UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO E FARMACOLÓGICO DAS FOLHAS DE *Caesalpinia echinata* Lam.

ANA RUTH SAMPAIO GRANGEIRO

RECIFE – PE
2009

ANA RUTH SAMPAIO GRANGEIRO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO E FARMACOLÓGICO DE *Caesalpinia echinata* Lam.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Avaliação e Obtenção de Produtos Bioativos e Naturais.

Orientador (a): Prof[a]. Dr[a]. Ivone Antônia de Souza

RECIFE – PE

2009

Grangeiro, Ana Ruth Sampaio
Avaliação do potencial toxicológico e farmacológico das folhas de *Caesalpinia echinata* Lam / Ana Ruth Sampaio Grangeiro. – Recife : O Autor, 2009.
52 folhas ; il., quadro, graf., fig., tab.

Tese (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2009.

Inclui bibliografia .

1. *Caesalpinia echinata* Lam. 2. Pau-Brasil. 3. Atividade antinociceptiva. 4. Atividade antiinflamatória. 5. Atividade antitumoral I. Título.

615.01 CDU (2.ed.) UFPE
615.1 CDD (22.ed.) CCS-01/2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REITOR
Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR
Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
José Thadeu Pinheiro

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Dalci José Brondani

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Antonio Rodolfo de Faria

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Pedro José Rolim Neto

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Beate Seagesser Santos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Recife, 27 de fevereiro de 2009.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA,** por decisão unânime, em 27 de fevereiro de 2009 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Profª. Drª. Ivone Antônia de Souza
(Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Sebastião José de Melo
(Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Profª. Drª. Falba Bernadete Ramos dos Anjos
(Deptº de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir alcançar meus objetivos, me dar forças e coragem para seguir adiante.

A minha mãe, "Dona Ailza", que incansavelmente lutou por minha educação, apoiando sempre as minhas escolhas.

Aos meus irmãos, Ricardo e Gustavo, e às minhas cunhadas, Ameísis e Solange, que entendem a distância e trouxeram ao mundo meus amores: Gabriela, José Vitor e Vinícus e o mais novo (a) membro da família.

A toda família Grangeiro Sampaio por toda a ajuda, o apoio e o carinho. Pelo verdadeiro sentido da palavra família agradeço especialmente aos tios: Zuila, Socorro, Graça, Nilda Zuleide, Antônio e Juarez por contribuírem diretamente para a realização desse sonho. Em especial, agradeço a Tia Lola (*in memorian*), Tia Carmita (*in memorian*) e Tio Licínio (*in memorian*) por sempre acreditarem em mim.

A minha orientadora, profª Drª Ivone, pela orientação de todos esses anos, e principalmente pela amizade e carinho.

A profª Drª Falba Bernadete pela ajuda providencial com a leitura das lâminas. Muito obrigada!

A Isla e Eliane a quem eu devo a conclusão desse trabalho. Agradeço a ajuda ESSENCIAL nos protocolos experimentais e as conversas divertidas no biotério, vocês tornaram esse caminho mais fácil.

A Denise, pela amizade de todos esses anos e por todos os momentos compartilhados.

A Dani Pontes e Fernando pela amizade e ajuda fundamental na finalização deste trabalho. Sem ajuda de vocês seria impossível.

A Arthur e Vadinho, por serem "irmãos" que eu reclamo, brigo, mas que sei que estarão ao meu lado em qualquer situação.

A Cynthia, pela ajuda na fase final desse trabalho, mas principalmente por continuar sendo a amiga especial que sempre foi, mesmo distante.

A Jack e Pavla, pessoas que mesmo a distância estão presentes em minha vida. Obrigada por tudo que aprendi com vocês e pelos conselhos. Saudades!

A todo pessoal do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental: Aldo, Elis, Guilherme, Grace, Renata, Luciana e Felipe pela ajuda na execução dos protocolos experimentais e pela convivência.

Aos amigos do mestrado, Liliane, Ticiana, René e Leila

Aos amigos, Assis, Marcos, Léo e "Romário", vocês foram sempre garantia de sorrisos e alegria. Obrigada por tornarem meus dias estressantes mais leves.

Ao Profº Drº Paulo Henrique Menezes por me iniciar no mundo da pesquisa e a Juliana (Julix) pela convivência e por tudo que aprendi no DQF.

A Wagner (Tio Joquinha) pela realização das cromatografias gasosas e pelo estímulo de sempre.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro.

A todos os amigos que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

GRANGEIRO, A.R.S. Avaliação do Potencial Toxicológico e Farmacológico do Extrato Etanólico das Folhas de *Caesalpinia echinata* Lam. Dissertação em Ciências Farmacêuticas/UFPE. Recife, 2009.

Caesalpinia echinata Lam, popularmente conhecida como pau-brasil ou pernambuco, é uma árvore considerada de valor histórico e econômico. O objetivo deste trabalho foi investigar a toxicidade aguda e as atividades antinociceptiva, antiinflamatória e antitumoral frente ao Sarcoma 180 do extrato bruto etanólico das folhas de *Caesalpinia echinata* Lam. A toxicidade aguda foi avaliada através da metodologia da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD 423), que preconiza administrar, a grupos de três animais, doses seqüenciais menores a partir da máxima de 2000 mg/kg. Para as atividades farmacológicas, foram utilizados dois modelos de nocicepção: contorções abdominais induzidas por ácido acético e teste da formalina e para a atividade antiinflamatória, o modelo do edema de pata induzido por carragenina. Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas em todas as atividades, com exceção da avaliação da atividade antiinflamatória em que foram utilizados ratos adultos Wistar (*Ratus norvegicus*), fêmeas. Para o teste das contorções abdominais, os animais receberam de ácido acético 2 % (0,1 mL/10g) por via intraperitoneal. O número de contorções foi observado por 20 minutos, 5 minutos após a injeção de ácido acético. Para o teste da formalina, foi injetada 20 µL de formalina 2,5% no espaço subplantar da pata direita de camundongos. Logo após a injeção, os animais foram observados individualmente e a duração da lambida foi determinada no período de 0 a 5 minutos (1ª fase) e 15 a 30 minutos (2ª fase) após aplicação. No teste de edema de pata foi aplicado 0,3 mL de carragenina (1%) na pata direita dos animais. Na avaliação da atividade antitumoral foi utilizada a metodologia de Stock para indução do Sarcoma 180. Para todos os testes foram usadas doses de 100, 200 e 300mg/kg do extrato etanólico de *C. echinata* (grupos tratados), o grupo controle recebeu solução salina, e o padrão, ácido acetilsalicílico (100mg/kg) para contorções; morfina (10mg/Kg) para formalina, indometacina (20mg/Kg) para o edema de pata e metotrexato (5mg/kg) para atividade antitumoral, todos por via oral. O extrato reduziu o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, chegando a inibir em 65,8% na maior dose testada. No teste da formalina, o extrato reduziu de forma estatisticamente significativa ambas as fases do tempo de lambida, sendo esta redução mais expressiva na segunda fase. Com relação à atividade antiinflamatória, entretanto, não apresentou resultados significativos no modelo utilizado. Na avaliação da atividade antitumoral, o extrato demonstrou redução significante nos pesos dos tumores e discretas alterações microscópicas, com índice de inibição tumoral na maior dose de 99,4%. Com base nos resultados, pôde-se concluir que o extrato metanólico *C. echinata* apresentou baixa toxicidade, por via oral. Além disso, demonstrou possuir notada atividade antinociceptiva e antitumoral, nos protocolos testados. Com relação à atividade antiinflamatória, entretanto, o referido extrato não demonstrou possuir atividade. Outros ensaios devem ser realizados afim de elucidar o exato mecanismo dessas ações.

Palavras-chave: *Caesalpinia echinata* Lam.. Pau-brasil. Atividade antinociceptiva. Atividade antiinflamatória. Atividade antitumoral.

ABSTRACT

GRANGEIRO, A.R.S. Evaluation of the Toxic and Farmacologic Potencials of the ethanolic extract from *Caesalpinia echinata* Lam. Dissertation in Pharmaceutical Sciences/UFPE. Recife, 2009.

Caesalpinia echinata Lam, popularly know as "pau-brasil" or "pernambuco", is a tree with considerable historic and economic values. The objective of this work was to investigate the acute toxicity and the antinociceptive and antiinflammatory activities, and also the antitumor activity against Sarcoma 180, of the ethanolic crude extract from the leaves of *Caesalpinia echinata* Lam. The acute toxicity was measured by the Organisation for Economic Cooperation and Development guideline (OECD 423), that profess to manage continuous lowers doses starting with the maximum dose of 2000mg/kg to groups with three animals each. For the farmacological activities, it was used two models of noception: abdominal contortions induzed by acetic acid and formaline test, and for the anti-inflammatory activity, it was used the paw edema induzed by carragenan model. All activities used female albino Swiss mouses (*Mus musculus*), except the antiinflammatory activity, that used female adult rats (*Rattus norvegicus*). For the abdominal contortions test, the animals received the acetic acid 2% (0,1mL/10g) by intraperitoneally route. The number of contortions was observed for 20 minutes, five minutes after the injection of the acetic acid. For the formaline test, it was injected 20µL of formaline 2,5% in the right paw of the mouses. Right after the injection, the animals were observed individually and the duration licking time was determinate in times 0 to 5 minutes (first phase) and 15 to 30 minutes (second phase) after the aplication. At the paw edema test, it was administrated 0,3mL of carragenan (1%) in the right paw of the animals. For the evaluation of the antitumor activity, it was used the Stock methodology for induction of the Sarcoma 180. For all tests were used doses of 100, 200 and 300mg/kg of the ethanolic extract from *C. echinata* (test groups). The control group received saline solution, and the standard group received acetilsalicilic acid (100mg/kg) for the contortions test; morphine (10mg/kg) for the formaline test, indomethacin (20mg/kg) for the paw edema test, and metotrexate (5mg/kg) for the anti-tumor activity, all by oral route. The extract reduced the number of abdominal contortions induced by acetic acid, inhibiting up to 65,8% at the highest tested dose. At the formaline test, the extract statistically significative reduced both phases of licking time, and this reduce were more expressive at the second phase. Regarding to the antiinflammatory activity, however, it was observed no significative results in the model used. At the evaluation of the antitumor activity, the extract shown significative reduce in the tumors weight and discrete microscopic chances, with tumor inhibition rates in the highest does of 99,4%. Based on this results, it was conclude that the ethanolic extract of *C. echinata* shown low toxicity, by oral route. Besides, it shown have good antinociceptive and antitumor activities, in the protocols tested. Regarding to the anti-inflammatory activity, however, the extract show no activity. Others assays must be realized with the objective to elucidate the exact mechanism of these actions.

Key-words: *Caesalpinia echinata* Lam. Pau-brasil. Antinociceptive activity. Antiinflammatory activity. Antitumor activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural da brasilina (1), precursora da brasileína (2) 05

Figura 2- Vista geral de *Caesalpinia echinata* Lam. 06

Figura 3 - *Caesalpinia echinata* Lam. A: Caule; B: tronco com acúleos e C: corte transversal mostrando o cerne vermelho. Fonte: (AGUIAR & PINHO, 2007). 06

Figura 4 - Folhas de *Caesalpinia echinata* Lam. 07

Figura 5 - Inflorescência de *Caesalpinia echinata* com botões florais e flores em diferentes estágios de desenvolvimento. 07

Figura 6 – Fruto de *C. echinata* Lam 08

Figura 7 – Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. 08

ARTIGO I

Figura 1- Efeitos dos extratos de *C. echinata* frente ao Sarcoma 180.Os valores representam a média ± desvio padrão. * P <0,05 comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste "t" de Student (n = 5/grupo 23

LISTA DE TABELAS

Tabela 3: Efeito dos extratos de *C. echinata* sob o edema de pata induzido por carragenina (1%). 30

Tabela 2: Efeitos dos extratos de *C. echinata* no teste da formalina 31

Tabela 3: Efeito dos extratos de *C. echinata* sob o edema de pata induzido por carragenina (1%). 32

LISTA DE ABREVIATURAS

OECD	Organization for Economic Cooperation and Development Guideline
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio ambiente e dos Recursos Naturais
ATP	Trifosfato de adenosina
COX	Ciclooxigenase
S-180	Sarcoma 180
CEEA	Comissão de ética e experimentação animal
ANOVA	Análise de variância
e.p.m	Erro padrão

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS..... i
RESUMO..... iii
ABSTRACT..... iv
LISTA DE FIGURAS.....v
LISTA DE TABELAS.....vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....vii

1 INTRODUÇÃO..... 13

2 REVISÃO DE LITERATURA 16

2.1 *Caesalpinia echinata* Lam. 16
2.1.1 Aspectos históricos 16
2.1.2 Aspectos Botânicos 17
2.1.3 Aspectos fitoquímicos 20
2.1.4 Aspectos etnobotânicos e farmacológicos 21
2.2 A dor e seus mecanismos 21
2.3 Inflamação 23
2.4 Câncer 25
2.4.1 Sarcoma 180 27

3 OBJETIVOS 28

3.1 Objetivo Geral 28
3.2 Objetivos Específicos 28

4 ARTIGO I..... 29

5 ARTIGO II 37

6 CONCLUSÕES 46

7 REFERÊNCIAS 47

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais no atendimento à saúde é tão antiga quanto à própria humanidade. Sabe-se atualmente que os povos primitivos sempre buscaram no reino vegetal medicamentos para aliviar o sofrimento humano provocado por doenças ou acidentes. Através da experimentação e da observação dos animais, que também buscam nos vegetais, alívio para seus males, os povos de todos os tempos e todos os continentes produziram ao longo da História um saber importantíssimo sobre as propriedades das plantas medicinais (SILVA, 2003).

As primeiras descrições sobre plantas medicinais remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. Este documento, encontrado perto da pirâmide de Ramsés II, descreve 700 receitas utilizando-se drogas de natureza animal e vegetal. (ALONSO, 1999).

Há 5000 anos já era usada, na China, uma planta conhecida como *Ma Huang,* uma espécie de éfedra. Hoje, a efedrina, obtida a partir da *Ephedra sinica*, é consagrada pela sua ação antiasmática, hipotensiva e anti-hemorrágica. (PINTO et al, 2002)

No ano 78 d.C., o botânico grego Pedanios Dioscorides descreveu cerca de 600 plantas medicinais, além de produtos minerais e animais no tratado *De Materia Medica*. Este tratado permaneceu como fonte de referência por mais de catorze séculos (Robbers, Speedie, Tyler, 1996). Foi através da observação e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas de determinadas plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular. (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006)

O isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal começou a acontecer no século XVIII. Este século, juntamente com o XIX, caracterizaram-se pelos trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcalóides. É desta época o isolamento da morfina, quinina e estriquinina (PINTO et al, 2002).

No século XX, o surgimento dos antibióticos produzidos por fermentação microbiana aliado ao desenvolvimento marcante de fármacos sintéticos produzidos pela indústria farmacêutica, logo depois da II Grande Guerra, foram causas marcantes do declínio do uso de plantas medicinais e, subsequentemente, do investimento de fármacos de origem vegetal (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

A partir dos anos 1980, entretanto, os avanços técnicos e o desenvolvimento de novos métodos de isolamento de substâncias ativas a partir de fontes naturais, permitiram maior rapidez na identificação de extratos vegetais, ressurgindo o interesse pela pesquisa destas

substâncias como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (MARQUES, 1999; TUROLLA & NASCIMENTO, 2006).

A fitoterapia brasileira, assim como a de todo mundo, encontra-se em processo de ampla expansão. A utilização de plantas, no Brasil, com propósitos curativos teve sua origem inicialmente na cultura indígena, posteriormente através dos conhecimentos trazidos da África pelos negros e, finalmente, por meio dos imigrantes. Em todas as regiões, o uso de plantas medicinais nas suas mais diversas formas, tornou-se uma prática comum, desenvolvida por todas as camadas da sociedade, especialmente pelas populações submetidas a privações sociais e econômicas (MELO, 1991).

A utilização de produtos naturais como matéria-prima para a produção de substâncias com atividade biológica, especialmente os fármacos, tem sido extensamente relatada ao longo dos anos (SIMÕES, et al, 1999). Desta forma, as plantas medicinais constituem uma fonte renovável de onde podem ser obtidos novos e eficazes medicamentos (DI STASI, 1995).

É muito expressivo o número de medicamentos disponíveis na terapêutica moderna desenvolvidos a partir de plantas medicinais, como por exemplo: a escopolamina (sedativo), quinina (antimalárico), eugenol (analgésico tópico), cafeína (estimulante do sistema nervoso central), azadiraquitina (fagorepelente), morfina (analgésico), reserpina (tranquilizante), entre outros. (SHU, 1996;PHILLIPSON, 2001).

Neste sentido, os produtos naturais têm contribuído fortemente no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas através de seus metabólitos secundários. Estes são conhecidos por atuar de forma direta ou indireta no organismo, podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares (CALIXTO et al, 2003).

Os dados existentes na literatura sobre a atividade biológica de plantas preconizadas pela população, todavia, são insuficientes para garantir sua qualidade, eficácia e segurança. Além disso, as plantas contêm milhares de constituintes dos quais alguns apresentam relativa toxicidade (CALIXTO, 2000).

Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e dos fitoterápicos pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade. O emprego das plantas medicinais de ação supostamente inofensiva à saúde pode muitas vezes ser responsável por resultados desastrosos, já que, ocasionalmente uma mesma planta pode apresentar tanto uma ação terapêutica quanto tóxica, conforme dosagem e modo de preparo. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública (GOMES et al., 2001).

Com base nisso, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi aprovada por meio do Decreto N° 5.813 de 22 de Junho de 2006, estabelecendo diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações em torno de objetivos comuns voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil, incentivando o desenvolvimento de tecnologias e o uso sustentável da biodiversidade brasileira (BRASIL, 2006a).

A humanidade, ao longo do tempo selecionou apenas cerca de 300 plantas para a alimentação e, de um pouco mais de uma centena, obteve princípios ativos puros para o tratamento de doenças. Estes números são bem modestos quando se está diante de um universo de aproximadamente 250.000 espécies de plantas superiores (PINTO et al, 2002).

Caesalpinia sp. é um gênero bastante estudado em todo o mundo. No Brasil, entretanto, sua utilização medicinal bem como suas propriedades ainda não são muito difundidas. Algumas espécies pertencentes a esse gênero são conhecidas por apresentarem atividade antifúngica, antioxidante, analgésica e antiinflamatória, entre outros (JUN et al, 2008).

Dentre as espécies que pertencem ao gênero *Caesalpinia* sp., destaca-se na flora brasileira a espécie *Caesalpinia echinata* Lam, de elevado interesse histórico e econômico. Recentemente, estudos demonstraram que a mesma possui significativa atividade antitumoral. Entretanto, de acordo com Aguiar e Barbosa (1985) são raros os estudos acerca dessa espécie.

Nesse sentido, a comprovação das propriedades terapêuticas das plantas, através de recursos laboratoriais, representa a síntese dos conhecimentos empíricos e científicos (MELO, 1991).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Caesalpinia echinata* Lam.

2.1.1 Aspectos históricos

Caesalpinia echinata Lam., é a árvore nacional de acordo com a Lei n. 6.607 de 07/12/1978 e, três de maio - dia do Pau-brasil. Trata-se de espécie da Mata Atlântica, que na época do descobrimento era abundante no litoral brasileiro, principalmente no trecho do Rio de Janeiro, Bahia e Pernambuco (AGUIAR & PINHO, 2007).

Em 1550, quando navegadores portugueses chegaram na América do Sul, no que hoje é a costa brasileira, encontraram uma densa floresta rica em uma árvore utilizada pelos índios como fonte de um pigmento vermelho. Os portugueses concluíram que essa árvore era muito similar a uma que eles transportavam da Ásia e chamaram-na de pau-brasil (DEFILIPPS, 1998).

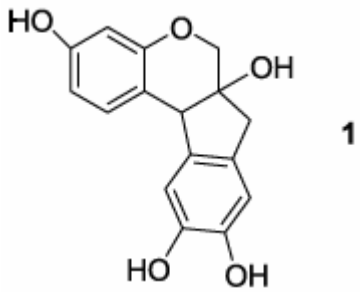
O pau-brasil substituía assim a *Caesalpinia sappan* L. da Ásia, que também produzia tinta vermelha, porém de qualidade inferior (SODRÉ, 1985).

No início da colonização brasileira, século XVI, iniciou-se a extração, o comércio e o tráfico da madeira de pau-brasil, constituindo-se o primeiro ciclo econômico da colônia. A espécie era utilizada na construção civil e naval, e o principal interesse era para extração do corante encontrado em seu cerne, a brasilina. (ROCHA 2004).

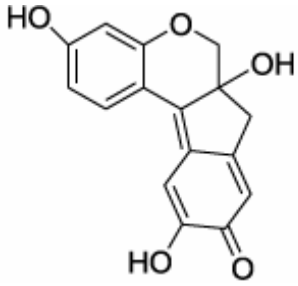
Segundo Rizzini & Mons (1976), a brasilina ao entrar em contato com o ar passa por uma auto-oxidação e transforma-se em brasileína, a matéria corante vermelha. Era utilizada no tingimento de tecidos de algodão, penas e como tinta para máquinas de escrever (ROCHA, 2004).

Em 1785, Lamarck assinalou que a tinta servia para pintar ovos de páscoa e pasta de escovar dentes. Ainda se produzia um composto para pintar o rosto das mulheres, atualmente conhecido por “rouge”. Esta tinta, procedente do pau-brasil, foi largamente utilizada durante quase quatro séculos. Na segunda metade do século XIX foi substituída pelos corantes oriundos da indústria da anilina. (LAMARCK apud AGUIAR & PINHO, 2007).

O declínio do comércio do pau-brasil deu-se a partir de meados do século XIX com a síntese do primeiro corante artificial em 1856, a malveína, por William H. Perkin. Desde então, seguiu-se uma intensa atividade industrial para a obtenção de corantes artificiais, da qual resultou a síntese da brasilina (Figura **1.1**), o pigmento do pau brasil, por Robert Robinson (AGUIAR & PINHO, 2007).



1



2

Figura 1: Fórmula estrutural da brasilina (1), precursora da brasileína (2)

Apesar de sua derrubada ser autorizada em apenas casos especiais (Portaria 113/95 do IBAMA) sua extração ilegal por fazendeiros, madeireiros e lenhadores continua ocorrendo com grande freqüência. O novo surto de exploração do pau-brasil está relacionado com o fato de sua madeira produzir os melhores arcos de violino do mundo. Seu uso inclui ainda a fabricação de móveis, objetos de artesanato, na construção civil e naval. (CARVALHO, 1994; BUENO, 2002).

Ainda hoje, embora em pequena escala, há exportação da madeira do pau-brasil para o exterior, principalmente para Alemanha. Essa exportação chegou à ordem de 50 toneladas por ano na década de 70 (NERY, 1979).

2.1.2 Aspectos Botânicos

A ordem Fabales contém aproximadamente 18.860 espécies, distribuídas em 3 famílias: Poligalaceae, Surianaceae e Fabaceae (JUDD et al., 1999).

Na família Fabaceae, três subfamílias podem ser reconhecidas: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (JUDD et al., 1999; DOYLE et al., 2000).

Na subfamília Caesalpinioideae, encontra-se o gênero Caesalpinia, que contém um total de 120 espécies, dentre elas *C. echinata*, *C. ferrea* e *C. pyrimidalis*. Trata-se de um gênero importante devido ao seu alto interesse histórico, econômico, ecológico (ZAIA, 2004).

Caesalpinia echinata Lam (Figura 2), ou "pau-brasil,"tem ocorrência natural desde o Estado do Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro, numa extensa faixa de 3.000 km. É uma árvore que cresce tipicamente em floresta primária densa, sendo raramente encontrada em formações secundárias; atualmente há poucos exemplares de pau-brasil ocorrendo naturalmente nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Pernambuco e Rio Grande do Norte (ROCHA, 2004).

Figura 2- Visão geral de *Caesalpinia echinata* Lam.

O caule do pau-brasil (Figura 3A) atinge até 30 m de altura e 40 a 60 cm de diâmetro em condições naturais, porém quando cultivado, dificilmente ultrapassa 15 m, com diâmetro de 20 a 40 cm (Aguiar & Pinho 1996). Apresenta casca pardo-acinzentada e com muitos acúleos (Figura 3B) que diminuem sensivelmente com a idade da planta. A madeira do cerne (Figura 3C) é castanho-avermelhada e alburno fino de coloração amarelada (AGUIAR & PINHO 2007).

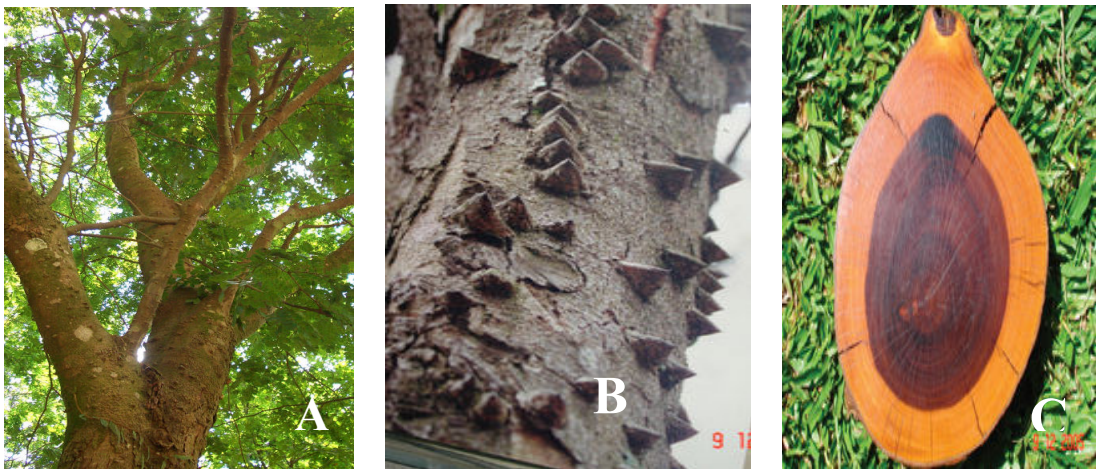


Figura 3 - *Caesalpinia echinata* Lam. A: Caule; B: tronco com acúleos e C: corte transversal mostrando o cerne vermelho. Fonte: (AGUIAR & PINHO, 2007).

As folhas do pau-brasil caracterizam-se como alternas, compostas, bipinadas (subdividida em pinas e estas em folíolos), de folíolos ovais e pequenos, formando folhagem densa verde-escura brilhante (AGUIAR & PINHO, 1996).

Figura 4 - Folhas de *Caesalpinia echinata* Lam.

As flores estão reunidas em inflorescência do tipo cacho simples, com pétalas de coloração amarelo-ouro; sendo que uma delas, denominada vexílo ou estandarte, possui coloração vermelho-púrpura, o que proporciona às flores caráter bastante ornamental (AGUIAR, 2001).

Figura 5 - Inflorescência de *Caesalpinia echinata* com botões florais e flores em diferentes estágios de desenvolvimento.

Seus frutos são do tipo vagem, possuindo deiscência explosiva e são totalmente recobertos por acúleos que se formam logo após a floração (CARVALHO, 1994).

Figura 6 – Fruto de *C. echinata* Lam

A semente do pau-brasil (Figura 7) é achatada, elíptica, lisa de 1 a 1,5 cm de diâmetro por 0,3 cm de espessura, de 2 a 4 por fruto (AGUIAR et al. 2007).

Figura 7 – Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam.

2.1.3 Aspectos fitoquímicos

O estudo fitoquímico da casca do vegetal demonstrou abundante presença de taninos (SILVA, 2001). A investigação do lenho do vegetal demonstrou a presença de ligninas, polímero de três álcoois: pcoumaril, siringil e sinapil, este polímero está presente em 20-30% da parede celular da madeira e lhe confere rigidez e durabilidade, e pode ser responsável pelas propriedades vibracionais da madeira, explicando seu emprego na fabricação de arcos de violino (FUKUSHIMA; FUZETO, 2003). Contudo, o principal constituinte do extrato bruto desta parte do vegetal é sem dúvida a brasilina (OLIVEIRA et al, 2002).

Rezende e cols. (2004) em estudo de identificação dos componentes químicos das flores e folhas do pau-brasil, encontraram o E-beta-ocimeno como constituinte majoritário (57,2%) das flores, e o (E)-3– hexeno-1-ol (30,8%), como principal componente das folhas. Dessa forma a classe de metabólitos mais bem representada foi a dos compostos fenólicos.

Foram identificados ainda por CGAR-EM alguns monoterpenos, ácidos carboxílicos e ésteres, os últimos de estrutura relacionada ao álcool insaturado majoritário como o acetato e o butirato de (*Z*)-3- hexenoíla e o ácido (*Z*)-3-hexenóico.

Derivados fenólicos C6-C3 e furanoditerpenos são os metabólitos secundários mais observados em espécies do gênero *Caesalpinia*. Estudos etnobotânicos levaram à investigação da atividade farmacológica de algumas destas espécies, onde foi evidenciada a atuação da brasilína como inibidor da peroxidação lipídica e como modulador de funções imunológicas, propriedades associadas ao poder antioxidante resultante do núcleo catecólico presente (PETER et al., 1998).

Em 2005, Luna e colaboradores relataram a presença de fenóis, flavononas, flavonas, flavonóides, esteróides, triterpenos, antraquinonas e antronas no extrato etanólico das folhas de *C. echinata*.

2.1.4 Aspectos etnobotânicos e farmacológicos

De acordo com Ramalho (1978), a espécie *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) tem sido pouco estudada para usos medicinais. Entretanto tem sido citada, embora raramente, como de utilidade alopática e homeopática, sendo lembrada como remédio adstringente, corroborante e secante, empregando-se a casca cozida, para debelar diarréias e disenterias e, quando reduzida a pó, a casca também possui aplicação no fortalecimento de gengivas.

Recentemente, estudos com esse vegetal demonstraram que a mesma possui significativa atividade antitumoral. Entretanto, de acordo com Aguiar e Barbosa (1985) são raros os estudos acerca dessa espécie.

Segundo Luna e colaboradores (2005), o extrato etanólico das folhas de *C. echinata* mostrou significativa atividade frente ao *Aedes aegypti* e à *Artemia salina.* O extrato etanólico do caule do pau-brasil, apresentou uma atividade muito potente contra os ovos de *Biomphalaria glabrata*.

Silva (2006), avaliando o extrato etanólico do cerne do pau-brasil, encontrou elevada atividade antitumoral frente ao Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich.

2.2 A dor e seus mecanismos

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano tecidual potencial ou de fato, ou ainda descrita em termos que sugerem tal dano (MERSKEY & BOGDUK, 1994).

A sensação de dor tem um papel fisiológico importante, funcionando como um dos principais sintomas clínicos de alerta para a detecção de algo que ameace a integridade física do organismo (CHAPMAN e GAVRIN, 1999).

No início do século vinte foi introduzido o termo nocicepção (do latim *Nocere,* "lesar"); fato importante uma vez que em modelos animais, a dor é avaliada indiretamente através da observação comportamental. O termo nocicepção refere-se apenas à parte fisiológica da dor, sem levar em consideração os aspectos psicológicos que também influenciam na percepção final da dor. Dessa forma, modelos animais de dor são de fato modelos de nocicepção (TJØLSEN et al, 1997).

O processo doloroso tem início nos nociceptores, os quais são receptores morfologicamente diferenciados e estão presentes nas terminações livres das fibras nervosas aferentes (FURST, 1999). Eles são sensibilizados quando o estímulo é potencialmente perigoso, ou seja, excede uma determinada faixa considerada fisiológica (estímulo inócuo) (BURGESS et al., 1967; MILLAN, 1999).

Os nociceptores, localizados na porção distal dos neurônios aferentes sensoriais (neurônios de primeira ordem), estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras (JULIUS & BASBAUM, 2001). Dividem-se em três classes: os mecanoceptores, sensíveis a estímulos mecânicos intensos; os termoceptores, sensíveis a estímulos térmicos (acima de 45°C) e os nociceptores polimodais, sensíveis tanto a estímulos mecânicos e térmicos quanto químicos (TEIXEIRA et al., 1994; BESSON, 1999).

A estimulação dos nociceptores, que pode ocorrer devido à mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), diferença osmótica ou distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico), hipóxia ou lesão tecidual seguida de inflamação (estímulo nocivo químico), promove uma liberação local de mediadores químicos, tais como bradicinina, prótons, histamina, serotonina, metabólitos do ácido araquidônico, ATP, adenosina, citocinas, aminoácidos excitatórios, óxido nítrico, substância P, neurotrofinas, bombesina, opióides, somatostatina, acetilcolina, entre outros (GRIFFIS et al., 2006).

Estes mediadores interagem com nociceptores específicos conduzindo à propagação do sinal nociceptivo por alteração na permeabilidade da membrana da fibra nervosa gerando o potencial de ação (JULIUS & BASBAUM, 2001; GRIFFIS et al., 2006).

Os nociceptores transmitem as informações dolorosas para a medula espinhal através das fibras sensoriais aferentes que podem ser de três tipos: fibras Aβ, que são fibras mielinizadas com diâmetro maior; fibras Aδ, as quais são mielinizadas de diâmetro médio; e

fibras C, que são amielínicas e de diâmetro pequeno. As fibras C constituem a maior parte das fibras sensoriais (FURST, 1999; GRUBB, 1998; SHELLEY & CROSS, 1994).

Todas as fibras nociceptivas sensoriais primárias fazem conexões sinápticas com neurônios secundários na substância cinzenta do corno dorsal da medula espinhal. Os neurônios do corno dorsal, por sua vez, projetam seus axônios e transmitem a informação nociceptiva para os centros encefálicos, incluindo a formação reticular, hipotálamo e tálamo (MILLAN, 1999; ALMEIDA et al., 2004).

O tálamo desempenha um papel fundamental na integração do impulso doloroso. A partir do tálamo, neurônios de terceira ordem transmitem impulsos para o córtex cerebral, onde ocorre o processamento que resulta em consciência da dor (FÜRST, 1999).

O critério mais simples de classificação da dor continua sendo aquele que relaciona o tempo de duração da mesma. A duração do episódio de dor pode ser transitório, agudo ou crônico. No processo crônico, a dor é causada por um dano tecidual ou por uma patologia, sendo também mantida por outros fatores metabólicos envolvidos que não os gerados no início do processo doloroso. Na dor aguda ocorre dano e ativação dos nociceptores na região envolvida com a lesão. No tipo transitório, não acorre qualquer dano tecidual, porém outros fatores podem ativar os nociceptores (MILLAN, 1999).

A dor também pode ser classificada de acordo com os neurotransmissores e/ou tipo de lesão em “neurogênica”, “neuropática”, “nociceptiva” ou “psicogênica” e está respectivamente, associada com lesão neural, disfunção neural, ativação aumentada dos nociceptores ou fatores psicológicos. Várias evidências sugerem que a hiperexcitabilidade e descargas ectópicas dos aferentes nociceptivos primários levam a hipernocicepção (alodínia, hiperalgesia ou dor espontânea) devido ao aumento da atividade de uma variedade de canais iônicos (MILLAN, 1999).

2.3 Inflamação

Inflamação é uma resposta à infecção, antígenos ou lesão tecidual e tem por função erradicar os agentes microbianos ou irritantes e potencializar o reparo tecidual (FLOWER e PERRETTI, 2005).

A reação inflamatória é caracterizada pela presença de rubor (eritema), calor (aumento de temperatura na região inflamada), tumor (edema), dor e perda da função do tecido afetado (PEREIRA, 2004).

O rubor e o calor são o resultado de um aumento da circulação na área inflamada. O tumor é conseqüência do aumento local do líquido intersticial e a dor depende do acúmulo, no

local, de substâncias biológicas que atuam sobre as terminações nervosas. A perda da função é a conseqüência do somatório de vários fatores, especialmente do edema e da dor. Os sinais cardinais se referem a inflamações da superfície corpórea ou das articulações, porém, inflamações com as mesmas características ocorrem em todos os tecidos e órgãos agredidos (MONTENEGRO & FRANCO, 2004).

O processo inflamatório é fundamental para defesa do organismo e tem por objetivo localizar a região afetada, eliminar o agente agressor e remover os tecidos degenerados, preparando a região acometida para a reparação. Contudo, em algumas doenças, a resposta inflamatória torna-se exagerada, persistindo sem qualquer benefício aparente (SILVA; CARVALHO, 2004, SIQUEIRA; DANTAS, 2000).

A inflamação envolve, entre outros, a ação do sistema complemento, sistema de coagulação, resposta imunológica humoral e celular, citocinas, hormônios, angiogênese e processos de reparo (HAVSTEEN, 2002).

Os principais mediadores da inflamação são: histamina, eicosanóides, fator de ativação plaquetária (PAF), bradicinina, óxido nítrico, neuropeptídeos e citocinas (RANG et al., 2005).

Os eicosanóides são substâncias derivadas de ácidos graxos essenciais de 20 carbonos, que contém três, quarto ou cinco ligações duplas (dentre eles o ácido araquidônico), e compreendem as famílias das prostaglandinas, leucotrienos e compostos relacionados. O aumento da biossíntese de eicosanóides é regulado com precisão e ocorre em resposta a estímulos físicos, químicos e hormonais diversos. São produzidos como produtos de vários sistemas enzimáticos diferentes, incluindo as ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) ou lipoxigenases ou citocromo P450s. Vários grupos de medicamentos, em especial os fármacos antiinflamatórios não-esteroidais, têm seus efeitos terapêuticos atribuíveis ao bloqueio da produção de eicosanóides (CAMPBELL & HALUSHKA, 1996)

Assim, a reação inflamatória consiste num evento complexo que envolve o reconhecimento do agente/estímulo lesivo, para sua posterior destruição e tentativa de reconstruir o tecido danificado. O reconhecimento desencadeia a ativação e a ampliação do sistema imune resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores responsáveis pela resposta inflamatória. No entanto, se a destruição do agente agressor e o processo de reparo não ocorrem de maneira eficiente e sincronizada, a resposta inflamatória pode levar a uma lesão tecidual persistente induzida pelo acúmulo de leucócitos, colágeno, entre outras substâncias que podem ser prejudiciais ao organismo (NATHAN, 2002).

O processo inflamatório é didaticamente dividido em dois momentos. O primeiro que é desencadeado logo após a instalação do agente agressor (inflamação aguda), sendo caracterizado por infiltrado predominantemente neutrofílico, associado ao aumento de permeabilidade vascular com exsudação de plasma e proteínas plasmáticas, edema, dor e necrose. O outro momento que depende ou não da resolução do processo na fase aguda (inflamação crônica), é caracterizado pela presença de macrófagos e linfócitos, além de angiogênese e proliferação de tecido conjuntivo (BAUHMANN; GAUDE, 1994).

O processo inflamatório compreende dois eventos que ocorrem simultaneamente durante o curso evolutivo desta reação (eventos vasculares e celulares) (BEVILACQUA et al, 1994).

Microscopicamente a inflamação envolve uma série de eventos complexos nos quais a mudança vascular é a que se inicia rapidamente e desenvolve-se durante as primeiras horas. Mudanças vasculares são reguladas por fatores que controlam a exsudação, as quais ocorrem principalmente nas vênulas pós-capilares. Esta fase ocorre ou concomitantemente é desenvolvida em associação entre neutrófilos e o endotélio nas vênulas pós-capilares, a qual contribui para uma fase mais prolongada de aumento da permeabilidade vascular. O exsudato é absorvido para dentro dos vasos linfáticos, aonde deslocam-se para os nódulos linfáticos ou tecido linfático onde uma reação imune pode então ser iniciada (CIRINO et al, 2003).

Uma maneira eficiente do hospedeiro defender-se contra agentes agressores é através do infiltrado leucocitário, onde as células imunológicas alcançam o foco da lesão e fagocitam, degradam e matam antígenos estranhos. Muitas vezes, num processo inflamatório prolongado estas células imunes podem agredir os próprios tecidos do hospedeiro, lesionando células normais. Além do que o próprio infiltrado celular pode contribuir para a amplificação dos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória, através da liberação de mediadores vasoativos e quimiotáticos (BEVILACQUA et al, 1994; WEDMORE; WILLIAMS, 1981).

2.4 Câncer

A palavra câncer foi utilizada pela primeira vez por Galeno (131-201) d.C. na Ásia Menor, para designar um tumor maligno de mama, por ele estudado, em que as veias, inturgecidas e ramificadas, lembravam as patas de um caranguejo (PY & JACCQUES, 2003).

Câncer é a denominação genérica para as neoplasias malignas. Neoplasia, por sua vez, significa “crescimento novo” e define condições de proliferação celular anormal, encontrada nos tumores benignos e malignos (NAKAGAWA; LOPES, 2000).

Em tecido normal, a velocidade de formação de novas células é contrabalanceada por mecanismos fisiológicos que levam a sua destruição, mantendo o equilíbrio da massa tecidual. A ruptura desse equilíbrio, no sentido de produção excessiva de células anormais, pode levar ao desenvolvimento de neoplasias (COTRAN; KUMAR; ROBINS, 2000).

O processo de carcinogênese, é quase sempre, muito lento, podendo demorar anos para que a célula transformada origine um tumor clinicamente detectável. Esse processo inclui três estágios: iniciação, promoção e progressão (REDDY et al, 2003; DONNICI et al, 2004).

A iniciação se dá através da exposição de células normais a carcinógenos. A conseqüência disso, ou seja, a transformação pode permanecer dormente e levar anos para se manifestar. No segundo estágio, a célula iniciada sofre um longo período de contato com o agente transformador. Neste momento, o estilo de vida pode ter efeitos benéficos e evitar o desenvolvimento de cânceres. A progressão já é caracterizada pela proliferação descontrolada das células malignas, evoluindo para as manifestações clínicas e metástases (REDDY et al, 2003; DONNICI et al, 2004).

Uma classificação simples, mas de grande importância prática, é a de tumores benignos e malignos. Esta divisão baseia-se nos caracteres dos tumores, revelados por métodos clínicos e morfológicos (FARIA; ALTEMANI,1988).

Os tumores benignos são de crescimento lento, apresentando limites bem definidos com o tecido adjacente, na maioria das vezes são facilmente dessecadas e não produzem metástases. Os tumores malignos, denominadas “câncer”, apresentam crescimento rápido e infiltrativo, possuem, em geral, contornos mal definidos e podem produzir metástases (COTRAN; KUMAR; ROBINS, 2000).

Os cânceres são classificados de acordo com o tecido e tipo de célula que lhe dão origem. Cânceres que se originam de células epiteliais são chamados carcinomas, aqueles que se originam de tecidos conjuntivos ou musculares são denominados sarcomas. Aqueles que não se enquadram nestas duas categorias incluem as várias leucemias, derivadas de células hematopoéticas e cânceres derivados do sistema nervoso (ALBERTS *et al*., 2004).

Qualquer que seja a causa, o câncer é basicamente uma doença celular, caracterizada por desvio nos mecanismos de controle que dirigem a proliferação e diferenciação celular, além de processos de apoptose celular (MOFFATT et al., 2000).

Tudo isto, em decorrência de certa mudança no repertório da expressão gênica devido a alguma mutação ocorrida no DNA que determina o aparecimento e/ou o comportamento da neoplasia (DUESBERG; RASNICK, 2000).

Os progressos da bioquímica e biologia molecular trouxeram esclarecimentos sobre a patogenia do câncer em nível bioquímico, o que permitiu novas abordagens terapêuticas. Entretanto, como o câncer é uma família de doenças, cada tipo de câncer tem sua evolução clínica (ENGERS;GABBERT, 2000)

Existem três abordagens principais para o tratamento de câncer: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia é considerada como o mais efetivo método de tratamento do câncer (AJITH; JANARDHANAN, 2002), uma vez que muitos tumores caracterizam-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, o que evidencia a necessidade de uma abordagem terapêutica sistêmica que é realizada pela quimioterapia (ENGERS;GABBERT, 2000)

O sucesso no tratamento dos tumores por meio de fármacos depende da maior sensibilidade ao tratamento das células neoplásicas, comparativamente às células normais, uma vez que células em proliferação são, em geral, mais susceptíveis a estes agentes do que as células quiescentes. Entretanto, as diferenças de sensibilidade entre células neoplásicas e normais são, às vezes, pequenas, e a toxicidade é um problema comum (RUSTIGI; PODOLSKY, 1996).

2.4.1 Sarcoma 180

O sarcoma 180 (S-180), ou tumor de Crocker, é um tumor indiferenciado que foi descrito pela primeira vez em ratos albinos machos, em 1914. Este tumor foi encontrado na região axilar direita e diagnosticado na época como carcinoma, mas o tecido de origem não foi especificado, de forma que não se sabe se era uma neoplasia cutânea ou mamária. Estudos posteriores demonstraram que suas células não produzem laminina, o que não permite sua caracterização como de origem epitelial, mas o nome Sarcoma 180 ficou consagrado na literatura. O tumor invade músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos sangüíneos (STEWART et al., 1959).

Apesar de seu comportamento agressivo, esse tumor não produz metástases (KURASHIGE; MITSUHASHI, 1982). O S-180 pode ser transplantado por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal e cresce rapidamente em 90 a 100% dos animais inoculados, havendo uma taxa de regressão natural de 8 a 10%. Próximo ao 28º dia após a inoculação subcutânea, alguns animais desenvolvem ulceração. O tempo de sobrevida, em geral, é de 28 a 30 dias (ZUCKERBERG, 1973).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a toxicidade aguda e atividades farmacológicas do extrato etanólico das folhas de *Caesalpinia echinata* Lam.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas de *Caesalpinia echinata* Lam.;
- Verificar o efeito antinociceptivo do extrato de folhas de *Caesalpinia echinata* Lam em dois modelos de nocicepção (teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e teste da formalina);
- Investigar a atividade antiinflamatória das folhas de *Caesalpinia echinata* Lam através do modelo do edema de pata induzido por carragenina;
- Avaliar a atividade antitumoral do extrato etanólico das folhas de *Caesalpinia echinata* Lam frente ao Sarcoma 180.

Atividade Antitumoral das folhas de *Caesalpinia echinata* Lam. frente ao Sarcoma 180

Ana Ruth Sampaio Grangeiro*, Isla Vanessa Gomes Alves Bastos[1], Eliane Leite de Souza[1], Guilherme Carvalho Ribeiro Rodrigues[1], Grace Kelly, Falba Bernadete dos Anjos[2], Ivone Antonia de Souza[1]

1- Departamento de Antibióticos, Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

2- Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

RESUMO

A obtenção de produtos efetivos de origem natural tem propiciado o avanço das pesquisas científicas contra as enfermidades. Essas novas moléculas de origem natural proporcionam maior diversidade farmacológica para o tratamento dessas doenças. *Caesalpinia echinata* Lam. é popularmente conhecida como "pau-brasil", é uma árvore com considerável valor histórico e econômico. O objetivo deste trabalho foi investigar a toxicidade aguda e efeito antitumoral do extrato etanólico das folhas de Caesalpinia echinata Lam. ao Sarcoma 180. A toxicidade aguda foi avaliada através da metodologia da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD 423), que preconiza administrar, a grupos de três animais, doses seqüenciais menores a partir da máxima de 2000 mg/kg. Na avaliação da atividade antitumoral foi utilizada a metodologia de Stock para indução do Sarcoma 180. Para todos os testes foram usadas doses de 100, 200 e 300mg/kg do extrato etanólico de *C. echinata* (grupos tratados). Com base nos resultados, pôde-se concluir que o extrato metanólico *C. echinata* apresentou baixa toxicidade, por via oral. Na avaliação da atividade antitumoral, o extrato demonstrou redução significante nos pesos dos tumores e discretas alterações microscópicas, com índice de inibição tumoral na maior dose de 99,4%. O extrato etanólico das folhas de C. echinata reduziu de forma significativa os tumores Sarcoma 180.

Unitermos: *Caesalpinia echinata*, "pau-brasil", toxicidade aguda, atividade antitumoral.

INTRODUÇÃO

De acordo com Cragg e Newman (2000), mais de 50% das drogas em testes clínicos para atividade antitumoral foram isoladas de fontes naturais ou estão relacionadas a elas.

* Ana Ruth Sampaio Grangeiro
Email: ruth.sampaio@gmail.com
Departamento de Antibióticos - UFPE
Av. Prof. Moraes do Rêgo S/Nº
Recife – PE

Vários produtos de plantas têm sido testados para atividade antitumoral e algumas delas, como a vincristina e o taxol são consideradas drogas de escolha.

Caesalpinia sp. é um gênero bastante estudado em todo o mundo. No Brasil, entretanto, sua utilização medicinal bem como suas propriedades ainda não são muito difundidas. Algumas espécies pertencentes a esse gênero são conhecidas por apresentarem atividade antifúngica, antioxidante, analgésica e antiinflamatória, entre outros (Hu et al, 2008).

Caesalpinia echinata Lam. é uma espécie nativa do Brasil, pertencente à família Leguminosae, e subfamília Caesalpinioideae, sendo conhecida na linguagem tupi-guarani, como ibirapitanga (pau-vermelho) (Cunha & Lima, 1992; Lorenzi, 1992).

Em estudos recentes, Silva (2006) revelou que o extrato do cerne de *Caesalpinia echinata* Lam. possui significativa atividade antitumoral frente ao Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich.

O presente trabalhou teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda e o efeito antitumoral de *C. echinata* frente ao Sarcoma 180 com avaliação histopatológica de órgãos (fígado, baço e rins) e tumores.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

As folhas do pau-brasil foram coletadas no campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) no mês de janeiro de 2008. A exsicata da espécie vegetal foi identificada pela botânica Drª. Marlene Barbosa, e depositada no herbário Geraldo Mariz da UFPE, sob número 41.764.

Obtenção do extrato

O material botânico utilizado foi constituído pelas folhas de *Caesalpinia echinata* Lam. sob a forma de extrato etanólico (EE) obtido após maceração, concentrado à secura em rotaevaporador sob pressão reduzida para eliminação do solvente orgânico.

Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas, com pesos entre 25-35g e 60 dias de idade. Os animais receberam água e ração *ad libitum,* ficando sob ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de 23 ± 2ºC. O manuseio dos animais durante o experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE (processo número 23076.014521/2005-89).

Toxicidade Aguda

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada segundo a metodologia da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD 423), que preconiza administrar, a grupos de três animais, doses seqüenciais menores a partir da máxima de 2000 mg/kg, caso seja observado morte. Existindo morte, devem ser administradas as doses sequenciais 300, 50 e 5mg/kg.

O extrato das folhas de *C. echinata* foi administrado, por via oral, nas doses de 5, 50, 300 e 2000mg/kg. Os animais foram observados individualmente após a administração, durante 30 minutos e periodicamente durante as primeiras 24 horas. Foi necessária especial atenção durante as primeiras 4 horas e diariamente por um total de 14 dias.

Ao final do experimento, os animais sobreviventes foram pesados e sacrificados. Após o sacrifício, os animais foram ser eutanasiados e todas as alterações patológicas foram registradas.

Atividade Antitumoral

A implantação do Sarcoma 180 foi realizada segundo a técnica descrita por Stock et al (1954) e modificada por Komiyama (1992). O tratamento teve início 48 horas após o implante com a administração oral do extrato etanólico das folhas de *C. echinata* nas concentrações de 100, 200 e 300 mg.kg-1 aos grupos tratados, Metotrexato (10 mg.kg-1) ao grupo padrão e solução salina a 0,9% aos grupos controles. Todas as doses foram administradas por via oral e os pesos dos animais foram mensurados diariamente durante um período de oito dias. Após o término do tratamento, todos os animais foram pesados, sacrificados e os tumores serão retirados, dissecados, pesados e avaliados histologicamente, seguindo a metodologia de DAGLI (1989).A inibição do crescimento tumoral foi calculada em comparação ao grupo controle após pesagem dos tumores.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão (e.p.m.). As diferenças entre grupos foram analisadas através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste "*t*" de Student. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre < 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas medicinais contêm princípios ativos, que são responsáveis pelas propriedades terapêuticas a que lhe são atribuídas, mas também pelas intoxicações e reações adversas que podem aparecer devido ao seu emprego em doses inadequadas e/ou por períodos prolongados (Bastos, 2007).

A avaliação da toxicidade aguda, realizada pela metodologia preconizada pela OECD, revelou que o extrato etanólico das folhas de *Caesalpinia echinata* Lam nas doses de 5, 50 e 300mg não apresentaram nenhuma alteração comportamental nos animais nos 30 minutos observados. E ao final dos 14 dias de observações permaneceram sem alterações comportamentais dignas de nota.

Nas doses de 2000mg/kg, nos primeiros 15 minutos de observações, os animais apresentaram reações excitatórias e estimulantes, tais como: exoftalmia, agitação, movimentos de vibrissas, movimentos estereotipados, postura em garra, agressividade, além de: edema de focinho, espasmos e contorções. Após esse período, os animais apresentaram reações depressoras tais como abaixamento do trem posterior e sonolência. No final dos 14 dias não foi observado nenhum óbito e nem mudanças comportamentais significantes.

A fase excitatória aqui observada sugere que o extrato possui compostos estimulantes ao sistema nervoso central, e após esta fase os sinais depressores podem ter sido causados devido a uma fadiga neuronal que ocorre normalmente após uma intensa fase excitatória, ou até mesmo, a metabolização do ou dos princípios tóxicos da planta terem resultado em algum composto que haja deprimindo o Sistema Nervoso Central (Bloom, 1990).

A análise macroscópica dos órgãos dos animais tratados com a maior dose (2000mg/kg) não demonstrou alterações. A microscopia revelou que o fígado, baço e pulmão demonstraram morfologia preservada, os rins, entretanto, apresentaram discreta congestão vascular nos interstícios dos vasos renais próximos aos glomérulos renais.

A inibição do câncer através de uma variedade de fitoconstituintes foi confirmada em diferentes modelos de experimentação animal e, a partir disso, vêm sendo elaboradas estratégias de prevenção (SINGLETARY, 2000).

O extrato etanólico de *C. echinata* frente ao Sarcoma 180 na menor dose (100 mg/kg) apresentou aproximadamente 22,4% de inibição tumoral, a dose de 200mg/kg reduziu o tumor em 55,5% e a dose de 300mg/kg apresentou índice de inibição tumoral estatisticamente significativo de 99,4% quando comparado ao grupo controle. O fármaco padrão, metotrexato apresentou inibição tumoral de 76,4% (Figura 1).

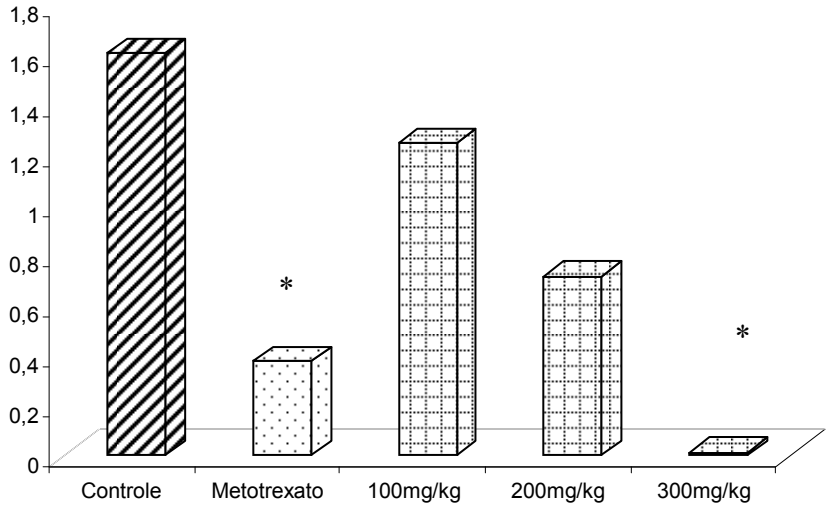


Figura 1- Efeitos dos extratos de *C. echinata* frente ao Sarcoma 180.Os valores representam a média ± desvio padrão. * P <0,05 comparado os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina a 0,9%. Teste "t" de Student (n = 5/grupo).

Em 2005, Luna e colaboradores relataram a presença de fenóis, flavononas, flavonas, flavonóides, esteróides, triterpenos, antraquinonas e antronas no extrato etanólico das folhas de *C. echinata*.

Segundo DI STASI (1996), os esteróides, assim como os triterpenos, possuem atividade antitumoral. O que poderia explicar o alto índice de inibição tumoral apresentado pelo extrato de *C. echinata*.

Na avaliação macroscópica e microscópica, os órgãos dos animais tratados com o extrato, apresentaram-se preservados e sem alterações maiores.

De acordo com os resultados obtidos,o extrato etanólico das folhas de *C. echinata* Lam. apresentou baixa toxicidade por via oral e significativa atividade antitumoral frente ao Sarcoma 180. Sugere-se, no entanto, um estudo mais detalhado com concentrações maiores do extrato, bem como a utilização de outras linhagens tumorais.

ABSTRACT

The attainment of effective products of natural origin has propitiated the advance of the scientific research against the diseases. These new molecules provide to greater farmacological diversity for the treatment of these illnesses. *Caesalpinia echinata* Lam., popularly known as brazilwood or pernambuco, is a tree with considerable historical and economic value. This objective of this work was to investigate the acute toxicity and the antitumoral effect of the ethanolic crude extract from the leaves of *Caesalpinia echinata* Lam against Sarcoma 180. The acute toxicity was measured by the Organisation for Economic Cooperation and Development guideline (OECD 423), that profess to manage continuous lowers doses starting with the maximum dose of 2000mg/kg to groups with three animals each.. For the evaluation of the antitumor activity, it was used the Stock methodology for induction of the Sarcoma 180. For all tests were used doses of 100, 200 and 300mg/kg of the ethanolic extract from *C. echinata* (test groups). Based on this results, it was conclude that the ethanolic extract of *C. echinata* shown low toxicity, by oral route. The extract shown significative reduce in the tumors weight and discrete microscopic chances, with tumor inhibition rates in the highest does of 99,4%. The ethanolic crude extract from the leaves of *Caesalpinia echinata* Lam in the cited doses presented significant reduction of the tumors Sarcoma 180.

Uniterms: *Caesalpinia echinata*, "pau-brasil", acute toxicity, antitumor activity.

REFERÊNCIAS

BASTOS, G. M.. **Uso de preparações caseiras de plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças infecciosas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

BLOOM, F. E. Drogas que atuam no Sistema Nervoso Central. In: Goodman & Gilman In Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 8º ed. Rio de janeiro. p. 167. 1990.

CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opinion on Investigational Drugs** 9, 1–15. 2000.

CUNHA, M. W. & LIMA, H. C. **Viagem a terra do pau-brasil**. Rio de Janeiro: Agência Brasileira de Cultura. 1992.

DAGLI, M.L.Z. **Disseminação Linfática do Tumor de Ehrlich: Estudo Experimental.** (Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia) USP. São Paulo. 1989.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. Universidade Estadual Paulista, 1996.

HU J.; YAN X.; WANG W.; WU H.; HUA L.; DU L.; Antioxidant Activity *In Vitro* of Three Constituents from *Caesalpinia sappan* L. **Tsinghua science and technology.** V. 13. 2008.

KOMIYAMA, K. & FUNAYAMA, S. Antitumor agents. In: OMURA, S. (edt). **The search for bioactive compounds from microrganisms**, New York: Spriger-Verlag, p. 79-97, 1992.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Plantarum**, Nova Odessa. 1992.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development, *Guideline 423:* **Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**. 2006.

SILVA, E. C. B.. **Avaliação Biológica de *Caesalpinia echinata* Lam. Usos e riscos**. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2006.

SINGLETARY, K. Diet, natural products and cancer chemoprevention. The J of Nutrition**.** p.465-6, 2000.

STOCK, C.C.; CLARCK, D.A.; PHILIPS, F.S. Sarcoma 180 – inhibitor screening date. **Cancer Research**, n. 2, p. 2-3, 1955.

Atividade Antinociceptiva e Antiinflamatória do Extrato Etanólico de *Caesalpinia echinata* Lam

Ana Ruth Sampaio Grangeiro[1*], Isla Vanessa Gomes Alves Bastos[1], Eliane Leite de Souza[1], Guilherme Carvalho Ribeiro Rodrigues[1], Aldo César Passilongo da Silva[1], Ivone Antonia de Souza[1]

1- Departamento de Antibióticos, Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental, Universidade Federal de Pernambuco -UFPE.

RESUMO

Caesalpinia echinata Lam, popularmente conhecida como pau-brasil ou pernambuco, é uma árvore considerada de valor histórico e econômico. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato bruto etanólico das folhas de *Caesalpinia echinata* Lam. Para isto, foram utilizados dois modelos de nocicepção: contorções abdominais induzidas por ácido acético e teste da formalina e para a atividade antiinflamatória, foi usado o modelo do edema de pata induzido por carragenina. O extrato reduziu, de forma dose-dependente, o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. No teste da formalina, o referido extrato reduziu em ambas as fases o tempo de lambida, sugerindo efeito antinociceptivo.Com relação à atividade antiinflamatória, entretanto, o extrato bruto etanólico não apresentou resultados significativos no modelo utilizado. Outras metodologias devem ser realizadas, afim de elucidar o exato mecanismo da ação antinociceptiva.

Unitermos: *Caesalpinia echinata*, pau-brasil, atividade antinociceptiva, atividade antiinflamatória

INTRODUÇÃO

Muitas plantas medicinais têm sido investigadas com o objetivo de descobrir novas drogas ou como modelos para o desenvolvimento de novos agente terapêuticos. Dentre essas, muitas são conhecidas popularmente por suas propriedades antiinflamatórias e analgésicas (Bohlin, 1995).

* Ana Ruth Sampaio Grangeiro
Email: ruth.sampaio@gmail.com
Departamento de Antibióticos - UFPE
Av. Prof. Moraes do Rêgo S/Nº
Recife – PE
50690-900
Telefone: (81)87253261

Caesalpinia echinata Lam., popularmente conhecida como pau-brasil ou pernambuco, é uma árvore considerada de valor histórico e econômico (Lewis, 1998).

É pertecente à família leguminosae, sub-família Caesalpinoidae. A cor vermelha do seu caule, que parece madeira queimando (brasa), é a origem do nome Brasil (Cruz-Silva *et al*, 2004).

Desde o período colonial, a madeira tem sido intensivamente explorada, primeiro para fornecer uma tintura utilizada em indústrias têxteis, e depois para fabricar arcos para violinos, violas e celos. Ela foi o primeiro produto natural a ser comercializado em longa escala e como conseqüência o nome do país tornou-se sinônimo desta árvore (Rymer, 2004).

Em estudos recentes, Silva (2006) revelou que o extrato do cerne de *Caesalpinia echinata* Lam. Possui significativa atividade antitumoral ao Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antinociceptiva e antiinflamatória do extrato bruto etanólico das folhas de *Caesalpinia echinata* Lam.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

As folhas do pau-brasil foram coletadas no campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) no mês de janeiro de 2008. A exsicata da espécie vegetal foi identificada pela botânica Drª. Marlene Barbosa, e depositada no herbário Geraldo Mariz da UFPE, sob número 41.764.

Obtenção do extrato

O material botânico utilizado foi constituído pelas folhas de *Caesalpinia echinata* Lam. sob a forma de extrato etanólico (EE) obtido após maceração, concentrado à secura em rotaevaporador sob pressão reduzida para eliminação do solvente orgânico.

Animais

Para a atividade antinociceptiva, foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas, com pesos entre 25-35g e, para atividade antiinflamatória, ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), fêmeas, pesando entre 190-240g. Os animais receberam água e ração *ad libitum,* ficando sob ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de 23 ± 2ºC. O manuseio dos animais durante o experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE (protocolo número 041.544/2006-47).

Atividade Antinociceptiva

Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste das contorções abdominais foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Koster *et al*., 1959. Os animais receberam uma solução aquosa de 0.75% de ácido acético em um volume de 0.1 mL/10g de peso por via intraperitoneal. O número de contorções foi observado por 20 minutos, 5 minutos após a injeção de ácido acético. O grupo tratado recebeu o extrato etanólico de *Caesalpinia echinata* nas doses de 100, 200 e 300mg/kg, o grupo padrão recebeu, por via oral, ácido acetilsalicílico e o controle, solução salina.

Teste da formalina

Para este protocolo experimental foi injetado 20µL de formalina 2,5% (em salina estéril) no espaço subplantar da pata direita de camundongos. Logo após a injeção de formalina os animais ficaram sob observação e a duração da lambida foi determinada no período de 0 a 5 minutos (1ª fase) e 15 a 30 minutos (2ª fase) após aplicação da formalina (Hunkaar & Hole, 1987). Os extratos de *C. echinata* foram administrados (v.o.), nas doses de 100, 200 e 300mg/kg, 1 hora antes da injeção da formalina. Os animais controle receberam igual volume do líquido utilizado para diluir o extrato (v.o) e o grupo padrão recebeu morfina (i.p).

Atividade antiinflamatória

A avaliação da atividade antiinflamatória foi realizada segundo o método de Winter *et al.,* (1962). Este método preconiza que o edema seja induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina a 1% na região subplantar da pata esquerda posterior dos animais pertencentes aos grupos controle, padrão e tratados. Uma hora antes da injeção de carragenina os animais do grupo tratado receberam 100, 200 e 300mg/kg do extrato etanólico de *C. echinata*, o grupo padrão recebeu indometacina e o grupo controle, solução salina a 0,9%, todos por via oral. Em seguida, a cada hora foram quantificados os volumes das patas com edema, perfazendo um total de 6 horas de observação. Os resultados foram expressos como a diferença entre o volume final da pata a cada tempo (Vf) e o volume inicial (Vi), representados pela fórmula Vf-Vi.

Análise estatística

Os valores foram expressos como média ± erro padrão (e.p.m.). As diferenças entre grupos foram analisadas através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste "*t*" de Student. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre < 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito antinociceptivo de *C. echinata* foi testado em dois modelos de nocicepção: contorções abdominais induzidas por ácido acético e nocicepção induzida por formalina. Estes métodos foram selecionados para investigação de efeitos centrais e periféricos.

Os resultados obtidos no ensaio de contorções abdominais (Tabela 1) demonstram que, na menor dose administrada (100mg/kg), não houve redução significativa do número de contorções abdominais. As doses de 200 e 300mg/kg, entretanto, causaram inibição de 62,7 e 65,8%, respectivamente, sendo o efeito da maior dose similar ao causado pela indometacina que também reduziu em 65,8% as contorções abdominais.

Tabela 1: Efeitos dos extratos de *C. echinata* no ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

Tratamento	Doses	Média do Nº de contorções	Percentagem de inibição (%)
Controle	10mL.kg^{-1}	34,3±9,8	-
	100 mg.kg^{-1}	30,5±14,1	11,07%
Extrato	200 mg.kg^{-1}	12,8±7,6 *	62,7%
	300 mg.kg^{-1}	11,7±8,1*	65,8%
Indometacina	10 mg.kg^{-1}	11,2±8,3*	65,8%

Valores representam média ± erro padrão do número de contorções abdominais.
As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA e teste "*t*" de Student. *p < 0,05 quando comparado ao grupo controle

Através desse modelo que pode ser usado comumente como um método de screening para identificar drogas com potencial atividade antinociceptiva, vários grupos de drogas com diferentes mecanismos de ações podem inibir as contorções abdominais. (Koster *et al*., 1959; Hendershot & Forsaith, 1959).

Os mecanismos envolvidos na indução da dor estão relacionados a substâncias bioativas liberadas pelo sistema nervoso simpático, a metabólitos da via do ácido araquidônico (Duarte *et al*., 1992) e ao sistema opióide (Collier *et al*., 1968). Ao reduzir as contorções abdominais, o extrato avaliado, possivelmente, está exercendo ação periférica e central pela inibição dos mediadores endógenos (Collier *et al*., 1968).

No teste da formalina, os resultados obtidos (Tabela 2) mostraram que na primeira fase (0-5 min), o extrato etanólico de *C. echinata* causou efeito dose-dependente. Nas doses de 100, 200 e 300 mg. kg^{-1} o referido extrato apresentou índices de inibição de 39,6%, 39,9% e 46,1%, respectivamente. Na segunda fase (15-30min), as mesmas doses do extrato causaram inibição de 47,7%, 46,3% e 63,3%. A morfina, droga padrão utilizada, apresentou redução

estatisticamente significativa na primeira e segunda fases, com índice de inibição de 72,3% e 100%, respectivamente.

Tabela 2: Efeitos dos extratos de *C. echinata* no teste da formalina

Tratamento	Dose	Tempo de lambida (s)			
		(0-5 min)	Inibição (%)	(15-30min)	Inibição (%)
Controle	10mL.kg^{-1}	56,8±15,4	-	103,7±36,3	-
Extrato	100 mg. kg^{-1}	34,3±15,1*	39,6%	54,2±31,5*	47,7%
	200 mg. kg^{-1}	34,1±5,3*	39,9%	55,7±25,9*	46,3%
	300 mg. kg^{-1}	30,6±21,2*	46,1%	36±31,3*	65,3%
Morfina	10 mg. kg^{-1}	15,7±7,8*	72,3%	0	100%

Valores representam média ± erro padrão do tempo de lambida (s).
As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA e teste "*t*" de Student. *p < 0,05 quando comparado ao grupo controle

O teste da formalina permite avaliar a dor neurogênica e a antiinflamatória. A primeira fase (0-5min) corresponde à dor neurogênica aguda, sensível às drogas que interagem com o sistema opióide. A segunda fase (15-30min) corresponde à dor inflamatória e é inibida por inibidores da ciclooxigenase. Drogas que agem primariamente como analgésicos centrais inibem ambas as fases enquanto que drogas que agem perifericamente inibem somente a fase 2 (Rosland *et al*, 1990).

O extrato das folhas de *C. echinata,* pelos efeitos inibitórios das contorções abdominais e dos tempos de lambida da pata, demonstrou possuir atividade antinociceptiva sobre o sistema nervoso central e periférico (Tabela 1 e Tabela 2). A segunda fase do teste da lambida da pata é também indicativa de uma possível atividade antiinflamatória.

Para avaliar essa possível atividade antiinflamatória, foi utilizado o modelo de edema de pata induzida por carragenina. Os resultados obtidos (Tabela 3) demonstraram que o extrato de *C. echinata* nas doses de 100, 200 e 300 mg.kg^{-1} não reduziu significativamente os

edemas das patas dos animais durante as 6 horas do ensaio, rejeitando, portanto, a hipótese de ser antiinflamatório. A indometacina, como esperado, reduziu significativamente os edemas a partir da terceira hora.

Tabela 3: Efeito dos extratos de *C. echinata* sob o edema de pata induzido por carragenina (1%).

Tratamento	Dose	Volume (mL) da Pata			
		3h	4h	5h	6h
Controle	10 mL. kg^{-1}	1,4±0,23	1,2±0,20	1,1±0,19	0,8±0,21
	100 mg. kg^{-1}	1,2±0,14	1,3±0,25	0,9±0,17	0,7±0,30
Extrato	200 mg. kg^{-1}	1,4±0,08	1,4±0,17	0,9±0,18	0,8±0,18
	300 mg. kg^{-1}	1,3±0,10	1,4±0,24	0,7±0,25	0,5±0,17
Indometacina	20 mg. kg^{-1}	0,6±0,10*	0,6±0,14*	0,7±0,10*	0,7±0,07*

Valores representam média ± erro padrão do volume dos edemas das patas.
As diferenças estatísticas foram determinadas por ANOVA e teste "*t"* de Student. *p < 0,05 quando comparado ao grupo controle

Em um estado inflamatório, diversos mediadores como citocinas, bradicinina, prostaglandinas e ATP são responsáveis pela dor e hiperalgesia. Esses mediadores, liberados durante um processo de injúria celular, determinam os sinais e sintomas de um processo inflamatório. Embora muitos mediadores inflamatórios sejam comuns às condições de algesia e inflamação, outros são específicos aos referidos processos. (Tremont-Lukats *et al*, 2000; Rittner & Stein, 2005).

Assim, podemos sugerir duas hipóteses: a primeira é que a ação desses extratos seja sobre mediadores nociceptivos mas não sobre os inflamatórios. A segunda é que os extratos estudados possam exercer mais atividade no sistema nervoso central, resultando em efeito antinociceptivo, e menos nas células antiinflamatórias. Entretanto, estudos sobre mediadores específicos da nocicepção e atividade motora devem ser realizados.

Com base nos resultados, pode-se concluir que o extrato etanólico de *Caesalpinia echinata* Lam, nas doses testadas, apresenta significativa atividade antinociceptiva. Outros ensaios devem ser realizados afim de elucidar o exato mecanismo dessa ação. Com relação à atividade antiinflamatória, entretanto, o referido extrato não demonstrou possuir atividade.

ABSTRACT

Caesalpinia echinata Lam., popularly known as "pau-brasil" or "pernambuco", is a tree with considerable historical and economic value. The aim of this study was to investigate the antinociceptive and antiinflammatory activities of a crude ethanolic extract of the leaves of *Caesalpinia echinata* Lam. For this, we used two models of nociception: Acetic acid-induced writhings and the test of formalin and, to the antiinflammatory activity, were used the carrageenan-induced hind paw edema model. The extract reduced, in a dose-dependent manner, the number of acid-induced abdominal writhings induced by acetic acid. In the formalin test, the extract reduced in both phases the licking time, suggesting antinociceptive effect. Regarding the anti-inflammatory activity, however, the crude ethanolic extract showed no significant results in this model. Other methods must be performed in order to elucidate the exact mechanism of action.

Uniterms: *Caesalpinia echinata*, pau-brasil, antinociceptive activity, antiinflammatory activity.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento dessa pesquisa.

REFERÊNCIAS

BOHLIN, L.. Structure-activity studies of natural products with antiinflammatory effects. In: K. Hosterttmann (Ed.), Phytochemestry of Plants Used in Traditional, **Clarendon Press**, Oxford, pp. 137-161. 1995.

COLLIER, H.O., DINNEEN, L. C., JOHNSON, C. A, SCHNEIDER, C.. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Brit J Pharmacol Chemother** *32*: 295-310. 1968.

CRUZ-SILVA, I. GOZZO, A. J, NUNES, V. A., CARMONA, A. K., FALJONI-ALARIO, A., OLIVA, M. L.V, SAMPAIO, M.U., SAMPAIO, A.M, ARAUJO, M.S. A proteinase inhibitor from Caesalpinia echinata (pau-brasil) seeds for plasma kallikrein, plasmin and factor XIIa. **Biol. Chem.** 385, pp.1083-1086, 2004.

DUARTE, I.D.G., FERREIRA-ALVES D.L, NAKAMURA-CRAIG, M. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia by vouacapan**. Life Sci** *50*: 891-897. 1992.

HENDERSHOT, L.C., FORSAITH, J. Antagonism of the frequency of phenyquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesic and nonanalgesics**. J Pharmacol Exp Ther** 125: 237-240. 1959.

HUNSKAAR S, HOLE K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain** *30*: 103-114. 1987.

KOSTER, R.; ANDERSONS M.; DEBEER, E.J. – Acetic acid analgesic screening. **Federation Proceedings**, 18: 418-420, 1959.

LEWIS, G.P. Caesalpinia: A Revision of the *Poincianella* – Erythrostemon Group. **Royal Botanic Gardens**, Kew. 1998.

RITTNER, H. L.; STEIN, C.; **Eur. J. Pain**, *9*, 109; 2005.

ROSLAND, J.H., TJOLSEN, A., MAEHLE, B., HOLE, D.K.,. The formalin test in mice. Effect of the formalin concentration. **Pain** 42, 235–242. 1990.

RYMER, R. Saving the music tree. **Smithsonian** 35, 52–63. 2004.

SILVA, E. C. B.. **Avaliação Biológica de *Caesalpinia echinata* Lam. Usos e riscos**. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2006.

TREMONT-LUKATS, I. W.; MEGEFF, C.; BACKONJA, M. M.; **Drugs**, *60*, 1029; 2000.

WINTER, C.A., RISLEY, E.A., NUSS, G.W. Carrageenan-induced o edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544 - 547, 1962.

6 CONCLUSÕES

O extrato etanólico de *Caesalpinia echinata* Lam apresentou baixa toxicidade por via oral e significativa atividade antitumoral frente ao Sarcoma 180. Sugere-se, no entanto, um estudo mais detalhado com a utilização de outras linhagens tumorais.

Com base nos resultados, pode-se concluir também que o extrato, nas doses testadas, apresenta significativa atividade antinociceptiva. Com relação à atividade antiinflamatória, entretanto, o referido extrato não demonstrou possuir atividade.

Outros ensaios devem ser realizados afim de elucidar o exato mecanismo desses efeitos.

7 REFERÊNCIAS

AGUIAR, F. A.; PINHO, R.A **Pau-brasil *Caesalpinia echinata*** Lam. Árvore nacional. São Paulo, 2007

AGUIAR, F.F.A. & BARBOSA, J.M. Estudos de conservação de longevidade de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). **Ecossistema** 10: 145-150. 1985.

AGUIAR, F.F.A. & PINHO, R.A.. **Pau-brasil - *Caesalpinia echinata* Lam.** 2 ed.

AGUIAR, F.F.A. **Fenologia do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.),** em Moji-Guaçu, SP. Ecossistema 26: 107-112. 2001.

AJITH,T.A.; JANARDHANAN, K.K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, Hellinusrimosus (Berk) Pilat. **J. Ethnopharmacol.**, v.84, p.157-162, 2003.
ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. Ed 4, 2004.

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research,** v.1000, n.1-2, p.40-56, Mar. 2004.

ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina – Bases Clínicas e Farmacológicas**. Buenos Aires: ISIS. Cidade: Buenos Aires – AR. Ediciones SRL. p.38-92. 1999.

BASTOS, G. M.. **Uso de preparações caseiras de plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças infecciosas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

BAUHMANN, H., GAUDIE, J. The acute phase response. **Immunol. Today**, V.15, p. 74-80, 1994.

BESSON, J.M. The neurobiology of pain**. The Lancet**, v.353, n.9164, p.1610–15, May 1999.

BEVILACQUA, M.P.; NELSON, R.M.; MANNORI, G. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. **An. Rev. of Medicine**, v. 45, p. 361-378, 1994.

BLOOM, F. E. Drogas que atuam no Sistema Nervoso Central. In: Goodman & Gilman In Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 8º ed. Rio de janeiro. p. 167. 1990.

BOHLIN, L.. Structure-activity studies of natural products with antiinflammatory effects. In: K. Hosterttmann (Ed.), Phytochemestry of Plants Used in Traditional, **Clarendon Press**, Oxford, pp. 137-161. 1995.

BRASIL. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, jun. 2006a.

BUENO, E. **Pau-brasil**. São Paulo: Axis Mundi, 279p. 2002.

BURGESS, P.R.; PERL, E.R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **Journal of Physiology**, v.190, n.3, p.541-562, Jun. 1967.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phitotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res**., v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R. Antiinflammatory Compouds of Plants Origin. Part I. Action on Arachdonic Acid Pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor α B (NF- α B). **Planta Medica**, v. 69, p.1.12, 2003.

CAMPBELL, W. B. & HALUSHKA, P. V. Autacóides derivados de lipídios In: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Gilman, A. G. Mc Graw-Hill Interamericana Editores. Rio de Janeiro, Brasil. p. 438.1996.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso da Madeira. Colombo**: Embrapa/CNPF, 1994.

CHAPMAN, C.R., GRAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **Lancet,** 353: 2233-2237, 1999.

CIRINO, G.; FIORUCCI, S.; SESSA, W.C.; Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? **Trends in Pharmacological Sciences**, V. 24, p. 91-94, 2003.

COLLIER, H.O., DINNEEN, L. C., JOHNSON, C. A, SCHNEIDER, C.. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Brit J Pharmacol Chemother** *32*: 295-310. 1968.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. Robbins. **Patologia Estrutural e Funcional**. Ed. Guanabara Koogan S.A. 6ª Edição, p. 921e 922. 2000

CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opinion on Investigational Drugs** 9, 1–15. 2000.

CRUZ-SILVA, I. GOZZO, A. J, NUNES, V. A., CARMONA, A. K., FALJONI-ALARIO, A., OLIVA, M. L.V, SAMPAIO, M.U., SAMPAIO, A.M, ARAUJO, M.S. A proteinase inhibitor from Caesalpinia echinata (pau-brasil) seeds for plasma kallikrein, plasmin and factor XIIa. **Biol. Chem.** 385, pp.1083-1086, 2004.

CUNHA, M. W. & LIMA, H. C. **Viagem a terra do pau-brasil**. Rio de Janeiro: Agência Brasileira de Cultura. 1992.

DAGLI, M.L.Z. **Disseminação Linfática do Tumor de Ehrlich: Estudo Experimental.** (Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia) USP. São Paulo. 1989.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Ed. Universidade Estadual Paulista, 1996.

DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. São Paulo: ed. UNESP, 1995.

DONNICI, C. L., ALMEIDA, V. L., LEITÃO, A., REINA, L. C.B., MONTANARI, C. A., PAZ, M. T. L. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Quim. Nova**, 28: 118-119, 2005.

DOYLE, J.J. DNA data and legume phylogeny: a progress report . **Advances in legume systematic.** Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew Philogeny 1995.

DUARTE, I.D.G., FERREIRA-ALVES D.L, NAKAMURA-CRAIG, M. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia by vouacapan**. Life Sci** *50*: 891-897. 1992.

DUESBERG,P.; RASNICK,D. Aneuploidy, the Somatic Mutation That Makes Cancer a Species of Its Own. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v.47, p.81-107, 2000.

ENGERS, R.; GABBERT, H. E. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. **J.Cancer Res.Clin.Oncol.**, v.126, p.682-692, 2000.

FARIA, J. L.; ALTEMANI, A. M. **Patologia geral: fundamentos das doenças, com aplicações clinicas**. 3.ed. - Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1988.

FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a fat chance? **The The Journal of Experimental Medicine**, v. 201 (5), p. 671 – 674, 2005.

FUKUSHIMA, R. S.; FUZETO, A. Quantificação do teor de lignina na madeira do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) através de três procedimentos analíticos. In: **Simpósio Pau-brasil: ciência e arte**, 2003, São Paulo, SP. Anais (CD-ROM), 2003.

FÜRST, S. Transmitters involvednin antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin***,* v.48, n.2, p.129-141, Jan. 1999.

GOMES , E.C.; ELPO, E.RS.; GABRIE, L, M.M.; LOPES, M. Plantas Medicinais com características tóxicas usadas pela população de Morretes, PR. **Revista Visão Acadêmica,** Curitiba, v. 2, n.2, p.77-80, 2001.

GRIFFIS, C.A.; COMPTON, P.; DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. **Biological Research Nursing**, v.7, n.4, p.297-312, Apr. 2006.

GRUBB, B.D. Peripheral and central mechanism of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v.81, n.1, p.8- 11, Jul. 1998.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Ther**. 96: 67-202, 2002.

HENDERSHOT, L.C., FORSAITH, J. Antagonism of the frequency of phenyquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesic and nonanalgesics**. J Pharmacol Exp Ther** 125: 237-240. 1959.

HU J.; YAN X.; WANG W.; WU H.; HUA L.; DU L.; Antioxidant Activity *In Vitro* of Three Constituents from *Caesalpinia sappan* L. **Tsinghua science and technology.** V. 13. 2008

HUNSKAAR S, HOLE K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain** *30*: 103-114. 1987.

JUDD, W.S.; CAMPBELL C. S.; KELLONG E.A.; **Plant systematic phylogenetic approach**.. Sinauer Associates, 1999.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, n.6852, p.203-210, Sep. 2001.

KOMIYAMA, K. & FUNAYAMA, S. Antitumor agents. In: OMURA, S. (edt). **The search for bioactive compounds from microrganisms**, New York: Spriger-Verlag, p. 79-97, 1992.

KOSTER, R.; ANDERSONS M.; DEBEER, E.J. – Acetic acid analgesic screening. **Federation Proceedings**, 18: 418-420, 1959.

KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. **Gann**, v. 73, p. 85-90, 1982.

LEWIS, G.P. Caesalpinia: A Revision of the *Poincianella* – Erythrostemon Group. **Royal Botanic Gardens**, Kew. 1998.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Plantarum**, Nova Odessa. 1992.

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

MARQUES, L. C. Hypericum e Kava-Kava: aspéctos farmacológicos e terapêuticos. **Racine**, v.51. p 56-72. 1999.

MELO, C.L. **Estudo Farmacológico da Ternatina, um flavonóide isolado de *Egletes viscosa*, LESS** – Ceará. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1991.

MERSKY, H; BOGDUK, N. **Classification of chronic pain: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms.** Seattle: IASP Press, 1994.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology,** v.57, n.1, p.1-164, Jan. 1999.

MOFFATT,J.; HASHIMOTO,M.; KOJIMA,A.; KENNEDY,D.O.; MURAKAMI,A.; I. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascites tumor cells is associated with polyamine metabolism and caspase-3 activation. **Carcinogenesis**, v.21, n.12, p.2151-2157, 2000.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quim. Nova**, 24: 105-111. 2001.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia Processos Gerais**. 4 ed. Ed. Atheneu. São Paulo, 2004.

NAKAGAWA,W.T.; LOPES, A. Conceitos Básicos em Oncologia. In: AYOUB,A.; FRIAS,M.; BARROS,M; KOBAYASHI,R. **Bases da Enfermagem em Quimioterapia**, São Paulo: LEMAR,2000, p.1-19.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature – insight review articles**, v. 420 (19/26), p. 846 – 852, 2002.

NERY, J. **E este país ainda exporta pau-brasil**. O Estado de São Paulo, 1979.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development, Guideline 423: **Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**. 2006.

OLIVEIRA, L.G.; et al. Inibidores de proteases encontrados em sementes de Caesalpinia echinata (pau-brasil) – isolamento e caracterização do inibidor de tripsina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, supl., p. 72 - 74, 2002.

PEREIRA, F.E.L. **Inflamações**. In G.B. Filho (Ed.) Patologia Geral. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

PETER, S. R.; TINTO, W. F.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. F.; TAY, L. L.; YU M.; CHAN, W. R.; **Magn. Reson. Chem**. 36, 124. 1998.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochermistry.**, n.56, p. 237- 243, 2001.

PINTO, A.C; SIQUEIRA, S. D. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. **Quim. Nova**., v. 25, n.1, p. 45-61, 2002.

PY, L. A. & JACQUES, H. **A linguagem da saúde**. Ed. Campus, São Paulo, 2003.

R.A. DEFILIPPS, **Arch. Natural History**. 25. 103. 1998

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M. **Farmacologia**. 5 ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2005.

REZENDE, C.M.; CORREA, V.F.S.; COSTA, A.V.M.; CASTRO, B.C.S. Constituintes Químicos Voláteis das Flores e Folhas do Pau-brasil (Caesalpinia echinata Lam.). **Química Nova***,* Vol. 27, No. 3, 414-416, 2004

RITTNER, H. L.; STEIN, C.; Eur. J. **Pain**, 9, 109; 2005.

RIZZINI, C.T. & MONS, W.B. **Botânica Econômica Brasileira**. EPU, São Paulo, 207 p. 1976.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Willians & Wilkins, p.1-14. 1996.

ROCHA, Y.T. Ibirapitanga: História, distribuição geográfica e conservação do paubrasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade.
São Paulo, Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, 396p. 2004.

ROSLAND, J.H., TJOLSEN, A., MAEHLE, B., HOLE, D.K.,. The formalin test in mice. Effect of the formalin concentration. **Pain** 42, 235–242. 1990.

RUSTIGI, A.K.; PODOLSKY, D.K. The molecular basis of colon cancer. **Ann. Rev. Med**., v.43, p.61-68, 1996.

RYMER, R. Saving the music tree. **Smithsonian** 35, 52–63. 2004.

SHELLEY, A.; CROSS, M.D. Pathophysiology of pain. **Mayo Clin. Proc**., v. 69, p.375-383, 1994.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.** v. 16, p. 1053-71, 1996.

SILVA, E.C.B. **Avaliação Biológica da Caesalpinia echinata Lam. Fabaceae-Caesalpinoideae. Usos e riscos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2006.

SILVA, M.C, CARVALHO, J.C.T. Inflamação. In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP. Ed Tecmed, 2004.

SILVA, M.I.G. **Utilização de Fitoterápicos nas Unidades Básicas de Atenção à Saúde da Família, no Município de Maracanaú – Ceará**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

SILVA, R. C; **Plantas medicinais na saúde bucal**, Vitória, 2001.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.O.; GOSMANN, G.;MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento.** Universidade Federal de Santa Catarina e Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Editora da Universidade e Editora da UFSC, 1999.

SINGLETARY, K. Diet, natural products and cancer chemoprevention. **The J of Nutrition**. p.465-6, 2000.

SIQUEIRA, J.R, DANTAS, C.J.S. **Medicamentos celulares e moleculares da**

inflamação. MEDSI, 225p, 2000.

SODRE, N.W. **A gênese da economia predatória do Brasil**. Editora Pau- Brasil, 1985

STEWARTT, H. L.; SNELL, K. C.; DUNHAN, L. S.; SCHYLEN, S. M. Transplantable and transmissible tumors of animals. **Armed Forces Institute of Pathology**, Washington, 1959.

STOCK, C.C.; CLARCK, D.A.; PHILIPS, F.S. Sarcoma 180 – inhibitor screening date. **Cancer Research**, n. 2, p. 2-3, 1955.

TEIXEIRA, M.J.; CORREA, C.F.; PIMENTA, C.A.M. **Dor: conceitos gerais**. São Paulo: Limay, 1994.

TJØLSEN A., BERGE, O.G., HUNSKAAR, S., ROSLAND, J.H., HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method**. Pain**, 51: 5-17, 1992.

TREMONT-LUKATS, I. W.; MEGEFF, C.; BACKONJA, M. M.; **Drugs**, 60, 1029; 2000.

TUROLLA, M. S. R. & NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. vol. 42, n. 2. 2006

WEDMORE, C.V.; WILLIAMS, T. J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in flammation. **Nature**. V. 289, p. 646-650, 1981.

WINTER, C.A., RISLEY, E.A., NUSS, G.W. Carrageenan-induced o edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544 - 547, 1962.

ZAIA, H.A.B.A. **Desenvolvimento floral de Caesalpinia echinata Lam., Caesalpinia peltophroides Benth e Caesalpinia ferrea Var. leyotachia Benth (Fabaceae/Caeasalpinioideae).** Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais, com opção em silvicultura), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, São Paulo, 2004.

ZUCKERBERG, C. Ultraestrutura of Sarcoma 180. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 33, p 2278-2282, 1973.