de Salix alba.

SUMÁRIO DO PROJETO
<p>A indústria farmacêutica busca na natureza substâncias passíveis de compor novos medicamentos. Para isso, ela encontra na medicina popular plantas já conhecidas por seus efeitos terapêuticos, que apesar de serem usadas por muitos anos, muitas vezes nunca foram avaliadas sob o aspecto farmacológico e toxicológico. Uma dessas plantas é Salix alba, conhecida pelo nome popular de salgueiro branco. Ela é conhecida por suas ações terapêuticas e usada popularmente para o tratamento de doenças como: reumatismo, dor, febre, resfriados, cefaléias, espasmos gastrointestinais, transtornos nervosos e na prevenção de tromboembolismos. Suas propriedades farmacológicas estão relacionadas à salicina, um dos principais componentes da Salix alba, um análogo precursor do mais amplo medicamento anti-inflamatório utilizado, o ácido acetil salicílico. Em relação à avaliação da toxicidade genética dessa planta, bem poucos estudos, tanto in vitro quanto in vivo, foram desenvolvidos e, em alguns casos, os resultados obtidos foram contrastantes. Considerando a potencial importância dessa espécie como fitoterápico, o fato de que vêm sendo utilizada tradicionalmente para fins medicinais por seres humanos e da constatação da escassez de estudos envolvendo a sua toxicidade genética, bem como possível proteção contra danos no DNA, o presente projeto foi elaborado visando avaliar o potencial genotóxico e antigenotóxico do extrato de Salix alba in vitro (em</p>

linfócitos e células HepG2 humanas) e in vivo (em diferentes células somáticas e germinativas de camundongos), através do Ensaio Cometa e do Teste do Micronúcleo. Além disso, serão analisados os efeitos citotóxicos e/ou protetores do extrato em células do fígado e da tireóide de camundongos, por meio da utilização de técnicas histológicas e ultra-estruturais, bem como a avaliação da atividade antioxidante, quantificada através do método de captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-1-picril-hidrazila).

**COMENTÁRIO DO RELATOR**

O projeto está de acordo com as exigências éticas e científicas fundamentais resguardadas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, atendendo aos itens referentes às implicações da ética em pesquisas que envolvem seres humanos, recomendo a aprovação do mesmo pelo CEP.

**PARECER FINAL**

O CEP da FFC da UNESP após acatar o parecer do membro relator previamente aprovado para o presente estudo e atendendo a todos os dispositivos das resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido como também todos os anexos incluídos na pesquisa resolve aprovar o projeto de pesquisa supracitado.

**INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES****DATA DA REUNIÃO**

Homologado na reunião do CEP da FFC da Unesp em 04/12/2013.

  
Simone Aparecida Capellini  
Presidente do CEP

José Carlos Miguel  
Diretor da FFC

**ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (*in vivo*)**

SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO,  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA

FACULDADE DE MEDICINA DE MARÍLIA  
Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

---

Marília, 29 de Março de 2011

Ilmo(º) Sr.(º)  
Prof. Dr. Edson Luis Maistro  
Marília/SP

O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Marília, recebeu o protocolo de estudo nº 105/11, intitulado: "Estudo do Potencial Genotóxico e Antigenotóxico do Extrato de Salix Alba e do Extrato de Rubus Niveus em Diferentes Células de Camundongos *in Vivo*", foi considerado **APROVADO** em Reunião Ordinária – 28/03/2011, de acordo com a Resolução 196/96 e suas Complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Sendo só para o momento, reiteramos protestos de consideração e apreço.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Valdeir Fagundes de Queiroz", is written over a horizontal line.

**Prof. Dr. Valdeir Fagundes de Queiroz**  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa  
Envolvendo Seres Humanos