



**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**



**unesp**

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 Tripan. 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.

## **1.2 Considerações gerais sobre plantas do gênero *Salix* e a espécie *Salix alba* L.**

São encontradas 150 espécies de *Salix* no hemisfério ocidental e cerca de 400 em todo o mundo. Estas espécies, que são importantes na recomposição de áreas ciliares degradadas, possuem tamanhos variados, podendo chegar a ter mais de 30 m de altura e são encontradas principalmente em regiões de clima temperado e frio, crescendo em ambientes úmidos, especialmente ao longo das margens dos córregos e rios. O salgueiro, como é popularmente conhecido, é uma árvore ornamental nativa da Grã-Bretanha, região central e sul da Europa, Ásia e América do Norte. As espécies do gênero *Salix* pertencem à família *Salicaceae*, sendo que a diferenciação entre as

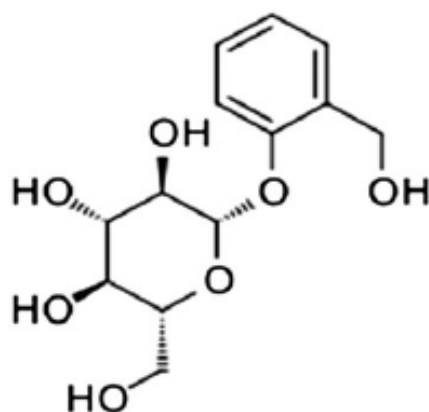
espécies é difícil de ser realizada devido à alta variabilidade e hibridação entre os gêneros. Para a sua diferenciação podemos observar algumas características, como habitat, posição, forma, margem e pubescência da folha, a morfologia bráctea, número de estames, forma e pubescência do ovário (SANTOS et al., 2005; KENSTAVICIENE et al., 2009).

A *Salix alba* L., conhecida pelo nome popular de salgueiro branco (figura 1), é uma planta historicamente utilizada para fins terapêuticos, sendo seu uso direcionado para o tratamento de febre, doenças e infecções de pele, doenças inflamatórias crônicas e agudas, como osteoartrite, tendinite, dores em geral, dores lombar, dores em articulações, dores de cabeça, cólicas menstruais, gripes, entre outros (AGNOLET et al., 2012; DRUMMOND et al., 2013; QURESHI et al., 2015; SHARA; STOHS, 2015). Suas propriedades analgésica, antipiréticas e anti-inflamatórias podem estar relacionadas à salicina (figura 2), principal componente da *Salix alba* L. um análogo precursor do mais amplo medicamento anti-inflamatório utilizado, o ácido acetilsalicílico (figura 3) (HEDNER; EVERTS, 1998; SOUZA et al., 2009; SHARA; STOHS, 2015). Outras substâncias também encontradas no extrato da *Salix alba* L. podem explicar melhor os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios desse extrato, como os flavonóides e taninos (WILLIAMSON, 2001; AGNOLET et al., 2012; DRUMMOND et al., 2013).

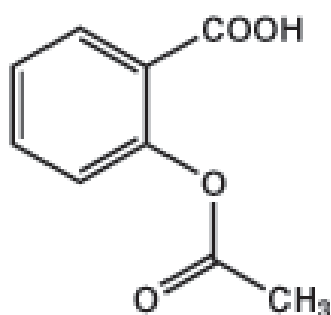
**Figura 1** - Salgueiro branco e suas folhas



Fonte: QURESHI et al., 2015

**Figura 2** - Estrutura química da Salicina

Fonte: SHARA; STOHS, 2015

**Figura 3** - Estrutura química do Ácido Acetilsalicílico

Fonte: BARREIRO; BOLZANI, 2009

Os efeitos anti-inflamatórios da *Salix alba* L. foram avaliados em neutrófilos de ovinos, onde o extrato da casca (nas concentrações entre 2,23 a 60  $\mu\text{g/mL}$ ) inibiu a atividade metabólica dessas células. O extrato, na concentração de 17,77  $\mu\text{g/mL}$ , inibiu a adesão de neutrófilos e também diminuiu a produção de EROs em cultura de neutrófilos tratada com 55,94  $\mu\text{g/mL}$ , demonstrando que esse extrato possui alta atividade anti-inflamatória (FARINACCI et al., 2008). A ação anti-inflamatória do extrato da *Salix alba* L. também foi observada em cultura de condrócitos de cães, onde o extrato inibiu a ação inflamatória da citocina IL-1. O extrato da casca, na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , também não demonstrou efeitos citotóxicos e não causou alterações ultraestruturais nessas células (SHAKIBAEI et al., 2012).



O extrato da casca da *Salix purpurea* (Proaktiv®), nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µg/mL, exibiu efeito anti-inflamatório em culturas de monócitos ativados, inibindo TNF-α, COX-2 e NF-κB. Além disso, o extrato induziu a apoptose nos monócitos ativados (BONATERRA et al., 2010). Em um trabalho seguinte, usando o mesmo extrato, nas concentrações de 10 e 50 µg/mL, o efeito anti-inflamatório em cultura de células endoteliais de microcapilares humanos (HMEC-1) foi demonstrado através de inibição da expressão da molécula de adesão ICAM-1 (FREISCHMIDT et al., 2012).

O extrato da casca da *Salix alba* L., nas concentrações de 10 e 50 µL, exibiu atividade anti-inflamatória em cultura de células de leucemia humana THP-1 (monocítica aguda), diminuindo a produção de IL-6 e TNF-α (DRUMMOND et al., 2013).

Pacientes com dor lombar (lombalgia) por mais de 6 meses, foram divididos em 2 grupos, onde um foi tratado com o fitoterápico Assalix® (extrato da *Salix* contendo 240 mg salicina) e o outro com Rofecoxib, um medicamento anti-inflamatório sintético específico para esse tipo de inflamação, por 4 semanas. O tratamento com o fitoterápico se mostrou tão eficaz quanto ao com o medicamento sintético, sendo o tratamento com o Assalix® mais barato (CHRUBASIK et al., 2001). Pacientes com osteoartrite tratados com *Salix purpurea x daphnoides* (contendo 240 mg salicina) por 2 semanas e avaliados pelo questionário de WOMAC, relataram melhora física funcional e na dor. O mesmo efeito não foi encontrado no grupo tratado com placebo. O extrato foi bem tolerado, não sendo encontradas alterações clínicas e laboratoriais relevantes (SCHMID et al., 2001). Pacientes com dores articulares foram tratados, por 8 semanas, com o suplemento comercial Instaflex™ Joint Support. Esse suplemento contém (em 3 cápsulas), 250 mg do extrato da *Salix alba* L., 1500 mg de Sulfato de glucosamina, 500 mg de metilsulfonilmetano, 50 mg de concentrado de raiz de gengibre, 125 mg de extrato de boswellia serrata, 50 mg de extrato da raiz de açafreão, 50 mg de caiena e 4 mg de ácido hialurônico. Os pacientes demonstraram melhora física funcional e na dor, através de questionários e avaliação física. Entretanto, não foi possível determinar a contribuição da *Salix alba* L. devido a complexidade do suplemento (NIEMAN et al., 2013).

Nascimento et al. (2009) avaliaram a toxicologia clínica do Pasalix®, um fitoterápico utilizado no tratamento da ansiedade e insônia, que contém em sua composição a *Passiflora incarnata* (100 mg), *Crataegus oxyacantha* (30mg) e *Salix alba* L. (100 mg). Os pacientes, sadios, foram tratados por 4 semanas com os fitoterápicos (4 comprimidos ao dia). Alguns efeitos adversos foram relatados pelos

voluntários, como sonolência, epigastralgia, agitação, rash cutâneo e cefaléia, mas esses foram considerados de intensidade leve e poderiam estar relacionados a outros problemas de saúde que os voluntários apresentaram durante o trabalho. Apesar desses efeitos, a administração do fitoterápico não demonstrou sinais de toxicidade nos exames clínicos, eletrocardiográficos e laboratoriais. Mesmo não existindo estudos específicos que relacionem o uso isolado do extrato da *Salix alba* L. e a perda de peso, essa pode ser encontrada em suplementos, em doses entre 50 e 1800 mg, utilizados para esse fim. Ela é utilizada, provavelmente, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e analgésicos, o que aumenta a tolerância à dor e por consequência estimula o indivíduo a manter sua rotina de exercícios. O seu uso é apenas contra indicado para pessoas alérgicas ao ácido acetilsalicílico, com problemas de coagulação e hemorragia e menores de 16 anos, devido à síndrome de Reye, síndrome de causa desconhecida, que afeta crianças que utilizam o ácido acetilsalicílico durante uma infecção, como a gripe (SHARPE et al., 2006; SHARA; STOHS, 2015).

El-Shemy et al. (2007) relataram que 100 µL do extrato de folhas da *Salix safsaf* possui ação antiproliferativa em cultura de células leucêmicas (mielóide e linfóide aguda), sendo que o mesmo efeito não foi encontrado em cultura de células saudáveis. O mesmo extrato (doses de 200 e 600 µL) diminuiu o crescimento do tumor ascítico de Ehrlich transplantado em camundongos e ainda adiou a morte deles em 4 semanas, em relação ao grupo controle. Atividade similar foi encontrada por Hostanska et al. (2007), onde a atividade antiproliferativa e apoptótica do extrato da casca *Salix purpurea* (concentrações entre 50 - 243 µg/ml) foram avaliadas e confirmada em células do câncer do cólon (HT 29 e HCT 116) e pulmão (A549 e SW2).

Nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL, o extrato do pólen de abelha da *Salix alba* L. (80% de *Salix alba*) demonstrou efeitos antimutagênicos em culturas de linfócitos humanos tratados com BMC, MTC e VNC, drogas utilizadas no tratamento do câncer e que são conhecidas por causar danos no DNA. O extrato não demonstrou efeitos citotóxicos e nem aumentou a frequência de micronúcleos nessa mesma cultura. Além disso, o extrato na concentração de 660 µg/mL, apresentou efeito anti-estrogênico em cultura de leveduras RMY326, efeito importante na prevenção e tratamento do câncer de mama (PINTO et al., 2010).

A própolis (1875 e 7500 µg/mL), cuja uma das fontes foi a *Salix alba* L., demonstrou baixa atividade antimicrobiana em colônias de *E. coli* ATCC25922. (SILICI; KUTLUCA, 2005). Em outro trabalho, o efeito protetor de 11,6 mg/mL do

extrato da *Salix alba* L. foi avaliado em cultura de *E. coli* AB1157 tratadas com SnCl<sub>2</sub>, um agente redutor de radiofármacos. O extrato não foi capaz de proteger as colônias dos efeitos danosos do SnCl<sub>2</sub>, mas não influenciaram o crescimento das colônias tratadas apenas com o extrato (SOUZA et al., 2009).

Além dos efeitos anti-inflamatórios, 1 mg/mL do extrato da casca da *Salix alba* L. apresentou atividade antioxidante, através dos métodos de FRAP e DPPH, e também apresentou, através do método de Ellman, moderada atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (percentual de inibição de 50,8 %), sendo uma ação importante no tratamento na doença de Alzheimer (JUKIC et al., 2012).

Ishikado et al. (2012) relataram que 100 µg/ml do extrato da casca da *Salix* preveniu o estresse oxidativo, induzido por TBHP, em cultura de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). O mesmo extrato, na concentração de 10 mg/mL, também demonstrou o mesmo efeito em cultura do nematóide *Caenorhabditis elegans*. Em outro trabalho, 25 mg/mL do extrato da folha da *Salix X sepulcralis* demonstrou limitado efeito anti-helmíntico em cultura de *Caenorhabditis elegans*. Apesar disso, o extrato demonstrou alta capacidade antioxidante no método ORAC (KATIKI et al., 2013).

O extrato da *Salix alba* L. (Astressyl®) também demonstrou efeitos sobre os níveis da proteína de choque térmico HSP47, uma proteína relacionada com a preservação da sobrevivência celular sob condições adversas. Os níveis dessa proteína se elevaram em cultura de fibroblastos tratados com o 2% do extrato (NIZARD et al., 2004)

### 1.3 Genética toxicológica e Mutagênese

Nosso material genético é exposto a diferentes agentes com capacidade mutagênica. Esses agentes podem estar presentes em medicações sintéticas e de origem natural, drogas ilícitas e bebidas alcoólicas. As fontes de radiações, como o sol e os alimentos, devido a sua composição, preparo ou contaminantes, também podem causar danos ao material genético (FERGUSON; PHILPOTT; KARUNASINGHE, 2004; DUSMAN et al., 2012; GUIDOTI et al., 2014).

Os danos causados no material genético podem ser em apenas um gene ou em um cromossomo inteiro e a mutação pode surgir quando esses danos não são reparados (LEWIN, 2003; GRISOLIA, 2005). Essas mutações podem ocorrer em qualquer estágio

do ciclo celular e podem afetar células somáticas, causando alterações genéticas não transmissíveis, como tumores, doenças degenerativas crônicas e envelhecimento precoce ou células germinativas, causando alterações hereditárias (DE FLORA; FERGUSON, 2005; DUSMAN et al., 2012).

O DNA não é uma molécula estática e frequentemente é exposto a diferentes agentes químicos, biológicos e físicos externos, além do próprio ambiente celular, que podem causar alterações e danos em suas bases (GOMES, 2007; MALACINSKI, 2011). Existem dois tipos de mutações, as espontâneas, que ocorrem devido às funções celulares normais e também devido à interação ambiental, e as induzidas, que ocorrem devido à participação de agentes mutagênicos. Por outro lado, nossas células desenvolveram mecanismos para reparar danos no DNA, podendo evitar ou reverter essas possíveis mutações (PINTO; FELZENSZWALB, 2003; BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006).

É importante lembrar que as mutações ocorrem naturalmente durante a evolução dos seres vivos, sendo essas necessárias para a variabilidade e diversidade das espécies (MARTIN, 1996; PACHECO et al., 2009).

Originalmente utilizado por Novick e Szilard (1952), o termo antimutagênico se refere às substâncias, químicas ou sintéticas, que de alguma maneira reduzam, revertam ou até mesmo impeçam o desenvolvimento da mutação (SPORN; SUH, 2002). Já a genotoxicidade é um termo relacionado aos danos induzidos no material genético, mas nem sempre associado à mutagenicidade (SCCNFP, 2003). Os agentes genotóxicos causam lesões primárias no DNA, que podem ser reparadas, mas se isso não ocorrer, mutações podem surgir.

A mutagênese tem forte relação com a carcinogênese, pois o processo de carcinogênese se inicia após lesões irreversíveis ao material genético e sucessivas divisões e proliferações celulares (GONTIJO; TICE, 2003; SARASIN, 2003). Além disso, existe também, uma forte relação entre mutagênese, doenças degenerativas e doenças autoimunes (DE FLORA; FERGUNSON, 2005)

Devido a isso, é de suma importância à identificação e o estabelecimento de normas para a utilização dos agentes potencialmente mutagênicos, entendendo os processos mutacionais e os fatores desencadeadores, através de teste genotóxicos e mutagênicos (MacGREGOR; CASCIANO; MULLER, 2000; ERDTMANN, 2003; BRAMBILLA; MARTELLI, 2009; FERNANDES, 2005).

Na mutagênese, os agentes ambientais, como os químicos, biológicos e físicos capazes de causar danos permanentes no DNA são estudados, bem como seus mecanismos de ação. Além disso, nos mesmos ensaios, a ação de agentes ambientais antimutagênicos ou quimiopreventivos podem também ser avaliados (SPORN; SUH, 2002; FRANCY-GUILFORD; PEZZUTO, 2008).

Dentre os importantes testes de avaliação de toxicidade genética, pode-se destacar o teste do micronúcleo, que é utilizado para avaliar o potencial clastogênico/aneugênico, e o ensaio do cometa, que é utilizado para avaliar o potencial genotóxico de diferentes substâncias, tanto *in vivo*, como *in vitro*.

As avaliações *in vitro* apresentam algumas vantagens sobre as avaliações *in vivo*, pois é possível o tratamento com diferentes doses e combinações de substâncias, o tratamento com variações de tempo e em diferentes fases do ciclo celular, além de ser possível testar um maior número de substâncias em um menor período. Apesar dos resultados observados nos testes *in vitro* não poderem ser transmitidos diretamente para os animais, esses são importantes como referência para as avaliações *in vivo* (ROGERO *et al.*, 2003).

### **1.3.1 Ensaio do Cometa**

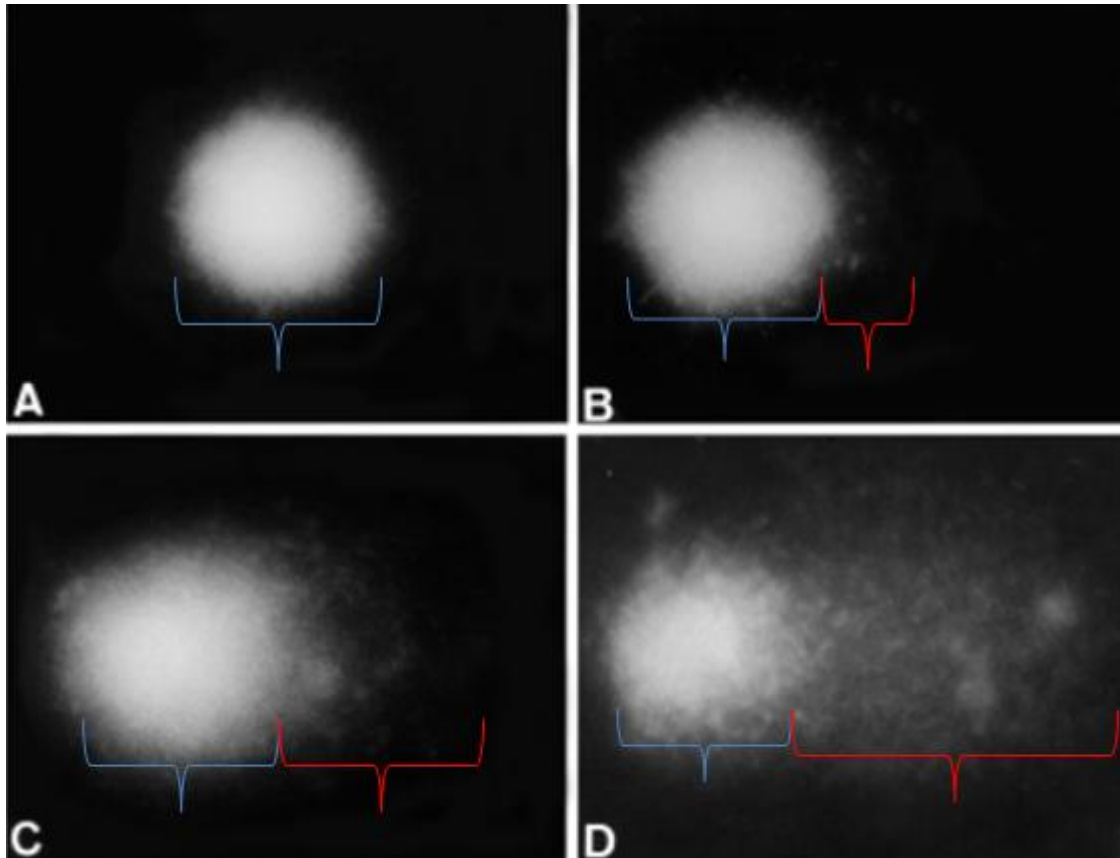
O ensaio cometa desenvolvido por Rydberg e Johanson (1978) e modificado por Östling e Johanson (1984), avalia o potencial genotóxico de substâncias químicas ou radiação sobre células de mamíferos. Apesar de ser mais comum o teste ser usado em animais, alguns métodos foram desenvolvidos para seu uso também em células vegetais (GICHNER; PLEWA, 1998). Em sua primeira modificação, apenas danos em DNA de fita dupla eram detectados, mas após nova modificação, agora por Singh *et al.* (1988), foi possível também a detecção de danos no DNA de fita simples (TICE *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2017; ROUX *et al.*, 2017).

Essa técnica é baseada na eletroforese de células em lise embebidas no gel de agarose, onde fica evidenciada a corrida dos fragmentos de DNA, que se afastam do seu núcleo principal. Os fragmentos de DNA de fita dupla e simples que se quebraram, migram para o ânodo, dando origem a uma imagem semelhante a um cometa (OLIVE; BANATH; DURAND, 1990; KLAUDE *et al.*, 1996; DOLAI; ISLAM; HALDAR, 2016).

Considerado um ensaio relativamente rápido, simples e sensível, o ensaio cometa permite a análise de danos no DNA em todos os tipos celulares, não sendo necessário o uso de células em proliferação, como no teste de micronúcleo e ainda pode ser usado em experimentos *in vitro* e *in vivo* (WITTE et al., 2007; DHAWAN et al., 2008; DOLAI, ISLAM; HALDAR, 2016).

O cometa é dividido em cabeça e cauda (quando há dano). O tamanho da cauda indica a quantidade do dano, sendo que células sem cauda são consideradas livres de danos. Numa classificação visual, os cometas observados são divididos em 4 classes (figura 4): classe 0, que são as células que não possuem cauda, ou seja, sem dano; classe 1, que são células com uma cauda menor que a cabeça, ou seja, com dano mínimo; classe 2, que são as células com uma cauda até duas vezes maior que a cabeça, ou seja, com dano moderado; e classe 3, que são células com cauda duas vezes maior que a cabeça, ou seja, com danos máximos (SPEIT et al., 1996; ROUX et al., 2017)

**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. Células sanguíneas de *Ctenomys torquatus*. Aumento: 200x



Fonte: SILVA et al., 2000 (adaptado pelo autor).

### 1.3.2 Ensaio do Micronúcleo (MN)

O Teste do Micronúcleo é o ensaio mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos, sendo internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendados para avaliação do potencial mutagênico, para o registro de novos produtos químicos que entram no mercado mundial (CHOY, 2001).

Os micronúcleos são resultantes de dois fenômenos básicos nas células mitóticas: quebra cromossômica e disfunção do aparato mitótico. São formados pelos cromossomos acêntricos ou fragmentos cromatídicos e cromossomos inteiros ou cromátides que se atrasam na anáfase e são excluídos do núcleo-filho na telófase (FENECH, 2000, PINTO et al., 2010).

Durante o Teste de Micronúcleo apenas a presença ou ausência de micronúcleo é relatada, pois não é possível observar a diferença entre os efeitos aneugênicos e clastogênicos sem o uso de sondas específicas, e apesar disso, um teste micronúcleo positivo pode ser considerado mutagênico (VALENTIN–SEVERIN et al., 2003; MATEUCA et al., 2006).

Valentin-Severin et al. (2003) salientaram que a diferença entre os testes do cometa e do micronúcleo consiste basicamente no tipo de alteração detectada no DNA: o teste do cometa detecta lesões primárias, que muitas vezes são reparáveis, enquanto o teste do micronúcleo detecta lesões irreparáveis.

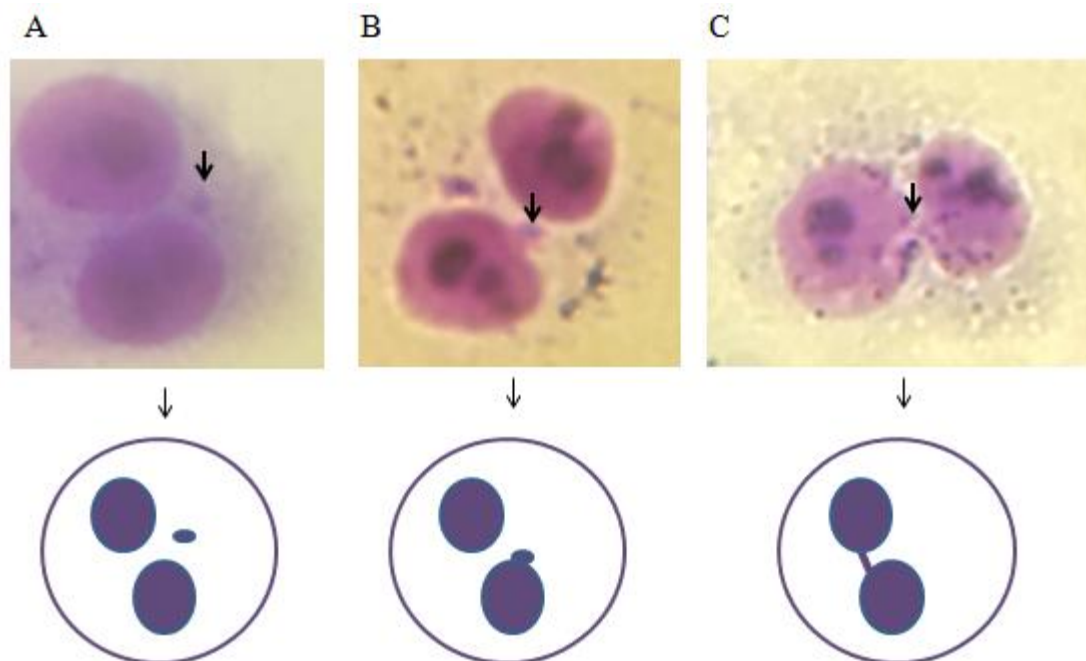
O teste de micronúcleo, desenvolvido por Schmid et al. (1971) e modificado por Heddle (1973), pode ser realizado tanto *in vitro* como *in vivo*, onde os ensaios *in vivo* são realizados em células da medula óssea ou sangue periférico de roedores e os ensaios *in vitro* são realizados em cultura de células mamíferos, como células do câncer hepático (HepG2) e células mononucleares do sangue periférico (MAISTRO, 2014; ALMEIDA et al., 2014). O Teste do Micronúcleo pode ser realizado em qualquer população celular em proliferação, mas a análise deve ser realizada após um único ciclo de divisão, pois não é possível afirmar que esse micronúcleo permanecerá por mais de um ciclo (FENECH, 2000).

Como a divisão celular é necessária e obrigatória, a citocalasina-B foi introduzida na cultura de células *in vitro*, onde o bloqueio da citocinese permite o aparecimento de células binucleadas e confirma a presença de divisão celular (FENECH; MOLEY, 1985).

Os efeitos dos agentes mutagênicos são observados em eritrócitos policromáticos, nos ensaios *in vivo*, devido à vida relativamente curta dessas células. Além da contagem de micronúcleos, no ensaio *in vivo*, a avaliação da citotoxicidade também é realizada através da relação eritrócitos policromáticos/eritrócitos normocromáticos (CHOY, 2001; OECD 474, 2014). Já no ensaio *in vitro*, a presença de micronúcleos, brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas é observada em células binucleadas (figura 5) e a avaliação da citotoxicidade é realizada através do IDN, onde é feito uma relação entre as células mononucleadas (presença de apenas 1 núcleo), binucleadas (presença de 2 núcleos), trinucleadas (presença de 3 núcleos) e tetranucleadas (presença de 4 núcleos) (FENECH, 2006; OECD 487, 2014).

O Teste do Micronúcleo, tanto em *in vivo* como *in vitro*, é recomendado pela OECD para a avaliação da capacidade mutagênica de novas substâncias químicas utilizadas pelas indústrias alimentícia e farmacêutica (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011; OECD 474, 2014).

**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.





## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Considerando a potencial importância da espécie de planta *Salix alba* L. como fitoterápico para seres humanos, com princípios ativos de ação comprovada para várias doenças, a escassez de estudos *in vitro* e a inexistência de estudos *in vivo* envolvendo a toxicidade genética do extrato da casca desta planta em células eucariontes, o presente estudo foi desenvolvido visando:

Avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do extrato de cascas da *Salix alba* L., em testes *in vitro*, em células com e sem metabolização por enzimas hepáticas; e *in vivo* em diferentes células somáticas e germinativas de camundongos.

### 2.2 Objetivos Específicos

a) Verificar a citotoxicidade do extrato da casca da *Salix alba* L. em cultura de células mononucleares do sangue periférico humano e de células HepG2, *in vitro*, com a utilização do teste do MTT;

b) Avaliar o potencial genotóxico do extrato da casca da *Salix alba* L. em cultura de células mononucleares do sangue periférico humano e de células HepG2, *in vitro*, com a utilização do Ensaio do Cometa;

c) Investigar o potencial clastogênico/aneugênico do extrato da casca da *Salix alba* L. em cultura de células mononucleares do sangue periférico humano e de células HepG2, *in vitro*, com a utilização do Teste do Micronúcleo;

d) Avaliar o potencial genotóxico do extrato da casca da *Salix alba* L. em diferentes células somáticas (leucócitos de sangue periférico, fígado, coração e medula óssea) e germinativas (testículos) de camundongos, *in vivo*, com a utilização Ensaio do Cometa;

e) Investigar o potencial clastogênico/aneugênico do extrato da casca da *Salix alba* L. em células da medula óssea de camundongos, *in vivo*, com a utilização do Teste do Micronúcleo;

f) Analisar os efeitos citotóxicos do extrato da casca da *Salix alba* L. em células do fígado de camundongos, por meio da utilização de técnicas histológicas e histoquímicas.

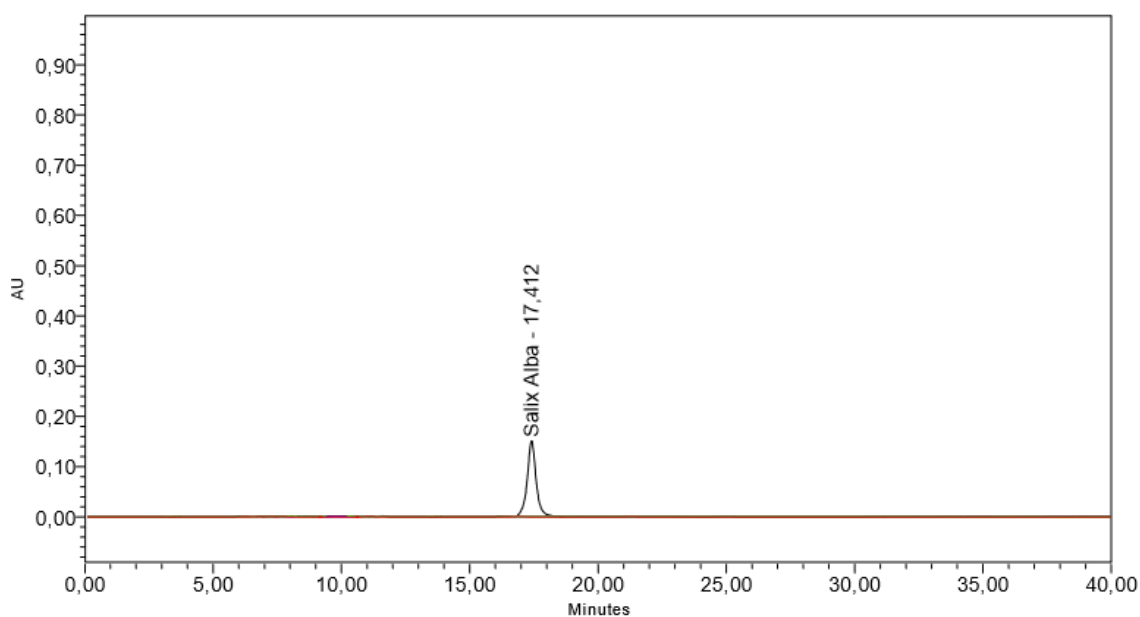
### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Comitê de Ética e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

O projeto *in vitro*, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Marília, sob o número 840/2013 (ANEXO A) e os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A). O projeto *in vivo*, foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), sob o número 105/11 (ANEXO B).

#### **3.2 O extrato de *Salix alba* L.**

A obtenção e a caracterização fitoquímica do extrato de *Salix alba* L. foi realizada no laboratório de farmacologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Campus Diadema, sob a coordenação do Professor Doutor Fábio Ferreira Perazzo, colaborador neste projeto. A cromatografia em camada delgada foi utilizada para a determinação química do extrato e seu doseamento foi realizado pela cromatografia líquida de alta eficiência. O extrato, adquirido da empresa Centroflora (Botucatu, SP, Brasil), apresentou uma concentração de 4,94 mg/mL de salicina (figura 6).

**Figura 6** - Doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência

Fonte: Doutor Fábio Ferreira Perazzo

### 3.3 Ensaios *in vitro*

As células mononucleares do sangue periférico humano (veia basilica mediana do membro superior) foram obtidas de 2 doadores (1 homem e 1 mulher) saudáveis e jovens, entre 18 e 25 anos. Os doadores não apresentavam histórico de doenças, não fumavam, não faziam uso de medicamentos e não foram expostos a radiação ionizante recentemente.

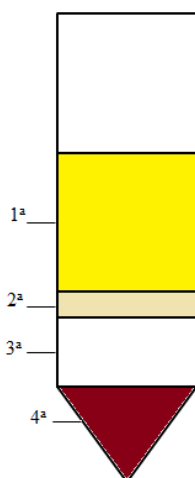
As células do hepatocarcinoma humano (HepG2), foram obtidas junto ao Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e conservadas em nitrogênio líquido.

### 3.4 Obtenção das Células mononucleares do sangue periférico humano para o teste do Azul de Tripán e o Ensaio do Cometa

Foram coletados 9 mL do sangue periférico dos 2 voluntários com seringa contendo heparina. Esse sangue foi dividido em 3 tubos (3 mL cada) que continham 3 mL de Histopaque®-1077. Os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 1900 rpm. O Histopaque e a centrifugação permitiu que o sangue fosse dividido em 4 camadas. O plasma e as plaquetas ficaram na primeira camada (1<sup>a</sup>), as células mononucleares

ficaram na segunda camada (2<sup>a</sup>), o Histopaque ficou na terceira camada (3<sup>a</sup>) e as hemácias e o restante dos leucócitos ficaram na última camada (4<sup>a</sup>), no fim do tubo (figura 7). As células mononucleares foram separadas e colocadas em 3 novos tubos com 3 mL de meio RPMI 1640 cada e foram centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. Após descartar o sobrenadante, 1 ml do meio e o pellet sobraram no fim do tubo. O volume dos 3 tubos foram colocados em um só tubo.

**Figura 7** - Camadas dos elementos sanguíneos após centrifugação. 1<sup>a</sup> - plasma e plaquetas. 2<sup>a</sup> - células mononucleares. 3<sup>a</sup> - Histopaque. 4<sup>a</sup> - Hemácias e leucócitos



Para determinar a densidade celular utilizada em cada teste, 10  $\mu$ L do volume do tubo (contendo o pellet dos 3 tubos com o meio) foram misturados a 10  $\mu$ L do corante Azul de Tripán e a contagem do número de células foi realizada na câmara de Neubauer. Por fim, o cálculo foi realizado pela regra de 3 (figura 8).

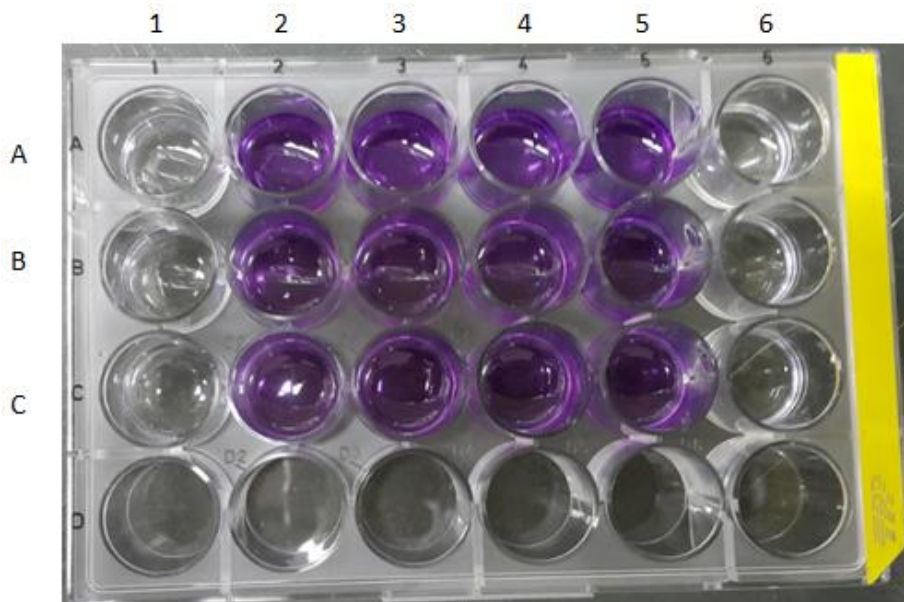
**Figura 8** - Cálculo da densidade celular pela regra de 3

<p>média das células contadas (Neubauer) x <math>10^4</math> - volume do tubo (com os 3 pellets)</p> <div style="text-align: center; margin: 10px 0;"> </div> <p>densidade celular necessária (em cada teste) - volume pipetado (em cada teste)</p>
---

### 3.5 Determinação da citotoxicidade pelo teste de conversão do MTT e pelo teste do Azul de Tripán

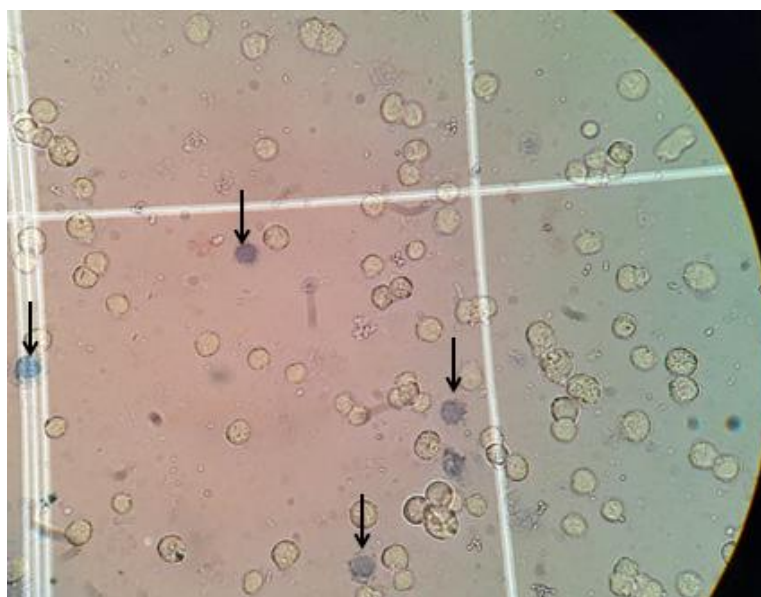
O teste do MTT utilizado foi descrito por Mosmann (1983) e modificado por Denizot e Lang (1986). No teste, o MTT é reduzido pela enzima desidrogenase mitocondrial das células que estão vivas, formando cristais de formazan, que conferem uma cor roxa a solução (figura 9). A quantidade desses cristais é determinada por espectrofotômetro, demonstrando assim, a quantidade de células vivas (FREIMOSER et al., 1999; DIAS et al., 2016). As células HepG2 foram cultivadas, na concentração de  $1 \times 10^5$ , em placa com 24 poços que continham o meio de cultura MEM, suplementado com 15% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico, 1% de piruvato de sódio e 2,2 mg/mL de  $\text{NaHCO}_3$  (meio completo) por 24 horas, em estufa umidificada a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após essa incubação o meio foi descartado e os tratamentos com o extrato de *Salix alba* L. (na concentrações de 5, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ), com o controle negativo (meio de cultura) e com o controle positivo com Triton X-100 a 1% foram realizados. Novo meio de cultura completo foi adicionado em cada poço com os tratamentos e com os controles, sendo também adicionado em 3 poços apenas meio de cultura MEM (branco). A placa foi novamente cultivada por 24 horas e o meio de cultura foi retirado mais uma vez. O MTT (150  $\mu\text{L}$ ) foi adicionado em todos os poços e a placa mais uma vez foi incubada por 4 horas. Após esse período, o MTT foi retirado e o DMSO (100  $\mu\text{L}$ ) foi adicionado em todos os poços. A placa foi agitada por 15 minutos e a leitura foi realizada, com o comprimento de onda de 550 nm, em espectrofotômetro (Epoch). O número de células viáveis foi calculado usando a média das absorbâncias. Todos os tratamentos, controles e branco foram feitos em triplicata.

**Figura 9** - Teste do MTT. 1 (coluna com controle positivo); 2 (coluna com controle negativo); 3 (coluna com a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ ); 4 (coluna com a concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ ); 5 (coluna com a concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$ ) e 6 (coluna com o branco).



No teste do Azul de Tripán, as células mortas perdem a integridade da membrana celular, permitindo assim que o corante (azul de tripan) penetre em seu citoplasma. As células mortas ficam na cor azul e as células vivas não são coradas (figura 10) (McKELVEY-MARTIN et al., 1993; AVELAR-FREITAS et al., 2014). As células mononucleares foram cultivadas na concentração de  $1 \times 10^5$ , em placa com 24 poços, por 24 horas, em estufa umidificada a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Os poços continham o meio RPMI 1640 suplementado com 15% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (meio completo). Após esse período, os tratamentos com o extrato de *Salix alba* L. (2,5; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ ), com o controle negativo (meio de cultura) e com o controle positivo com Triton X - 100 a 1% foram realizados. Após 24 horas de exposição com as diferentes concentrações, 10  $\mu\text{L}$  das células, de cada concentração, foi misturado a 10  $\mu\text{L}$  do corante Azul de Tripán. Forem contadas 100 células em câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico comum. Todos os tratamentos foram feitos em triplicata. Para os testes de genotoxicidade, a viabilidade celular indicada é de  $\geq 80\%$ , tanto no teste do MTT, como no teste do Azul de Tripán

**Figura 10** - Teste do azul de Tripán. Coradas e marcadas pelas setas, as células mortas. As células vivas não estão coradas.



### 3.6 Cultura celular e tratamentos para o ensaio do cometa *in vitro*

A metodologia utilizada foi descrita por Singh et al. (1988) e Klaude et al. (1996). As células mononucleares foram cultivadas, na concentração de  $1 \times 10^5$ , em placa com 24 poços que continham o meio RPMI 1640 suplementado com 15% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico por 24 horas, em estufa umidificada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, os tratamentos com o extrato de *Salix alba* L. (5, 50 e 100 µg/mL), com o controle negativo (meio de cultura) e com o controle positivo com MMS (45 µM) foram realizados. A exposição ao tratamento e aos controles foi de 4 horas e após isso, as células mononucleares foram transferidas para tubos (os poços foram lavados com 500 µL de PBS a 37 °C) e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm.

As células HepG2 foram cultivadas na mesma concentração e no mesmo tipo de placa usada na cultura de células mononucleares, mas o meio utilizado foi o MEM, suplementado com 15% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico, 1% de piruvato de sódio e 2,2 mg/mL de NaHCO<sub>3</sub>. O tempo de tratamento, concentrações e controles foram semelhantes ao das células mononucleares. Após 4 horas de exposição aos tratamentos e controles, o meio de cultura foi desprezado e os poços também foram

lavados com 500  $\mu\text{L}$  de PBS. O PBS foi descartado em seguida e os poços foram lavados com 200  $\mu\text{L}$  de tripsina EDTA 0,5%, para despreparar as células aderidas nos poços, e a placa foi novamente incubada por 5 minutos. A tripsina foi neutralizada com 1,5 do meio MEM com soro bovino. As células foram transferidas para tubos e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm.

De cada tubo, dos dois tipos celulares e após descartar o sobrenadante, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da suspensão celular foi retirada e misturada a 100  $\mu\text{L}$  de agarose LMP 5% a 37 °C, sendo essa, em seguida, depositada sobre uma lâmina pré-gelatinizada com agarose normal 1,5%. As lâminas foram cobertas por lamínulas e levadas para refrigeração a 4 °C por 20 minutos, para endurecimento do agarose.

As lamínulas foram retiradas com cuidado e as lâminas foram colocadas em solução de lise em refrigerador a 4 °C durante 1 hora. Após a lise, as lâminas foram colocadas em cuba de eletroforese com o tampão de eletroforese. O DNA foi deixado para desnaturar em  $\text{pH} > 13$ , por 20 minutos e em seguida se deu início a corrida de eletroforese, com 25 volts e 300 miliamperes, por 20 minutos.

As lâminas foram retiradas da cuba e neutralizadas, por 3 vezes, com 5 ml de solução de neutralização (Tris 0,4 M) por 5 minutos e após secarem, foram fixadas com etanol absoluto por 10 minutos.

Para a análise, as lâminas foram coradas com 100  $\mu\text{L}$  de brometo de etídio, cobertas com lamínula e a leitura foi realizada em aumento de 400x em microscópio de fluorescência (filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm).

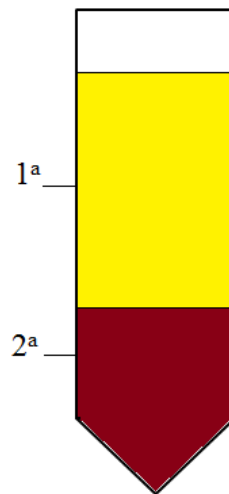
Foram analisadas 150 células de cada tratamento e os cometas foram classificados de acordo com a descrição no item 1.3.1. Os experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata e o *in vivo* em duplicata.

### **3.7 Obtenção das Células mononucleares do sangue periférico humano para o teste do micronúcleo**

Foram coletados 10 mL do sangue periférico dos 2 voluntários com seringa contendo heparina. O sangue foi colocado em um tubo e ficou em repouso na posição vertical por 4 horas e 2 camadas surgiram (figura 11). O plasma ficou na primeira camada (1<sup>a</sup>) e o concentrado de hemácias (incluindo as células mononucleares) ficaram na segunda camada (2<sup>a</sup>).



**Figura 11** - Camadas dos elementos sanguíneos após repouso. 1<sup>a</sup> - plasma. 2<sup>a</sup> - concentrado de hemácias e leucócitos (incluindo células mononucleares)



### 3.8 Cultura celular e tratamentos para o teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese *in vitro*

A metodologia do teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese utilizada foi a descrita por Fenech (2000). Para a cultura de células mononucleares, foram adicionados 400µL do concentrado de hemácias e 500µL de plasma dos doadores em 5 mL de meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 15 % de soro fetal bovino, 1% de antibiótico e 5µl/mL de fitohemaglutinina A. Os tratamentos com o extrato de *Salix alba* L. (5, 50 e 100 µg/mL), com o controle negativo (meio de cultura) e positivo (MMS 150 µM) foram realizados após 44 horas do início da incubação e a citocalasina-B (6 µg/mL) foi adicionada após 4 horas dos tratamentos (48 horas após início da incubação). As células mononucleares foram cultivadas por 72 horas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os tubos de cultura foram centrifugados por 5 minutos (1000 rpm), após a incubação, e os pellets foram ressuspensos em solução hipotônica (KCL 0,075 M) por 5 minutos a 4°C. Essas células foram lavadas, por 3 vezes, com 5 mL de metanol:ácido acético (3:4) gelado, sendo 5 gotas de formaldeído a 4% adicionado na última lavagem (preservação do citoplasma). O esfregaço foi feito com uma gota em lâmina e secou em temperatura ambiente. Após secarem, as lâminas foram coradas com Giemsa diluído 1:10 em tampão fosfato (pH 6,8) por 10 minutos. Por fim, foram lavadas e deixadas para secar.

Para a cultura de células HepG2,  $2 \times 10^5$  de células foram adicionadas a 5 mL de meio MEM, suplementado com 15% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico, 1% de piruvato de sódio e 2,2 mg/mL de  $\text{NaHCO}_3$ . Os tratamentos com o extrato de *Salix alba* L. (mesmas concentrações usadas na cultura de células mononucleares), com o controle negativo (meio de cultura) e positivo (Bap 2  $\mu\text{M}$ ) foram realizados após 24 horas do início da incubação. Após 24 horas de exposição aos tratamentos e controles, o meio de cultura foi desprezado e os frascos de culturas foram lavados com 5 mL de PBS. O PBS foi descartado em seguida e foi adicionado outro meio de cultura completo e 6  $\mu\text{g/mL}$  de citocalasina- B, sendo a cultura incubada por mais 28 horas. O conteúdo dos frascos de cultura, após as 28 horas, foram transferidos para tubos, sendo os frascos lavados 2 vezes com 5 mL de PBS (apenas a primeira lavagem foi adicionada ao tubo correspondente). 1 mL de tripsina EDTA 0,5% foi adicionada nos frascos e esses foram incubados por mais 5 minutos. A tripsina foi neutralizada com meio separado nos tubos correspondentes e em seguida, todo o conteúdo foi transferido novamente dos frascos para os tubos. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm e os pellets foram ressuspensos em 10 mg/mL de solução de citrato de sódio por 5 minutos a 4°C. Essas células foram lavadas, por 3 vezes, com 5 mL de metanol:ácido acético (3:1) gelado, sendo 5 gotas de formaldeído a 4% adicionado na última lavagem. As células foram depositadas em lâminas e coradas com Giemsa da mesma maneira que as células mononucleares. Na cultura de células mononucleares os experimentos foram feitos em duplicata e na cultura de células HepG2, os experimentos foram em triplicata.

Foram analisadas, em microscópio de luz comum com aumento de 100x, por tratamento, 1000 células binucleadas na busca por presença de micronúcleos, brotos e pontes nucleoplasmáticas e em 500 células (mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e tetranucleadas) foi feita uma relação para encontrar o IDN.

### **3.9 Ensaios *in vivo***

Foram utilizados nos experimentos camundongos machos *Swiss* albinos (*Mus musculus*), com 12 semanas de vida, adquiridos junto ao biotério da UNESP, campus de Botucatu. Os animais foram aclimatados por 7 dias no biotério da UNESP, campus de Marília, antes do experimento iniciar. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade ( $55 \pm 10\%$ ) em um ciclo de 12 horas claro/escuro e receberam ração sólida e água *ad libitum*. Os animais possuíam

aproximadamente 30g de massa corporal, distribuídos em grupos controle e grupos experimentais de 6 animais cada. Os tratamentos e o controle negativo foram administrados por via oral e o controle positivo intraperitonealmente. O grupo controle positivo foi tratado com 30 mg/Kg de doxorrubicina e o controle negativo foi tratado com 0,3 mL/Kg de DMSO 1%. Os grupos experimentais foram tratados com 3 diferentes dosagens do extrato (500, 1000 e 2000 mg/Kg). Os animais foram tratados por 7 dias consecutivos (24 horas de intervalo) e submetidos à eutanásia, por deslocamento cervical, 4 horas após o último tratamento.

### **3.10 Ensaio do Cometa *in vivo***

As lâminas foram obtidas de acordo com a técnica descrita no item 3.6. As células do sangue periférico, células da medula óssea, hepáticas, dos testículos e coração, foram coletadas 4 horas após o sétimo tratamento com o extrato. Os órgãos foram lavados em solução fisiológica (NaCl 0,9%) e divulsionados com seringa em PBS (500 µL a 37 °C) para obtenção de células isoladas dos órgãos. 20µL dessa suspensão celular foi adicionada ao microtubo com agarose LMP 5% a 37 °C para a realização das lâminas.

### **3.11 Teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos *in vivo***

Os animais foram submetidos à eutanásia 4h após o sétimo tratamento e o fêmur foi retirando. A epífise proximal foi cortada e 500µL de NaCl 0,9% foi introduzido na abertura. As células obtidas da medula óssea foram centrifugada por 5 minutos a 1000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Cinco gotas de formaldeído a 4% foram adicionados e homogeneizados com as células, para em seguida as lâminas serem feitas. O esfregaço foi feito com uma gota em lâmina e secou em temperatura ambiente. Após secarem, as lâminas foram coradas com Giemsa diluído 1:10 em tampão fosfato (pH 6,8) por 10 mim. Por fim, foram lavadas e deixadas para secar.

Foram analisadas, em microscópio óptico comum com aumento de 100x, por tratamento, 4000 eritrócitos policromáticos na busca por presença de micronúcleo e em 500 eritrócitos da medula óssea foi estabelecida à relação entre o número de eritrócitos policromáticos/normocromáticos.

### **3.12 Avaliação Histológica: Técnica da Hematoxilina-Eosina (diferenciação das células e matriz extracelular)**

Após a eutanásia, frações do fígado foram retiradas e colocadas em solução fisiológica tamponada com fosfato-PBS. Essas frações foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 24 horas e em seguida transferidos para o tampão fosfato por mais 24 horas.

Terminado esse período de 24 horas, a desidratação em série crescente de álcool etílico a 70%, 80%, 90% e 95% foi realizada, onde as frações ficaram por 30 minutos em cada diferente porcentagem de álcool etílico. As frações desidratadas foram embebidas em resina por 24 horas e em seguida em moldes plásticos, para formar blocos, contendo a mesma resina mais o polimerizador. Posteriormente, os blocos contendo as frações dos tecidos foram seccionados, com espessura de 3  $\mu\text{m}$ , em micrótomo e os cortes foram colocados em lâminas de vidro.

As lâminas foram coradas com hematoxilina por 5 minutos e em seguida lavadas por mais 5 minutos em água corrente. Após a lavagem, as lâminas foram coradas com eosina aquosa durante 5 minutos e lavadas mais uma vez por 5 minutos em água corrente.

Após secarem, as lâminas foram mergulhadas rapidamente em xilol e foram vedadas com bálsamo do Canadá. Essas foram analisadas em microscópio óptico comum.

### **3.13 Avaliação Histológica: Técnica do Azul de Nilo (detecção de lipídeos)**

As frações do fígado foram fixadas em formol cálcio por 15 horas e posteriormente colocadas em tampão fosfato por 24 horas. As frações foram desidratadas da mesma maneira que na técnica do item 3.12 e em seguida foram embebidas em resina por 24 horas e após isso colocadas em moldes plásticos, para formar blocos, contendo a mesma resina mais o polimerizador. Posteriormente, os blocos contendo as frações dos tecidos foram seccionados, com espessura de 3  $\mu\text{m}$ , em micrótomo e os cortes foram colocados em lâminas de vidro.

As lâminas foram coradas com o Azul de Nilo por 10 minutos a 37 °C e em seguida lavadas com água destilada. Essas lâminas foram imersas em ácido acético a 1% por 1 minuto e lavadas mais uma vez com água destilada.

Após secarem em temperatura ambiente e recobertas com glicerina, essas foram analisadas em microscópio óptico comum.

### **3.14 Avaliação Histológica: Técnica da coloração PAS (detecção de polissacarídeos)**

As frações do fígado foram fixadas em Bouin aquoso por 5 dias e depois desidratados da mesma maneira que na técnica do item 3.12, mas por 15 minutos em cada diferente porcentagem de álcool etílico. Após a desidratação foram embebidas em resina de embebição e historesina, para em seguida serem seccionadas na espessura de 3 µm e os cortes colocados em lâminas de vidro.

Os cortes foram reidratados em água destilada por 1 minuto e em seguida colocados em solução de ácido periódico a 4% por 10 minutos. Passados os 10 minutos, os cortes foram lavados com água destilada e com o reagente de Schiff por, respectivamente, 1 minuto e 1 hora.

Os cortes foram lavados em água corrente, secaram em temperatura ambiente e recobertos com bálsamo do Canadá. Esses foram analisados em microscópio óptico comum.

### **3.15 Análise estatística**

Todos os dados obtidos foram submetidos a cálculos estatísticos usando-se o teste t de students e ANOVA (One Way) seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas, com a utilização do GraphPad Prism® software (version 5.02). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes com  $p < 0,05$ .

## **4 RESULTADOS**

#### **4.1 Testes de citotoxicidade e genotoxicidade *in vivo***

A tabela 1 mostra os danos ao DNA encontrados nos eritrócitos, fígado, medula óssea, coração e testículos detectados no ensaio do cometa *in vivo*. Quando o grupo controle positivo foi comparado ao grupo controle negativo, foi observado um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) na migração do DNA no ensaio do cometa nas diferentes células analisadas. Em todas as células avaliadas não foram encontrados aumentos significativos de danos no DNA, comparando-se o grupo controle negativo com os grupos tratados com as doses de 500, 1000 e 2000 mg/Kg do extrato cascas de *Salix alba* L.



**Tabela 1** - Migração de DNA (média  $\pm$  DP) no ensaio cometa para estudo de genotoxicidade do extrato de *Salix alba* L.(SA) em diferentes células de camundongos machos Suíços *in vivo*.

Tratamentos e		Classes dos Cometas				Escores
células analisadas	Total <sup>1</sup>	0	1	2	3	
<b>Sangue Periférico</b>						
Controle negativo	9.50 $\pm$ 2.58	140.50 $\pm$ 2.58	8.16 $\pm$ 1.94	1.33 $\pm$ 0.81	0.00 $\pm$ 0.00	10.83 $\pm$ 3.31
SA 500 mg/kg	8.83 $\pm$ 2.22	141.20 $\pm$ 2.22	7.83 $\pm$ 2.13	1.00 $\pm$ 0.63	0.00 $\pm$ 0.00	9.83 $\pm$ 2.48
SA 1000 mg/kg	7.83 $\pm$ 2.13	142.20 $\pm$ 2.13	7.00 $\pm$ 2.09	0.83 $\pm$ 0.75	0.00 $\pm$ 0.00	8.66 $\pm$ 2.42
SA 2000 mg/kg	9.66 $\pm$ 2.73	140.30 $\pm$ 2.73	8.50 $\pm$ 1.97	1.16 $\pm$ 1.16	0.00 $\pm$ 0.00	10.83 $\pm$ 3.71
Controle positivo	45.83 $\pm$ 2.40 <sup>a</sup>	104.20 $\pm$ 2.40 <sup>a</sup>	43.17 $\pm$ 2.56 <sup>a</sup>	2.66 $\pm$ 1.50	0.00 $\pm$ 0.00	48.50 $\pm$ 3.08 <sup>a</sup>
<b>Fígado</b>						
Controle negativo	10.17 $\pm$ 2.37	139.80 $\pm$ 2.31	8.50 $\pm$ 1.76	1.66 $\pm$ 0.81	0.00 $\pm$ 0.00	11.83 $\pm$ 2.99
SA 500 mg/kg	9.16 $\pm$ 3.31	140.80 $\pm$ 3.31	7.66 $\pm$ 2.42	1.50 $\pm$ 1.04	0.00 $\pm$ 0.00	10.67 $\pm$ 4.27
SA 1000 mg/kg	9.66 $\pm$ 1.63	140.30 $\pm$ 1.63	8.16 $\pm$ 1.47	1.50 $\pm$ 1.04	0.00 $\pm$ 0.00	11.17 $\pm$ 2.31
SA 2000 mg/kg	10.00 $\pm$ 2.53	140.00 $\pm$ 2.53	8.66 $\pm$ 1.50	1.33 $\pm$ 1.36	0.00 $\pm$ 0.00	11.33 $\pm$ 3.77
Controle positivo	44.83 $\pm$ 2.85 <sup>a</sup>	105.20 $\pm$ 2.85 <sup>a</sup>	42.33 $\pm$ 3.14 <sup>a</sup>	2.50 $\pm$ 1.04	0.00 $\pm$ 0.00	47.33 $\pm$ 2.94 <sup>a</sup>
<b>Medula óssea</b>						
Controle negativo	9.66 $\pm$ 1.96	140.30 $\pm$ 1.96	7.83 $\pm$ 2.04	1.83 $\pm$ 0.75	0.00 $\pm$ 0.00	11.50 $\pm$ 2.16
SA 500 mg/kg	9.50 $\pm$ 2.25	140.50 $\pm$ 2.25	8.33 $\pm$ 2.25	1.16 $\pm$ 0.98	0.00 $\pm$ 0.00	10.67 $\pm$ 2.65
SA 1000 mg/kg	8.50 $\pm$ 2.34	141.50 $\pm$ 2.34	7.50 $\pm$ 1.87	1.00 $\pm$ 1.05	0.00 $\pm$ 0.00	9.50 $\pm$ 3.14
SA 2000 mg/kg	9.66 $\pm$ 3.01	140.30 $\pm$ 3.01	8.00 $\pm$ 1.89	1.66 $\pm$ 1.21	0.00 $\pm$ 0.00	11.33 $\pm$ 4.17
Controle positivo	41.33 $\pm$ 2.65 <sup>a</sup>	108.70 $\pm$ 2.65 <sup>a</sup>	38.33 $\pm$ 2.42 <sup>a</sup>	3.00 $\pm$ 0.89	0.00 $\pm$ 0.00	44.33 $\pm$ 3.14 <sup>a</sup>
<b>Coração</b>						
Controle negativo	8.33 $\pm$ 2.42	141.70 $\pm$ 2.42	6.83 $\pm$ 2.48	1.50 $\pm$ 0.54	0.00 $\pm$ 0.00	9.83 $\pm$ 2.48
SA 500 mg/kg	9.16 $\pm$ 2.99	140.80 $\pm$ 2.99	8.00 $\pm$ 2.82	1.16 $\pm$ 0.75	0.00 $\pm$ 0.00	10.33 $\pm$ 3.32
SA 1000 mg/kg	8.66 $\pm$ 1.75	141.30 $\pm$ 1.75	8.16 $\pm$ 1.32	0.50 $\pm$ 0.54	0.00 $\pm$ 0.00	9.16 $\pm$ 2.22
SA 2000 mg/kg	9.00 $\pm$ 2.60	141.00 $\pm$ 2.60	8.16 $\pm$ 1.72	0.83 $\pm$ 1.16	0.00 $\pm$ 0.00	9.83 $\pm$ 3.65
Controle positivo	43.67 $\pm$ 3.67 <sup>a</sup>	106.30 $\pm$ 3.67 <sup>a</sup>	41.17 $\pm$ 3.54 <sup>a</sup>	2.50 $\pm$ 1.04	0.00 $\pm$ 0.00	46.17 $\pm$ 4.07 <sup>a</sup>
<b>Testículo</b>						
Controle negativo	9.50 $\pm$ 1.87	140.50 $\pm$ 1.87	8.00 $\pm$ 1.78	1.50 $\pm$ 0.54	0.00 $\pm$ 0.00	11.00 $\pm$ 2.09
SA 500 mg/kg	9.83 $\pm$ 1.47	140.20 $\pm$ 1.47	8.16 $\pm$ 1.94	1.66 $\pm$ 1.03	0.00 $\pm$ 0.00	11.50 $\pm$ 1.64
SA 1000 mg/kg	9.66 $\pm$ 2.25	140.30 $\pm$ 2.25	8.00 $\pm$ 1.67	1.66 $\pm$ 1.21	0.00 $\pm$ 0.00	11.33 $\pm$ 3.20
SA 2000 mg/kg	8.83 $\pm$ 2.31	141.20 $\pm$ 2.31	7.66 $\pm$ 1.50	1.16 $\pm$ 1.16	0.00 $\pm$ 0.00	10.00 $\pm$ 3.34
Controle positivo	44.67 $\pm$ 3.88 <sup>a</sup>	105.30 $\pm$ 3.88 <sup>a</sup>	42.17 $\pm$ 4.16 <sup>a</sup>	2.50 $\pm$ 0.83	0.00 $\pm$ 0.00	47.17 $\pm$ 3.76 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $P < 0,001$ ); <sup>1</sup> Número total de células com danos (classe 1+2+3).

A tabela 2 mostra a frequência de eritrócitos policromáticos com a presença de micronúcleos e a relação eritrócitos policromáticos/eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) encontrados em células da medula óssea no teste de micronúcleo *in vivo*.

Foi encontrado um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de células micronucleadas quando o grupo controle negativo foi comparado ao grupo controle positivo. Esse



aumento significativo não foi observado quando comparamos o grupo controle negativo e os grupos tratados com 500, 1000 e 2000 mg/Kg do extrato de *Salix alba* L. A relação EPC/ENC em 500 eritrócitos da medula óssea não mostrou diferenças significativas, indicando não haver efeitos citotóxicos em todos os grupos avaliados.

Não foram observados mortes, morbidade ou alterações clínicas nos animais tratados com o extrato de *Salix alba* L.

**Tabela 2** - Número de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (EPM) observados nas células de medula óssea de camundongos machos Suíços (M1-6) tratados com *Salix alba* L. (SA), e respectivos controles. Quatro mil células analisadas. DP = Desvio Padrão.

Tratamentos	Número de EPM por Animal						EPM (Média ± DP)	EPC/ENC (Média ± DP)
	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>		
Controle negativo	4	3	5	4	4	6	4.33 ± 1.03	1.12 ± 0.02
Salix alba L. (500 mg/kg)	6	4	6	4	8	6	5.66 ± 1.50	1.12 ± 0.03
Salix alba L. (1000 mg/kg)	7	4	6	7	8	6	6.33 ± 1.36	1.11 ± 0.02
Salix alba L. (2000 mg/kg)	8	6	4	6	7	8	6.50 ± 1.51	1.12 ± 0.02
Controle positivo	16	20	17	22	18	21	19.00 ± 2.36 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.03

<sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $P < 0,001$ )

#### 4.2 Testes de citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro*

A tabela 3 mostra os danos no DNA das células mononucleares do sangue periférico humano, após o tratamento com o extrato de *Salix alba* L., detectados no ensaio do cometa *in vitro*. Quando o grupo controle positivo foi comparado ao grupo controle negativo, foi observado um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) na migração do DNA.

Foram encontrados aumentos significativos no dano do DNA ( $p < 0,05$  ou maior) entre o grupo controle negativo e os grupos tratados com doses de 50 e 100 µg/mL do extrato de *Salix alba* L. Essa relação não foi encontrada entre o grupo controle negativo e o grupo tratado com a dose de 5 µg/mL do extrato de *Salix alba* L.

**Tabela 3** - Migração de DNA (média  $\pm$  DP) no ensaio cometa para estudo de genotoxicidade do extrato de *Salix alba* L. em células mononucleares de sangue periférico humano.

Tratamentos	Classes dos Cometas					Escores
	Total <sup>1</sup>	0	1	2	3	
Controle negativo	12.75 $\pm$ 2.71	137.30 $\pm$ 2.71	9.25 $\pm$ 2.37	3.50 $\pm$ 1.06	0.00 $\pm$ 0.00	16.25 $\pm$ 3.37
5,0 $\mu$ g/mL	16.50 $\pm$ 2.56	133.50 $\pm$ 2.56	14.75 $\pm$ 2.18	1.75 $\pm$ 1.38	0.00 $\pm$ 0.00	18.25 $\pm$ 3.49
50,0 $\mu$ g/mL	32.63 $\pm$ 3.81 <sup>c</sup>	117.40 $\pm$ 3.81 <sup>c</sup>	22.13 $\pm$ 2.16 <sup>c</sup>	8.75 $\pm$ 2.55 <sup>b</sup>	1.75 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>	44.88 $\pm$ 6.26 <sup>c</sup>
100,0 $\mu$ g/mL	35.50 $\pm$ 6.16 <sup>c</sup>	114.50 $\pm$ 6.16 <sup>c</sup>	24.88 $\pm$ 2.90 <sup>c</sup>	8.87 $\pm$ 4.67 <sup>b</sup>	1.75 $\pm$ 1.28 <sup>a</sup>	47.88 $\pm$ 12.04 <sup>c</sup>
Controle positivo	40.50 $\pm$ 11.07 <sup>c</sup>	109.50 $\pm$ 11.07 <sup>c</sup>	27.38 $\pm$ 9.87 <sup>c</sup>	9.50 $\pm$ 2.72 <sup>b</sup>	3.62 $\pm$ 1.68 <sup>c</sup>	57.25 $\pm$ 13.69 <sup>c</sup>

DP = desvio padrão, <sup>a</sup> significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), <sup>b</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,01$ ), <sup>c</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,001$ ), <sup>1</sup>Número total de células com danos (classe 1+2+3).

A tabela 4 mostra a frequência de células mononucleares do sangue periférico humano (binucleadas) com a presença de micronúcleos e o índice de divisão nuclear (IDN) em células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e tetranucleadas no teste de micronúcleo *in vitro*.

Foi encontrado um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de células binucleadas com presença de micronúcleos quando o grupo controle negativo foi comparado ao grupo controle positivo. Esse aumento significativo não foi observado quando comparamos o grupo controle negativo e os grupos tratados com 5, 50 e 100  $\mu$ g/mL do extrato de *Salix alba* L. O índice de divisão nuclear não demonstrou diferenças significativas entre todos os grupo avaliados.

**Tabela 4** - Frequência de micronúcleos (MN) e índice de divisão nuclear (IDN) em células mononucleares de sangue periférico humano expostas com *Salix alba* L. por 28 hora.

Substância teste	Tratamento	Células binucleadas		
		com MN		IDN
		(2000 células)		(1000 células)
Concentrações (µg/mL)		Nº	%	(Média ± DP)
Controle negativo	0	11	0.55	2.18 ± 0.01
Controle positivo	150*	36 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	2.14 ± 0.01
<i>Salix alba</i> L.	5	7	0.35	2.16 ± 0.03
	50	7	0.35	2.13 ± 0.01
	100	11	0.55	2.03 ± 0.02

DP = desvio padrão, \* concentração em µM, <sup>a</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,001$ ).

A tabela 5 mostra os danos do DNA nas células HepG2, após o tratamento com o extrato de *Salix alba* L., detectados no ensaio do cometa *in vitro*. Quando o grupo controle positivo foi comparado ao grupo controle negativo, foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$  ou maior) na migração do DNA. Não foram encontrados aumentos significativos na lesão do DNA, comparando-se o grupo controle negativo com os grupos tratados nas concentrações de 5, 50 e 100 µg/mL do extrato de *Salix alba* L.

**Tabela 5** - Migração de DNA (média  $\pm$  DP) no ensaio cometa para estudo de genotoxicidade do extrato de *Salix alba* L. em células de hepatocarcinoma humano (HepG2).

Tratamentos	Classes dos Cometa					Escores
	Total <sup>1</sup>	0	1	2	3	
Controle negativo	12.67 $\pm$ 2.51	137.30 $\pm$ 2.51	9.00 $\pm$ 1.73	3.00 $\pm$ 1.00	0.66 $\pm$ 0.57	17.00 $\pm$ 4.35
5,0 $\mu$ g/mL	9.33 $\pm$ 1.52	140.70 $\pm$ 1.52	6.33 $\pm$ 0.57	3.00 $\pm$ 1.00	0.00 $\pm$ 0.00	12.33 $\pm$ 2.51
50,0 $\mu$ g/mL	9.66 $\pm$ 1.52	140.30 $\pm$ 1.52	7.66 $\pm$ 1.15	1.66 $\pm$ 0.57	0.33 $\pm$ 0.57	12.00 $\pm$ 2.64
100,0 $\mu$ g/mL	15.67 $\pm$ 1.52	134.30 $\pm$ 1.52	10.67 $\pm$ 1.52	5.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	20.67 $\pm$ 1.52
Controle positivo	42.33 $\pm$ 5.13 <sup>b</sup>	107.70 $\pm$ 5.13 <sup>b</sup>	31.67 $\pm$ 2.88 <sup>b</sup>	6.66 $\pm$ 2.08 <sup>a</sup>	4.00 $\pm$ 1.00 <sup>b</sup>	57.00 $\pm$ 8.00 <sup>b</sup>

DP = desvio padrão, <sup>a</sup> significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ), <sup>b</sup> Significativamente diferente do controle negativo ( $p < 0,001$ ), <sup>1</sup>Número total de células com danos (classe 1+2+3).

A tabela 6 mostra a frequência de células HepG2 binucleadas com a presença de micronúcleos e o índice de divisão nuclear (IDN) em células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e tetranucleadas no teste de micronúcleo *in vitro*.

Foi encontrado um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de células HepG2 binucleadas com presença de micronúcleos quando o grupo controle negativo foi comparado ao grupo controle positivo. Esse aumento significativo não foi observado quando comparamos o grupo controle negativo e os grupos tratados com 5, 50 e 100  $\mu$ g/mL do extrato de *Salix alba* L. O índice de divisão nuclear mostrou diferenças significativas ( $p < 0,5$ ) entre o grupo controle negativo e o grupo controle positivo, indicando haver efeitos citotóxicos do Bap nas células HepG2. Essa relação não foi encontrada entre o grupo controle negativo e os grupos tratados com a dose de 5, 50 e 100  $\mu$ g/mL do extrato de *Salix alba* L.

**Tabela 6** - Frequência de micronúcleos (MN) e índice de divisão nuclear (IDN) em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) expostas com *Salix alba* L. por 52 horas.

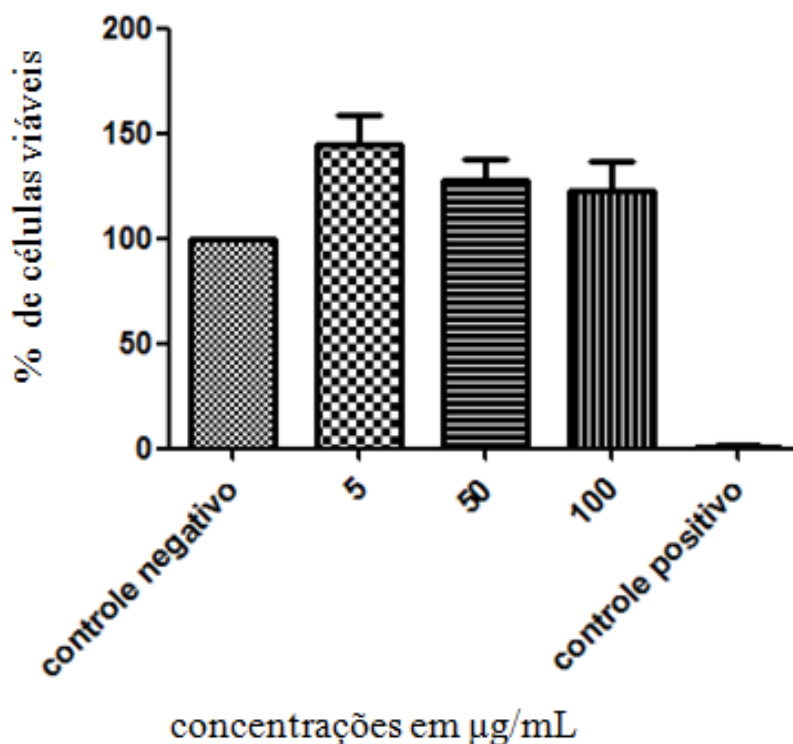
Substância teste	Tratamento	Células binucleadas		
		com MN		IDN
		(3000 células)	(1500 células)	(1500 células)
Concentrações (µg/mL)		Nº	%	(Média ± DP)
Controle negativo	0	7	0.23	1.88 ± 0.10
Controle positivo	2 <sup>*</sup>	18 <sup>b</sup>	0.60 <sup>b</sup>	1.66 ± 0.01 <sup>a</sup>
<i>Salix alba</i> L.	5	3	0.10	1.87 ± 0.01
	50	5	0.16	1.96 ± 0.10
	100	7	0.23	1.90 ± 0.09

DP = desvio padrão, <sup>\*</sup> concentração em µM, <sup>a</sup> significativamente diferente do controle negativo (p < 0,05), <sup>b</sup> Significativamente diferente do controle negativo (p < 0,001).

No teste do MTT com as células HepG2, as concentrações de 5, 50 e 100 µg/mL do extrato da *Salix alba* apresentaram, respectivamente, viabilidade de 144,7% ± 24,44, 127,6% ± 17,52 e 122,2% ± 24,67. Já o controle positivo, apresentou viabilidade de apenas 1,05% ± 0,75 (figura 12).

No teste do Azul de Tripán, as células mononucleares, a partir de 200 µg/mL, demonstraram viabilidade celular menor que 80%.

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

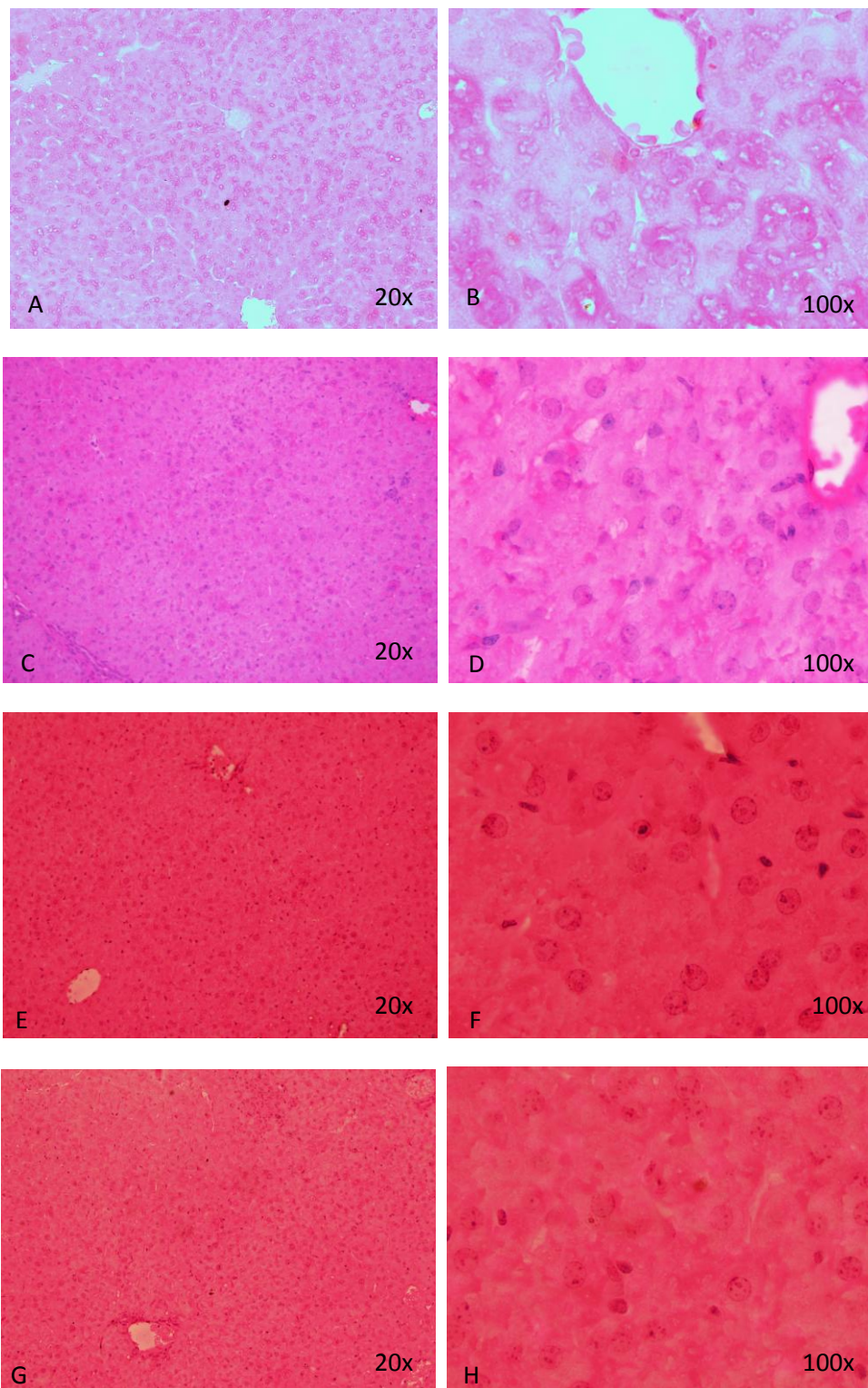


### 4.3 Análises histológicas e histoquímicas

#### 4.3.1 Técnica da Hematoxilina-Eosina

As células hepáticas, tanto nos grupos controles, quando nos grupos tratados, nas doses de 500, 1000 e 2000 mg/Kg, apresentaram hepatócitos poligonais formando placas anastomosadas. Os hepatócitos exibiram de 1 a 2 núcleos centrais e com formato redondo. Presença de 1 ou mais nucléolos e citoplasma acidofílico. Todos os animais também apresentaram uma hiperplasia de veia centrolobular e células de Kupffer fortemente coradas e visíveis (figura 13).

**Figura 13** - Secções histológicas do fígado de camundongo tratados com o extrato da *Salix alba* L. 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. A espessura de todos os cortes histológicos foi de 3  $\mu$ m. 20x, 100x= objetivas em que foram batidas as fotos.

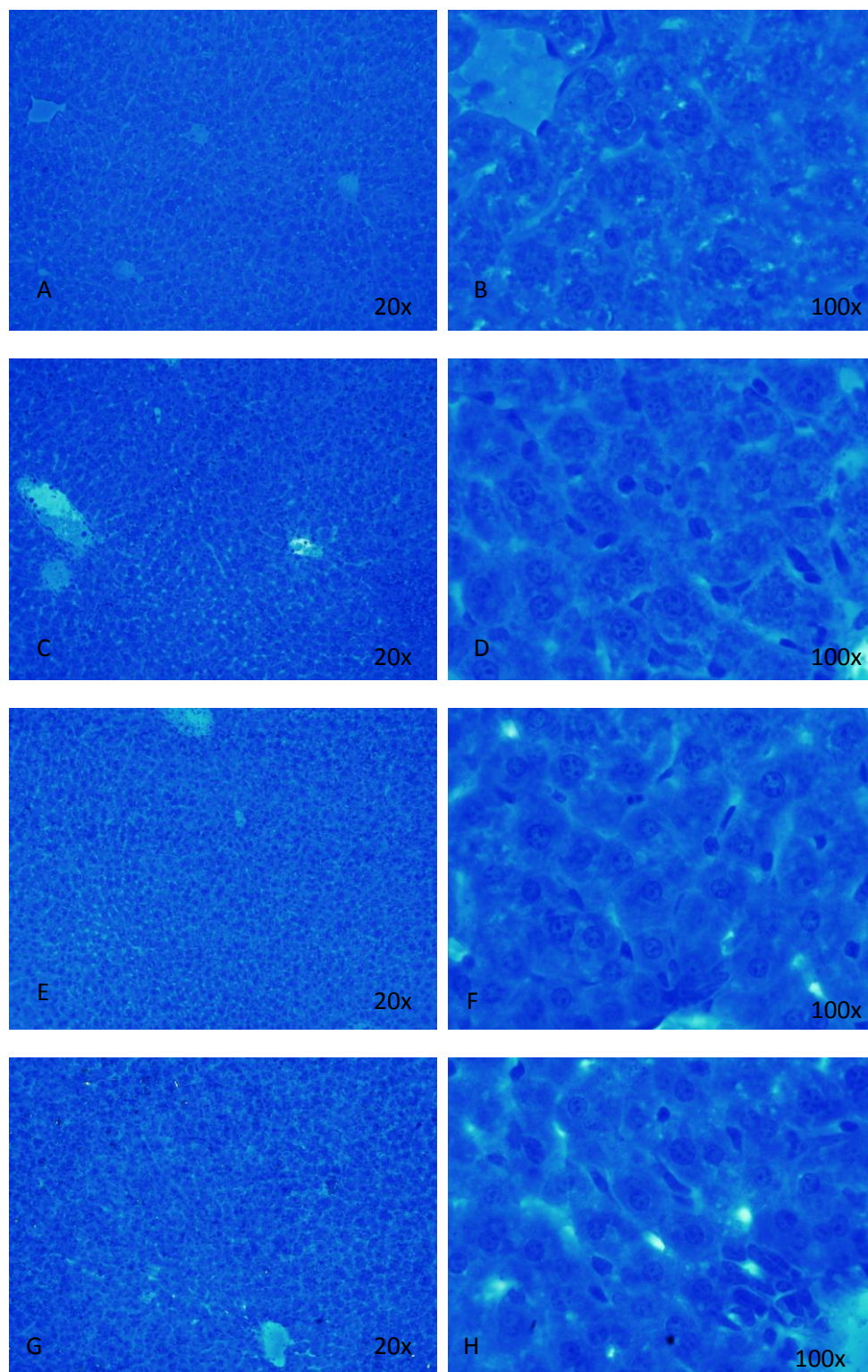


### **4.3.2 Técnica do Azul do Nilo**

A coloração com o corante Azul do Nilo revelou a presença de lipídeos no citoplasma dos hepatócitos. Tanto os grupos controles, quanto os grupos tratados com o extrato da *Salix alba* L., nas doses de 500, 1000 e 2000 mg/Kg, apresentaram fraca a moderada positividade para a presença de lipídios (figura 14).



**Figura 14** - Secções histológicas do fígado de camundongo tratados com o extrato da *Salix alba* L. 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. A espessura de todos os cortes histológicos foi de 3  $\mu$ m. 20x, 100x= objetivas em que foram batidas as fotos



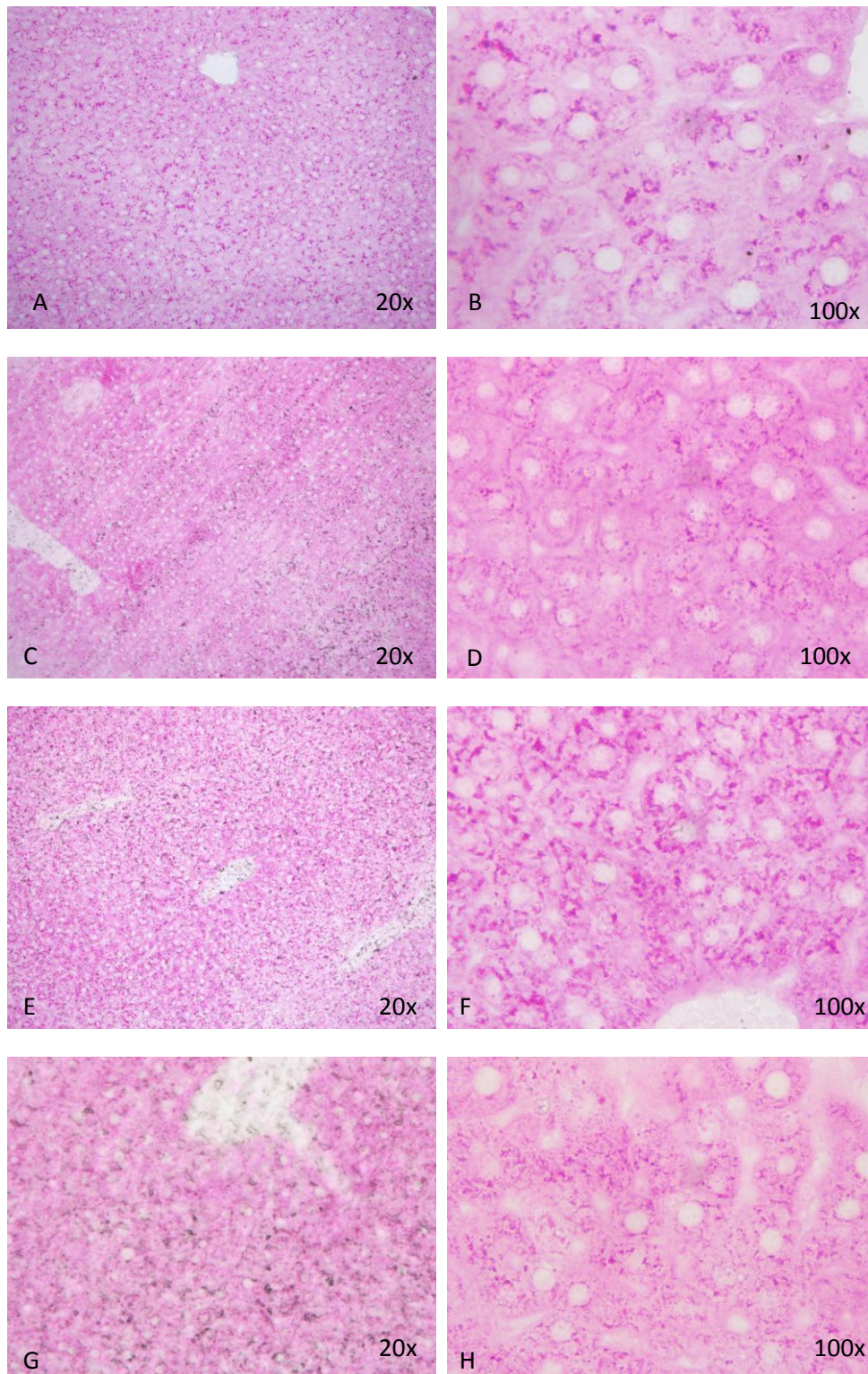
### 4.3.3 Técnica da coloração PAS

A coloração com o corante Ácido Periódico de Schiff revelou a presença de grânulos de polissacarídeos no citoplasma dos hepatócitos. Tanto os grupos controles, quanto os grupos tratados com o extrato da *Salix alba* L., nas doses de 500, 1000 e 2000 mg/Kg, apresentaram fraca a moderada presença de grânulos, uniformemente distribuídos, principalmente ao redor do núcleo (figura 15).

A técnica do PAS não é específica para a demonstração de núcleos, então os núcleos dos hepatócitos e as células de Kupffer não são observados. O lúmen dos capilares sinusóides e dos grandes vasos dos hepatócitos, foram fracamente corados ou não corados.



**Figura 15** - Secções histológicas do fígado de camundongo tratados com o extrato da *Salix alba* L. 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. A espessura de todos os cortes histológicos foi de 3  $\mu$ m. 20x, 100x= objetivas em que foram batidas as fotos.



## 5 DISCUSSÃO

As plantas medicinais são utilizadas a milhares de anos, sendo seus primeiros registros encontrados em tabuletas escritas há cerca de 5000 anos. As propriedades terapêuticas das plantas medicinais são descobertas através da observação e experimentação popular, o que não garante sua eficácia e segurança. Mesmo quando essas plantas medicinais tem sua eficácia terapêutica cientificamente comprovada, não há garantia de ausência de risco, tornando necessário o uso de testes de genotoxicidade e mutagenicidade para avaliar sua segurança (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008; NASCIMENTO et al., 2009; PINTO et al., 2010; PETROVSKA, 2012; PEREIRA et al., 2016).

Encontra-se referências sobre o uso da *Salix alba* L. no livro chinês Pen T'Sao, escrito em 2500 a.C. (PETROVSKA, 2012). A *Salix alba* L. é uma planta historicamente utilizada nos tratamentos de dor, febre, infecções e inflamações, onde suas propriedades terapêuticas estão relacionadas ao seu principal componente, a salicina, um análogo precursor do ácido acetilsalicílico (SOUZA et al, 2009; DRUMMOND et al, 2013; SHARA; STOHS, 2015).

Podemos encontrar facilmente partes, produtos e subprodutos de plantas medicinais no comércio, mesmo sem a identificação dos seus princípios ativos e a avaliação de sua segurança (LIMA; NASCIMENTO; SILVA, 2016). Entre esses produtos, encontramos os fitoterápicos, que são medicamentos originados exclusivamente de plantas medicinais. No Brasil, esses são distribuídos aos usuários do SUS desde 2008, incluindo o extrato da casca da *Salix alba* L., mesmo existindo poucas publicações científicas sobre seu uso e sobre sua segurança. (BRASIL, 2008; BRASIL, 2009).

O potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do extrato da casca da *Salix alba* L. em cultura de células humanas e células de camundongos *in vivo* foi avaliado no presente estudo. Para a cultura, foram utilizadas células mononucleares normais do sangue periférico, que não continham enzimas metabolizadoras do fígado e células HepG2, que continham enzimas metabolizadoras hepáticas. No estudo *in vivo*, as células dos camundongos avaliadas foram às somáticas (leucócitos de sangue periférico, fígado, coração e medula óssea) e as germinativas (testículos).

No presente estudo, o extrato da casca da *Salix alba* L., nas concentrações de 5, 50 e 100 µg/mL, não reduziu a viabilidade das células HepG2, conforme evidenciou o teste do MTT, e embora em população celular e concentração diferente, efeito semelhante foi encontrado por SHAKIBAEI et al. (2012), onde 10 µg/mL do extrato não reduziu o número de células em cultura de condrócitos. O extrato da casca da *Salix purpurea*, nas concentrações de 10 e 50 µg/mL, também não demonstrou efeitos citotóxicos em cultura de células HMEC-1 (FREISCHMIDT et al., 2012). Também em nosso trabalho, as concentrações de 5, 50 e 100 µg/mL não reduziram a viabilidade celular no teste do Azul de Tripán. Resultado semelhante foi encontrado por El-Shemy et al. (2007), onde 100 µg do extrato de folhas da *Salix safsaf* não reduziu a viabilidade celular em cultura de células mononucleares.

No ensaio do cometa e no teste do micronúcleo *in vivo*, o extrato da *Salix alba* L. não evidenciou, respectivamente, efeitos genotóxicos e mutagênicos, nas células somáticas e germinativas dos camundongos tratados por 7 dias consecutivos com as 3 diferentes doses (500, 1000 e 2000 mg/Kg). Na avaliação *in vitro*, o extrato da *Salix alba* L. também não demonstrou efeitos genotóxicos e mutagênicos na cultura de células HepG2 expostas as 3 diferentes concentrações (5, 50 e 100 µg/mL). Já na cultura de células mononucleares, expostas nas concentrações de 50 e 100 µg/mL do extrato da *Salix alba* L., danos no DNA foram encontrados no ensaio do cometa. No entanto, no teste do micronúcleo, não foram encontradas alterações em nenhuma das concentrações testadas.

As células HepG2 são células derivadas do hepatocarcinoma humano e essas possuem enzimas responsáveis pela metabolização e biotransformação de xenobióticos, funções encontradas nos hepatócitos humanos normais (MERSCH-SUNDERMANN et al., 2004; LIEBEL et al., 2015), o que difere das células mononucleares, que são células encontradas no sangue periférico humano e não possuem essas enzimas do fígado. A presença dessas enzimas hepáticas, como a citocromo P450, que estão envolvidas no metabolismo de compostos endógenos e xenobióticos (CHEN et al., 2014), pode explicar a diferença nos resultados encontrados na avaliação *in vivo* e a cultura de células mononucleares *in vitro*, onde a presença de lesões no DNA pode ter ocorrido por ação direta do extrato não metabolizado pelas células hepáticas.

Em culturas celulares *in vitro*, a geometria tridimensional que permite as interações entre as células e também os componentes envolvidos na homeostasia *in vivo*, estão ausentes, mesmo assim, a cultura celular é o principal modelo alternativo na

substituição de experimentos com animais (GOMES, 2007; ALVES; GUIMARÃES, 2010; FRESHNEY, 2016).

Pinto et al. (2010) também avaliaram o efeito mutagênico do extrato da *Salix alba* L. em cultura de linfócitos *in vitro*, nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/mL, e apesar de utilizarem concentrações diferentes e utilizarem o extrato do pólen de abelha da *Salix alba* L., os resultados foram semelhantes aos encontrados em nosso trabalho, onde, em ambos, não foram observados aumentos significativos de células micronucleadas e alterações no IDN.

Não foram encontradas alterações histológicas nas células hepáticas dos camundongos investigados no presente estudo, e não foram observadas diferenças histológicas entre o grupo controle negativo e os grupos tratados com as doses de 500, 1000 e 2000 mg/Kg. Os hepatócitos apresentaram de 1 a 2 núcleos redondos e centrais, e estavam corados fortemente pela hematoxilina. Os hepatócitos tinham o mesmo tamanho e formavam placas anastomosadas, separadas por capilares sinusóides (THOOLEN et al., 2010). Em relação às colorações Azul do Nilo e do PAS, não foram observadas diferenças histoquímicas entre o grupo controle negativo e os grupos tratados, onde foram encontrados a presença fraca e moderada, de lipídio e grânulos de polissacarídeos. Shakibaei et al. (2012), também não encontraram alterações histológicas e ultraestruturais em cultura de condrócitos de cães expostas a 10 µg/ml do extrato da *Salix alba* L. Tais resultados foram semelhantes aos encontrados em nosso estudo.

O ácido acetilsalicílico demonstrou não possuir efeitos mutagênicos em avaliações *in vivo* e *in vitro* (DUNN et al., 1987; GARRIOTT et al., 1995) e embora existam poucos estudos sobre a segurança no uso do extrato da *Salix*, a salicina, parece possuir atividade anti-tumoral (EL-SHEMY et al., 2007; HOSTANSKA et al., 2007; BILANI; BAHMAD; ABOU-KHEIR, 2017; HAMADA et al., 2017) e atividade quimiopreventiva em cultura celular (NAJAFZADEH et al., 2016). O extrato da *Salix alba* L., apesar de causar alguns efeitos adversos, não demonstrou sinais de toxicidade em exames clínicos e laboratoriais (NASCIMENTO et al., 2009).

## 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. **Phymed**, 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 N° 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 avellanedae*, *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 terebenthifolia* 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*)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE MARÍLIA  
Faculdade de Filosofia e Ciências

### 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 antígeno-tóxico 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

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 antígeno-tóxico do extrato de *Salix alba* *in vitro* (em





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,

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