



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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE
Caesalpinia echinata Lam. (FLORES)**

ISLA VANESSA GOMES ALVES BASTOS

Recife

2011



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

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE
Caesalpinia echinata Lam. (FLORES)

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

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Linha de pesquisa: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos.

Orientador: Ivone Antonia de Souza

Co-orientador: Haroudo Satiro Xavier

ISLA VANESSA GOMES ALVES BASTOS

Recife

2011

Bastos, Isla Vanessa Gomes Alves

Avaliação da atividade farmacológica de *Caesalpinia echinata* Lam. (flores) / Isla Vanessa Gomes Alves Bastos. – Recife: O Autor, 2011.

99 folhas: il., fig. e graf.; 30 cm.

Orientador: Ivone Antonia de Souza

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2011.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. *Caesalpinia echinata* Lam. 2. Fitoquímica. 3. Toxicidade aguda. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Atividade antitumoral. I. Souza, Ivone Antonia de. II. Título.

583.323

CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2011-116



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

Recife, 18 de fevereiro de 2011.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 18 de fevereiro de 2011 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE ORIENTADOR E EXAMINADOR INTERNO: Prof^a Dr^a Ivone Antonia de Souza (Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco–UFPE)

Assinatura: Ivone Antonia de Souza

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof^a Dr^a Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho (Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco–UFPE)

Assinatura: Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Thompson Lopes de Oliveira (Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba–UFPB)

Assinatura: Thompson Lopes de Oliveira



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

**AMARO HENRIQUE PESSOA LINS
REITOR**

**GILSON EDMAR GONÇALVES E SILVA
VICE-REITOR**

**ANÍSIO BRASILEIRO DE FREITAS DOURADO
PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**JOSÉ THADEU PINHEIRO
DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**MÁRCIO ANTÔNIO DE A. COELHO GUEIROS
VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DALCI JOSÉ BRONDANI
CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ANTÔNIO RODOLFO DE FARIA
VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PEDRO JOSÉ ROLIM NETO
COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**BEATE SAEGESSER SANTOS
VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Dedico este trabalho e tudo alcançado na minha vida aos meus pais Marcos e Nelbe, assim como, a minha irmã Fernanda.

“Para se chegar ao fim das coisas, o primeiro passo é julgá-las possíveis”.

Luis XIV

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que nos dá o dom da vida e nos concede maravilhas inexplicáveis todos os dias.

Aos meus pais Marcos Bastos e Nelbe Alves, que muitas vezes sem nem mesmo entender meus objetivos, nunca mediram esforços para minha realização profissional, me incentivando para que tudo fosse alcançado com responsabilidade, honestidade e para que nunca desistisse diante das dificuldades.

À minha irmã Fernanda Bastos que sempre me incentiva, companheira que tanto admiro e torço a cada dia pela sua vitória.

A Rodrigo Veloso, pelo companheirismo, paciência e compreensão por tanta ausência.

A professora e orientadora Dr^a. Ivone Antonia de Souza, pelo incentivo há 5 anos, desde a iniciação científica, e contribuição na minha formação pessoal e profissional, sendo um exemplo de coragem, determinação, amor ao próximo que levarei sempre comigo.

Ao professor Dr. Haroudo Satiro Xavier, do Laboratório de Farmacognosia da UFPE, pela ajuda, oportunidade, paciência, dedicação e pela extrema atenção e gentileza a todos que o procuram. Um exemplo de profissional a ser seguido, que tive o imenso prazer de conhecer no curso de pós-graduação.

A professora Kêssia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena e a mestre Rosilma de Oliveira Araújo do Departamento de Antibióticos da UFPE pela realização dos ensaios antimicrobianos.

Ao professor Dr. Sebastião José de Melo do Laboratório de Síntese e Química de Produtos Naturais da UFPE pelo grande incentivo e atenção dispensada.

A Dr^a Renata Patrícia Freitas Soares de Jesus, pela amizade, pelo auxílio na realização deste trabalho, e por sempre torcer pelo meu sucesso.

A botânica Marlene Barbosa, pela identificação do material botânico.

Aos colegas de pós-graduação. Em especial, Evelyn Mirella e Érika Cristina pelos momentos de lutas e sonhos compartilhados e por tornarem o dia-dia mais agradável.

Aos doutorandos Gibson e Antonio pela troca de experiência, convívio e descontração.

Aos meus amigos de graduação Alice Bezerra, Bellany Alves, Emmanuel Viana, Hernando Siqueira e Lídia Lins pela amizade, companhia, incentivo e por me proporcionarem momentos tão felizes. Impossível descrever sobre eles sem cometer falhas!

Aos alunos de iniciação científica Grace Kelly, Guilherme Rodrigues, Cybelly de Melo, Thiago Ferraz e Claudete Clair do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental da UFPE pela amizade e colaboração ativa em vários experimentos.

A todos os amigos e familiares que me apoiaram e compreenderam o motivo da minha ausência durante esse tempo.

À coordenação e professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a Margarete Valdevino da Silva, secretária acadêmica, pela compreensão e atenção a mim dispensadas.

Ao funcionário do biotério Janilson Batista, pelo auxílio com a organização dos materiais relacionados aos animais e sempre demonstrar vontade em ajudar em todos os momentos.

Espero não ter esquecido ninguém, contudo saibam que expressei minha gratidão a todos direta e indiretamente ligados ao desenvolvimento e êxito deste trabalho. Mesmo que seu nome não conste aqui, saiba que sou muito grata também.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA		Pág.
Figura 1.	Estrutura química dos constituintes majoritários do cerne do pau-brasil. Fonte: AGUIAR & PINHO, 2007; REZENDE et al., 2004.....	24
Figura 2.	Mapa mostra o pau-brasil em estado silvestre. Fonte: AGUIAR & PINHO, 2007.....	26
Figura 3.	Primeira descrição botânica de <i>C. echinata</i> Lam. Fonte: PINTO, 1873.....	27
Figura 4.	Árvore de <i>C. echinata</i> Lam. (a); Tronco recoberto por acúleos (b) e Corte transversal do tronco, mostrando o cerne vermelho (c). Fonte: AGUIAR & PINHO, 2007; GRANDISOLI, 2010.....	28
Figura 5.	Folha do pau-brasil, demonstrando a-pina e b-folíolo. Fonte: SILVA-JÚNIOR, 2007.....	28
Figura 6.	Inflorescência do tipo cacho (a) e Destaque das flores de <i>C. echinata</i> Lam. (b). Fonte: ALEXANDER, 2009.....	29
Figura 7.	Fruto de coloração verde – imaturos (a) e Fruto de cor marrom - maduros do pau-brasil (b). Fonte: BERNARDES, 2009.....	29
Figura 8.	Frutos abertos, expondo as sementes (a) e Sementes de <i>C. echinata</i> Lam. (b). Fonte: BORGES, 2007.....	30
Figura 9.	Esquema simplificado da patogenia do câncer. Fonte: INCA, 2002.....	40

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I – Estudo fitoquímico preliminar e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto de *Caesalpinia echinata* Lam. **Pág.**

Tabela 1.	Metabólitos encontrados no extrato metanólico das flores de <i>C. echinata</i> Lam.....	50
------------------	---	----

ARTIGO II – Atividade antimicrobiana do extrato de *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae).

Tabela 1.	Relação dos microrganismos utilizados no teste de difusão em ágar.....	60
------------------	--	----

Tabela 2.	Atividade bacteriana do extrato etanólico bruto das flores de <i>C. echinata</i> Lam., através do método de difusão em poços.....	62
------------------	---	----

Tabela 3.	Atividade bacteriana do extrato etanólico bruto das flores de <i>C. echinata</i> Lam., através do teste de difusão em disco de papel.....	64
------------------	---	----

LISTA DE GRÁFICOS

ARTIGO I – Estudo fitoquímico preliminar e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto de *Caesalpinia echinata* Lam **Pág.**

- Gráfico 1.** Curva Dose-Resposta da toxicidade aguda por via intraperitoneal do extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam..... 51

ARTIGO III – Atividade antitumoral das flores de *Caesalpinia echinata* Lam. frente ao Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180.

- Gráfico 1.** Massa corporal média dos camundongos (n = 6) portadores de Carcinoma de Ehrlich antes (Dia 0) e após (Dia 8) os tratamentos por v.o. com o EEB de *C. echinata* Lam. nas doses de 250 (T₁) e 500 mg/Kg (T₂), Metotrexato (Padrão) e Solução salina 0,9 % (Controle)..... 74

- Gráfico 2.** Massa corporal média dos camundongos (n = 6) portadores de Sarcoma 180 antes (Dia 0) e após (Dia 8) os tratamentos por v.o. com o EEB de *C. echinata* Lam. nas doses de 250 (T₁) e 500 mg/Kg (T₂), Metotrexato (Padrão) e Solução salina 0,9 % (Controle)..... 75

- Gráfico 3.** Comparação das médias de crescimento tumoral em camundongos, portadores de Carcinoma de Ehrlich, tratados por v.o. com o EEB de *C. echinata* Lam. nas doses de 250 mg/Kg (T₁) e 500 mg/Kg (T₂), Metotrexato (Padrão) e Solução salina 0,9 % (Controle). Os valores representam a média ± desvio padrão. * p < 0,05 comparado os grupos tratados com o controle. Teste “t” de Student (n= 6/grupo)..... 75

Gráfico 4. Comparação das médias de crescimento tumoral em camundongos, portadores de Sarcoma 180, tratados por v.o. com o EEB de *C. echinata* Lam. nas doses de 250 mg/Kg (T₁) e 500 mg/Kg (T₂), Metotrexato (Padrão) e Solução salina 0,9 % (Controle). Os valores representam a média ± desvio padrão. * p < 0,05 comparado os grupos tratados com o controle. Teste “t” de Student (n= 6/grupo)..... 76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APG II – Grupo de Filogenia das Angiospermas

ANOVA - Análise de Variância

°C – Graus Celsius

CCDA – Cromatografia de Camada Delgada Analítica

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CGAR-EM – Cromatografia Gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas

CL₅₀ – Concentração letal 50%

D₁ – Dose mais elevada isenta de mortalidade

D₂ – Menor dose com 100% de óbito

DL₅₀ – Dose Letal que mata 50% da população

DMSO – Dimetilsulfóxido

EEB – Extrato Etanólico Bruto

e.p.m – Erro padrão da média

g – Grama

kg- Quilograma

mg- Miligrama

mL- Mililitro

mm – Milímetro

pH – Potencial Hidrogeniônico

p/v – Peso por volume

OMS – Organização Mundial da Saúde

S-180 - Sarcoma 180

SNC – Sistema Nervoso Central

TE – Tumor de Erhlich

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

µL – Microlitro

v.i.p. – Via intraperitoneal

v.o. – Via oral

RESUMO

Caesalpinia echinata Lam. é uma espécie pertencente a família Fabaceae – Caesalpinioideae, nativa do Brasil, de ocorrência natural. Atualmente essa espécie encontra-se reduzida a alguns remanescentes da Mata Atlântica. A medicina popular atribui a este vegetal algumas propriedades farmacológicas, sendo o extrato de seu lenho utilizado como: adstringente, cicatrizante, odontoálgico e tônico. Apesar desse uso medicinal, constatamos carência de informações sobre as propriedades toxicológicas e farmacológicas com relação às flores deste vegetal. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição fitoquímica, investigar a toxicidade aguda e as atividades antimicrobianas e antitumorais frente ao Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180 do extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam. O perfil fitoquímico foi obtido por cromatografia em camada delgada analítica utilizando infusos metanólicos das flores, para caracterização dos diversos grupos de metabólitos secundários. Os resultados indicaram a presença de: polifénóis (flavonóides e proantocianidinas condensadas), terpenóides (triterpenos e esteróides) e açúcares redutores. Os testes de toxicidade aguda foram realizados por via oral e intraperitoneal em camundongos machos com observações das respectivas alterações comportamentais para cada dose administrada. As doses utilizadas foram 1.000 a 2.160 mg/Kg para via intraperitoneal, e 2.000 a 5.000 mg/Kg para via oral. Tanto a administração por via oral quanto a intraperitoneal apresentou efeitos estimulantes seguido de efeitos depressores após administração do extrato. O valor da DL₅₀ por via intraperitoneal foi de 1.825 mg/Kg, que permite sua classificação em moderadamente tóxico. A administração por via oral apresentou baixa toxicidade, visto não ter provocado óbito em nenhuma das doses testadas. A atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positiva, Gram negativas e o fungo *Candida albicans* foi realizada através da técnica de difusão em ágar. Na análise microbiológica o extrato apresentou melhores halos de inibição na técnica do poço em relação ao teste do disco de papel frente às espécies *Staphylococcus aureus* (19 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (18 mm), *Staphylococcus coagulase negativo* (18 mm), *Escherichia coli* (16 mm) e *Enterococcus faecalis* (17 mm). Na atividade antitumoral, a metodologia de Stock et al. (1955) foi utilizada para induzir o Carcinoma de Ehrlich e o Sarcoma 180. Para os testes foram utilizadas doses de 250 e 500 mg/kg do extrato; o grupo controle recebeu solução salina (0,9 %), e o padrão metotrexato (10 mg/Kg), todos por via oral. O extrato demonstrou redução significativa nos pesos dos tumores, com índice de inibição tumoral na maior dose de 78,5 % para o Carcinoma de Ehrlich. Entretanto, para o Sarcoma 180 o extrato nas referidas doses não apresentou inibição tumoral. De acordo com os resultados obtidos conclui-se que o extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam. possui toxicidade moderada por via intraperitoneal e baixa toxicidade por via oral. Foi capaz de inibir o crescimento de algumas bactérias Gram positivas e Gram negativas e ainda apresentou inibição tumoral contra o Carcinoma de Ehrlich.

Palavras-chave: Fitoquímica. Toxicidade aguda. Atividade antimicrobiana. Atividade antitumoral. *Caesalpinia echinata* Lam.

ABSTRACT

Caesalpinia echinata Lam. is a species belonging to family Fabaceae - Caesalpinioideae, native to Brazil, naturally occurring. Currently this species is reduced to a few remnants of the Atlantic. The popular medicine attribute to this vegetable some pharmacological properties, being the extract of its used s: adstringent, healing, analgesic and tonic. Despite this medical use, we found little information on the toxicological and pharmacological properties with respect to the flowers of this plant. Thus, the purpose of this study was to evaluate the phytochemical composition, to investigate the acute toxicity and antimicrobial and antitumor activity against the Carcinoma of Ehrlich and Sarcoma 180 of the ethanol crude extract of flowers of *C. echinata* Lam. The phytochemical profile was obtained by analytical thin layer chromatography using methanol infusions of flowers, to characterize the various groups of secondary metabolites. The results indicated the presence of: polyphenols (flavonoids and condensed proanthocyanidins), terpenoids (triterpenes and steroids) and reducing sugars. The acute toxicity tests were conducted orally and intraperitoneally in male mice with observations of their behavior changes for each dose. The doses used were 1000-2160 mg/kg for intraperitoneal, and 2000 to 5000 mg/kg for oral route. Both oral administration and intraperitoneal showed the stimulatory effects followed by depressant effects after administration of the extract. The LD₅₀ by intraperitoneal route was 1825 mg/kg, which allows its classification as moderately toxic. The oral administration showed low toxicity, since it does not have caused death in any of the doses tested. The antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative bacteria and fungus *Candida albicans* was performed by agar diffusion technique. In the microbiological analysis the extract showed better inhibition zones in the well technique regarding testing of paper disc facing the species *Staphylococcus aureus* (19 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (18 mm), *Staphylococcus coagulase nagativo* (18 mm), *Escherichia coli* (16 mm) and *Enterococcus faecalis* (17 mm). In antitumor activity, the methodology of Stock et al. (1955) was used to induce the Carcinoma of Ehrlich and Sarcoma 180. For the tests we used doses of 250 and 500 mg/kg of extract and the control group received saline (0.9%), and the standard methotrexate (10 mg/kg), all orally. The extract showed significant reduction in the weights of the tumors, with tumor inhibitory rate in the highest rate of 78.5% for Carcinoma of Ehrlich. However, to extract the Sarcoma 180 in those doses showed no tumor inhibition. According to the results it is concluded that the crude ethanolic extract of flowers of *C. echinata* Lam has moderate toxicity by intraperitoneal and oral low toxicity. Was able to inhibit the growth of some Gram positive and Gram negative bacteria and also showed tumor inhibition against Carcinoma of Ehrlich.

Keywords: Phytochemistry. Acute toxicity. Antimicrobial activity. Antitumor activity. *Caesalpinia echinata* Lam

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 FAMÍLIA FABACEAE.....	23
2.2 <i>Caesalpinia echinata</i>	24
2.2.1 Importância Sócio-Econômica	24
2.2.2 Distribuição Geográfica	25
2.2.3 Aspectos Botânicos e Ecológicos	26
2.2.4 Aspectos Fitoquímicos	31
2.2.5 Aspectos Farmacológicos	31
2.2.6 Aspectos Toxicológicos	33
2.3 TOXICIDADE AGUDA.....	33
2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	35
2.4.1 Agentes Antimicrobianos	37
2.5 CÂNCER.....	38
2.5.1 Oncologia Experimental	41
2.5.1.1 Carcinoma de Ehrlich	41
2.5.1.2 Sarcoma 180	42
3 OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO GERAL.....	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4 ARTIGO I. Estudo fitoquímico preliminar e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam.	46
RESUMO	46
ABSTRACT	47
INTRODUÇÃO	47
MATERIAL E MÉTODOS	48
Material botânico e obtenção da matéria-prima.....	48
Preparação e concentração do extrato etanólico bruto das flores.....	48
Abordagem Fitoquímica.....	48
Toxicidade aguda do extrato e determinação da DL ₅₀	49
RESULTADOS	50

DISCUSSÃO.....	52
CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
5 ARTIGO II. Atividade antimicrobiana do extrato de <i>Caesalpinia echinata</i>	57
Lam. (Fabaceae)	
RESUMO.....	57
ABSTRACT.....	57
INTRODUÇÃO.....	58
MATERIAL E MÉTODOS.....	59
Material botânico e obtenção da matéria-prima.....	59
Preparação e concentração do extrato etanólico bruto das flores.....	59
Atividade Antimicrobiana.....	59
Cepas Bacterianas.....	59
Preparação dos inóculos.....	60
Técnica de difusão em poços.....	60
Técnica de difusão em discos de papel.....	61
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	65
6 ARTIGO III. Atividade antitumoral das flores de <i>Caesalpinia echinata</i>	
Lam. frente ao Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180.....	70
RESUMO.....	70
ABSTRACT.....	71
INTRODUÇÃO.....	71
MATERIAL E MÉTODOS.....	72
Material botânico e obtenção da matéria-prima.....	72
Preparação e concentração do extrato etanólico bruto das flores.....	72
Animais.....	72
Transplante dos tumores.....	73
Tratamento dos animais.....	73
Médias de variações de peso.....	73
Análise estatística.....	74
RESULTADOS.....	74

DISCUSSÃO.....	76
CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS.....	78
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICES.....	93
ANEXOS.....	98



1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais desempenham utilidade na medicina atual. Primeiramente, por fornecerem fármacos extremamente importantes, os quais dificilmente seriam obtidos via síntese química, como por exemplo, os digitálicos. Em segundo lugar, as fontes naturais podem fornecer compostos básicos que podem ser ligeiramente modificados para tornarem-se mais eficazes ou menos tóxicos (ex: variações na molécula da morfina). Em terceiro lugar, os produtos naturais podem ser utilizados como protótipos ou modelos para medicamentos sintéticos que mantenham as atividades fisiológicas dos compostos originais, como por exemplo, a procaína. E por último, oferecer um produto parcialmente elaborado de um medicamento de difícil obtenção como, por exemplo, o estigmasterol, abundante no óleo de soja e sem valor terapêutico que pode ser transformado por um processo relativamente simples na hidro-cortisona ou em corticosteróides afins, compostos estes, que ocorre em pequenas quantidades na natureza (ROBBERS et al., 1997; MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Baseadas apenas na chamada sabedoria popular, inúmeras pessoas utilizam as plantas para o tratamento de doenças desconhecendo seus riscos e benefícios, o que torna os estudos toxicológicos e farmacológicos pré-clínicos e clínicos indispensáveis para a proteção à saúde da população, bem como para comprovar cientificamente a eficácia terapêutica desses produtos. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial, entretanto, representa um problema sério. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxicidade, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente (VEIGA-JUNIOR et al., 2006).

No Brasil, o uso elevado de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos ocorre devido a fatores diversos, entre os quais podemos destacar: a imensa variedade de espécies vegetais com potencial terapêutico existentes em nosso território; o relativo baixo custo financeiro dos produtos fitoterápicos, o que os torna mais acessíveis à população de baixa renda e até mesmo por questões culturais (MARIZ, 2007).

Caesalpinia echinata Lam. é uma angiosperma pertencente a família Fabaceae, de alto interesse histórico, econômico e ecológico. Apesar de sua importância, essa espécie praticamente não tem sido objeto de estudos biológicos por parte dos pesquisadores. Logo, direcionamos nossa pesquisa com intuito de avaliar a espécie vegetal, com conotação

medicinal buscando-se informações etnobotânicas, etnomedicinais e também informações fitoquímicas indispensáveis ao acervo sobre plantas medicinais.



2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FAMÍLIA FABACEAE

Leguminosae Juss. ou Fabaceae Lindl. (Sensu APG II), é a terceira maior família de angiospermas, compreendendo cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies (LEWIS et al., 2005), ficando atrás apenas Orchidaceae e Asteraceae (DOYLE; LUCKOW, 2003). Cronquist (1981, 1988), em seu esquema de classificação, considerou os legumes como três famílias independentes. Nos estudos recentes, existe um consenso no tratamento da família, com base em dados moleculares e não-moleculares, no qual Leguminosae é dividida nas subfamílias Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae (Faboideae) (JUDD et al., 1999; LEWIS; SCHRIRE, 2003; APG II, 2003; SOLTIS et al., 2005). A subfamília Faboideae é a maior com 476 gêneros e aproximadamente 14.000 espécies (LEWIS et al., 2000); em Mimosoideae, encontra-se 77 gêneros e aproximadamente 3.000 espécies (DOYLE; LUCKOW, 2003); Caesalpinioideae é formada por 170 gêneros e cerca de 3.000 espécies (DOYLE, 1995; DOYLE et al., 2000; BRUNEAU et al., 2001), sendo extremamente diversa em morfologia (TUCKER, 2003), compartilhando algumas das características de Mimosoideae e Faboideae.

Fabaceae está distribuída no mundo em diferentes habitats, latitude e altitudes nos mais diferenciados ecossistemas. Enquanto que Faboideae é cosmopolita, as outras subfamílias ocorrem principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do globo (HEYWOOD, 1979; POLHILL et al., 1981).

Segundo os estudos mais recentes, existe uma concordância na organização de Caesalpinioideae, sendo esta dividida em cinco tribos: Cercideae, Caesalpinieae, Cassieae, Datarieae e Macrolobieae (BRUNEAU et al., 2001; TUCKER et al., 2003).

Na tribo Caesalpinieae, encontra-se o gênero *Caesalpinia*, composto de árvores ou arbustos de clima tropical ou subtropical e com mais de 120 espécies distribuídas pelo mundo. Algumas espécies deste gênero apresentam certas particularidades, especialmente em suas folhas, com acentuadas variações no tamanho e forma dos folíolos (LEWIS, 1998) e com flores geralmente hermafroditas, com simetria radial ou bilateral e inflorescências indeterminadas (JUDD et al., 1999; TUCKER, 2003).

2.2 *Caesalpinia echinata*

2.2.1 Importância Sócio-Econômica

O pau-brasil é considerado uma madeira de lei de alta qualidade, flexível, porém de extrema dureza. Nos primeiros anos do século XVI, o período em que foi abundante, era utilizado para construção de navios na indústria naval, assim como na construção civil e na fabricação de moveis e artesanato. Também foi amplamente utilizado, por volta do século XVII e XVIII, na Europa no tingimento de ovos de Páscoa, na produção de laca líquida, na composição de giz colorido e até na fabricação de uma pasta de dentes (BUENO; LIMA, 2002). Porém, o uso mais conhecido era mesmo para a fabricação de tinta, com a qual se tingia tecido e couro. Essa tinta era extraída do cerne da árvore, constituído pelo pigmento brasilina, isolado em 1808 pelo químico Frances Michel Eugene Chevreul e tinha a coloração alaranjada. Em contato com o ar, havia uma oxidação da brasilina, e essa substância se transformava em outra, chamada brasileína, de cor vermelha (Figura 1). O cerne era moído e reduzido a pó pelas indústrias da França e Itália para obtenção do pigmento vermelho usados para tingir os tecidos (OLIVEIRA et al., 2002). Ressalta-se que a popularização do pau-brasil na Europa, a partir do século XVI, não se deveu tanto a qualidade de sua pigmentação, mas às variadas matizes obtidas de seus pigmentos em tons vermelhos até arroxeados (REZENDE et al., 2004).

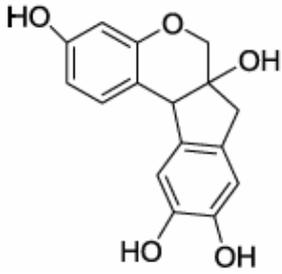
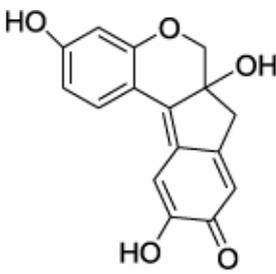
Parte usada: Cerne da madeira	Fórmula química
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p data-bbox="743 1816 863 1850">Brasilina</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p data-bbox="1203 1816 1339 1850">Brasileína</p> </div> </div>

Figura 1. Estrutura química dos constituintes majoritários do cerne do pau-brasil. **Fonte:** AGUIAR & PINHO, 2007; REZENDE et al., 2004.

O aparecimento do primeiro corante artificial, a malveína, descoberta por Wiliam H. Perkin em 1856 promoveu uma acelerada desvalorização comercial do pau-brasil no sistema financeiro internacional, apesar disso, permaneceu como uma das rendas estruturais do orçamento nacional até 1875 (REZENDE et al., 2004). Segundo Cardoso et al., (2001), no mesmo período que desmoronou o mercado do pau-brasil com a descoberta dos corantes sintéticos, descobriu-se que sua madeira era excelente para fabricar arcos de violino, violoncelo, viola e contrabaixo, desde então vem sendo usada para a confecção de arcos profissionais de alta qualidade.

O papel econômico do pau-brasil é incontestável, influenciando na economia mundial, seja na moda, nas finanças ou na indústria. Tornou-se uns dos produtos mais negociados da época, iniciando o primeiro ciclo econômico do Brasil, também, o primeiro monopólio estatal (BUENO; LIMA, 2002). Antes de seu tratamento botânico e da intitulação de seu nome científico, o pau-brasil recebeu várias sinonímias segundo a nacionalidade do grupo explorador dos países europeus, como Pau-brasil dos portugueses, Verzino dos Italianos, Fernambukholz dos alemães, Bois de Fernambouc dos franceses, Palo Brasil dos espanhóis e Brasil-wood ou Pernambuc-wood dos ingleses. Para os povos nativos, era denominado Ibirapitanga, que na língua Tupi se representa por “ibirá = pau + pitãga = vermelho”, traduzindo-se como pau-vermelho. Ficou conhecido, ainda, por diversos outros nomes: pau-rosado, pau-de-tinta, pau-de-pernambuco, muirapiranga, arabutan, orobutan e outros (FONTES, 1995).

O pau-brasil realmente entrou no mundo científico no ano de 1785, quando o naturalista francês Jean Baptiste Antoine Pierre Monnet Lamarck (1744-1829) procedeu à descrição da espécie. O gênero *Caesalpinia* (LINEU, 1753) derivou de uma homenagem a Andrea Caesalpinio, médico e botânico italiano que viveu no século XVI (1519-1603). *Caesalpinia echinata*, assim batizado fazendo uma referência ao termo “echinata” que quer dizer “similar a um ouriço” característica conferida da observação do seu fruto, o qual apresenta acúleos na face externa, aspecto similar ao do ouriço (LIMA et al., 2002).

2.2.2 Distribuição Geográfica

Na época do descobrimento, o pau-brasil era abundante no litoral brasileiro, entre Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte, em regiões tropicais e subtropicais, habitando as matas

secas ou semiáridas deste trecho, com exceção de Cabo Frio (RJ) e Santa Cruz de Cabrália (BA), onde ocorre em matas úmidas (AGUIAR; AOKI 1983).

Atualmente, o pau-brasil ainda pode ser encontrado, esporadicamente, em estado silvestre na costa brasileira desde os Estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Pernambuco, Paraíba até o Rio Grande do Norte (Figura 2), sendo o extremo sul da Bahia sua principal região de ocorrência natural (ROCHA, 2004).



Figura 2. Mapa mostra o pau-brasil em estado silvestre. **Fonte:** AGUIAR & PINHO, 2007.

No Estado de Pernambuco, a Reserva Ecológica do Tapacurá, localizada no município de São Lourenço da Mata, mantém uma reserva natural de pau-brasil com árvores cuja altura varia de 10 a 20 m e diâmetro em torno de 20 a 30 cm. São encontradas, remanescentes do vegetal em toda a zona da mata seca de Pernambuco, desde São Lourenço da Mata até Vitória de Santo Antão; acompanhando todo o Vale do Tapacurá. Ressalta-se, também, a ocorrência nos municípios de Nazaré da Mata, Tracunhaém, Pau D’Alho, Timbaúba e Goiana (AGUIAR; AOKI 1983).

2.2.3 Aspectos Botânicos e Ecológicos

Entre as primeiras informações botânicas publicadas na língua nacional relativas ao pau-brasil, consta no “Dicionário de Botânica Brasileira”, de Joaquim de Almeida Pinto, Rio de Janeiro, 1873 (Figura 3).

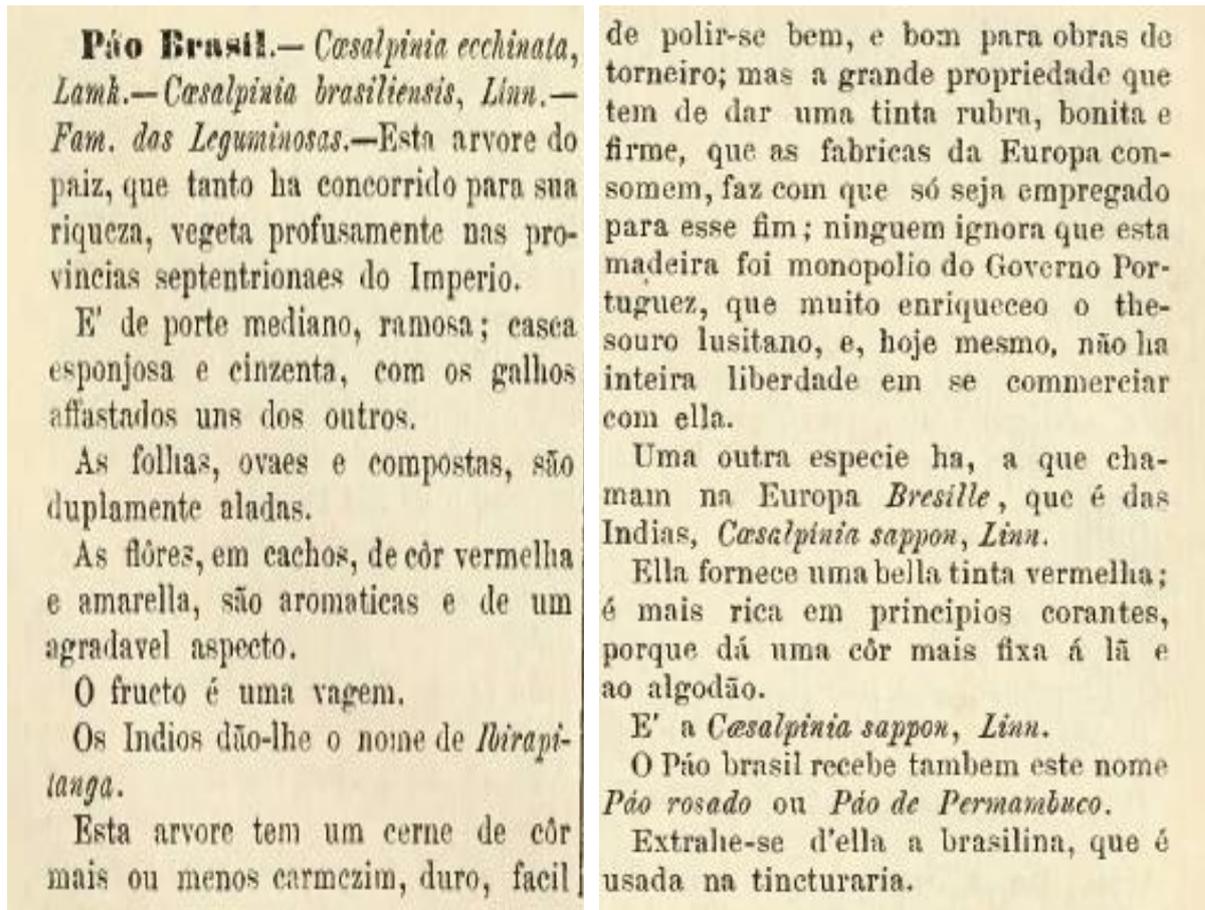


Figura 3. Primeira descrição botânica de *C. echinata* Lam. **Fonte:** PINTO, 1873.

Trata-se de uma planta de porte arbóreo (Figura 4 a), variando de 5 a 15 m de altura. Entretanto, o porte dos exemplares atuais é de 10 a 12 m, contudo existem registros do período colonial de indivíduos com até 30 m (LEWIS, 1998; LIMA et al., 2002). Sua copa é bastante irregular e densa, repleta de galhos com tons variando de cinza-claro nas partes mais velhas e verde-escuro nas terminações. Em indivíduos jovens são detectados acúleos (Figura 4 b) na extensão do caule, assim como, nos ramos mais novos (FONTES, 1995; LIMA et al., 2002). A casca geralmente apresenta tonalidade pardo-acinzentada. No interior do tronco, encontra-se o cerne, que na planta adulta varia de castanho-alaranjado ao vermelho-escuro, externamente encontra-se o alburno, mais claro e menos denso do lenho (Figura 4 c) (LIMA et al., 2002).

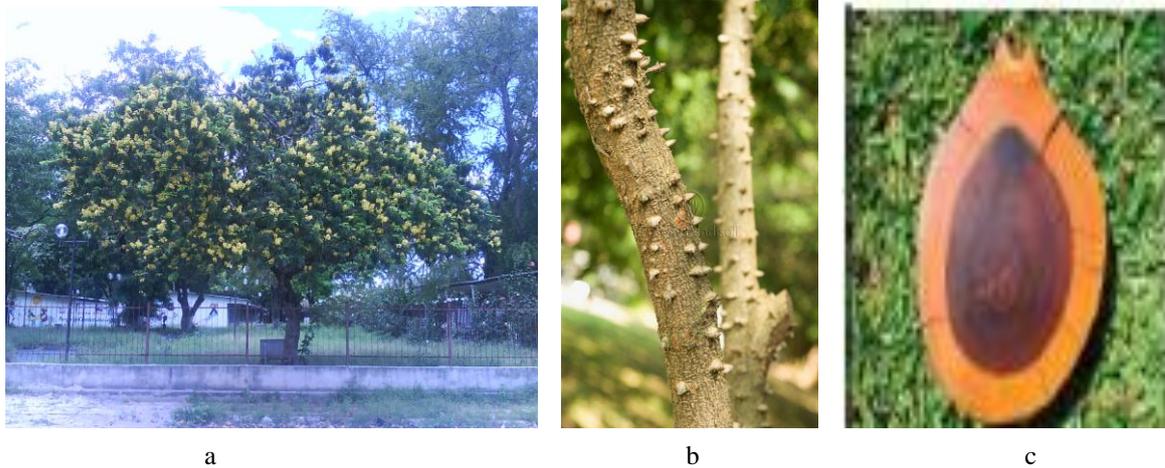


Figura 4. Árvore de *C. echinata* Lam. (a); Tronco recoberto por acúleos (b) e Corte transversal do tronco, mostrando o cerne vermelho (c). **Fonte:** AGUIAR & PINHO, 2007; GRANDISOLI, 2010.

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 (Figura 5) (AGUIAR; PINHO, 1996).

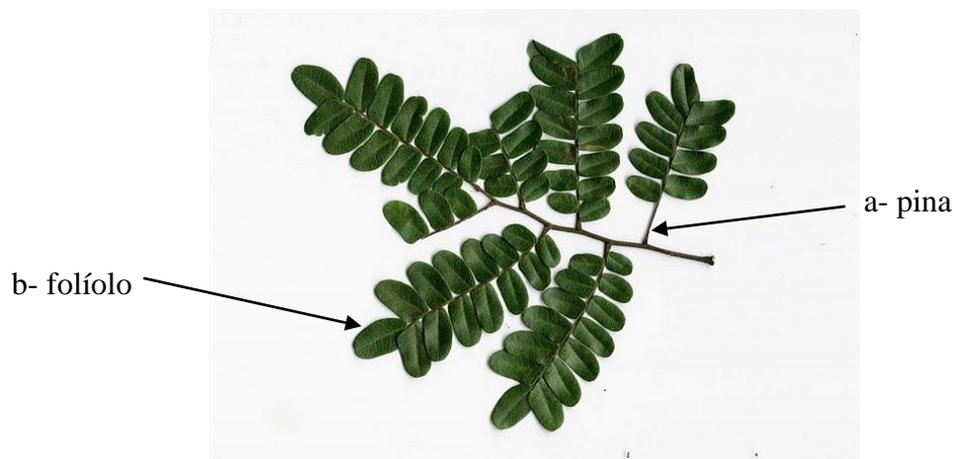


Figura 5. Folha do pau-brasil, demonstrando a – pina e b – folíolo. **Fonte:** SILVA-JÚNIOR. 2007.

A inflorescência deste pode ser descrita como um cacho simples, podendo conter 15 a 40 flores (Figura 6). Suas flores são hermafroditas e pentâmeras. O cálice de cor verde-amarelada é formado por cinco sépalas. A corola possui cinco pétalas com intensa coloração amarela e com a pétala mediana destacando-se pela presença de uma mancha central vermelho-escura (FONTES, 1995; LEWIS, 1998, JUDD et al., 1999; TUCKER, 2003). Acredita-se que essa pétala modificada esteja associada à estratégia reprodutiva e tenha sua

função diretamente relacionada com a atração de agentes polinizadores, ou seja, funcione como um bio-sinalizador (ZAIA, 2004).

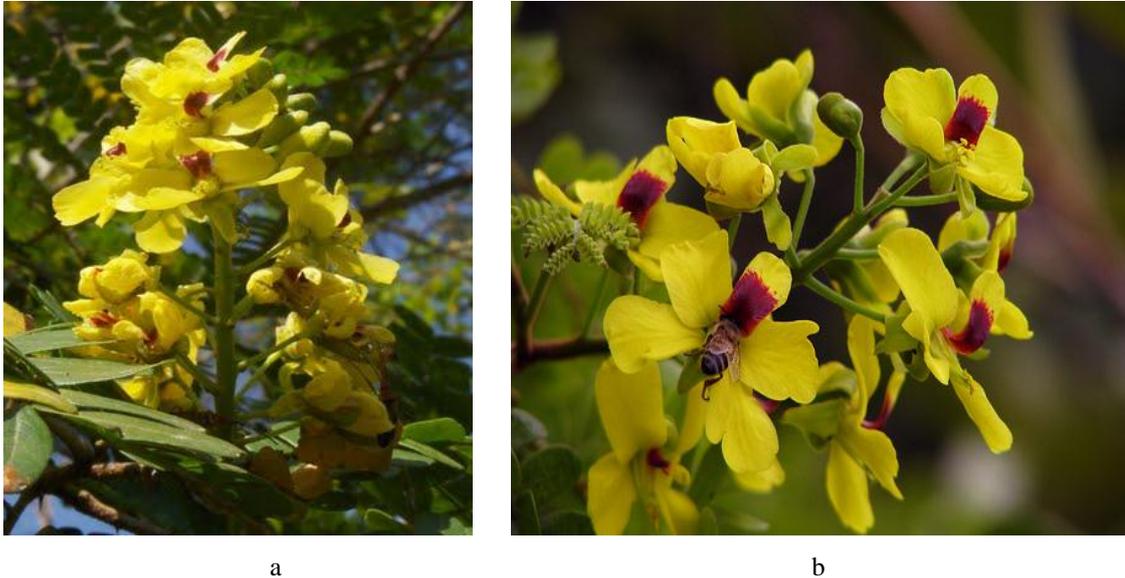


Figura 6. Inflorescência do tipo cacho (a) e Destaque das flores de *C. echinata* Lam. (b). **Fonte:** ALEXANDER, 2009.

Os frutos são do tipo legume, conhecidos também como vagem, de coloração verde quando imaturos e de cor marrom quando maduros (Figura 7). Possuem deiscência explosiva e são totalmente recobertos por acúleos que se formam logo após a floração (JUCHUM, 2007).



Figura 7. Fruto de coloração verde – imaturos (a) e Fruto de cor marrom (maduros) do pau-brasil (b). **Fonte:** BERNARDES, 2009.

A semente do pau-brasil é achatada, elíptica, de coloração acastanhada, lisa de 1 a 1,5 cm de diâmetro por 0,3 cm de espessura, de 2 a 4 por fruto (Figura 8). No momento da abertura da vagem são dispersas até quatro a cinco metros da árvore genitora (LIRA et al., 2003).



Figura 8. Frutos abertos, expondo as sementes (a) e Sementes de *C. echinata* Lam. (b). **Fonte:** BORGES, 2007.

Em seu habitat natural, um dos fatores que podem influenciar o crescimento e determinar o porte de *C. echinata* é a disponibilidade de luz. Estudos realizados em fragmentos florestais demonstraram que a luminosidade pode influenciar a taxa de sobrevivência e mortalidade das plântulas, foi verificado que em locais de maior disponibilidade de luz, as taxas de mortalidade foram menores e ocorreu maior número de plântulas (LIMA et al., 2002). Trata-se de uma espécie ameaçada de extinção e visando sua reintrodução e conservação *in situ*, essas informações seriam de extrema importância nos programas de plantio do pau-brasil (MELO, 2005).

A floração e a frutificação tendem a acontecer em momentos distintos em diferentes regiões do Brasil, sendo que, no nordeste a espécie geralmente floresce nos meses de outubro e novembro, e frutifica entre novembro a janeiro (LIMA et al., 2002).

Estudos da morfologia floral de *C. echinata* constataram que a espécie apresenta características capazes de atrair polinizadores (ZAIA, 2004). Corroborando essa última informação, Lewis et al. (2000) concluíram que as abelhas são orientadas pela mancha vermelha presente na pétala mediana que reflete a luz ultravioleta absorvida pela combinação vermelha ou laranja.

2.2.4 Aspectos Fitoquímicos

O estudo fitoquímico da casca de *C. echinata* demonstrou abundante presença de taninos (SILVA, 2001). A investigação do lenho do vegetal demonstrou a presença de ligninas, polímero de três álcoois: p-coumaril, 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).

A abordagem fitoquímica realizada por Silva (2006) com o extrato metanólico bruto (EMB) do cerne de *C. echinata* Lam. indicou a presença marcante de flavonóides. Cumarinas e taninos catéquicos estiveram presentes em pequenas quantidades.

A identificação dos componentes químicos das flores e folhas do pau-brasil encontrou 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 Cromatografia Gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas (CGAR-EM) alguns monoterpenos, ácidos carboxílicos e ésteres. Isoprenóides são freqüentemente encontrados na composição do aroma floral de diversas espécies, este fato pode estar ligado à presença de sinalizadores químicos específicos no processo de polinização (REZENDE et al., 2004).

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

A análise das sementes do pau-brasil realizada por Oliveira et al. (2002) evidenciou a presença de pelo menos dois inibidores de tripsina com massas moleculares de 19,5 e 10 kDa. A extração dos ramos do vegetal revelou a presença de um diterpeno, o ácido daniélico, anteriormente isolado de uma *Caesalpinia* africana (SOUZA et al., 2004).

2.2.5 Aspectos Farmacológicos

A espécie *C. echinata* Lam. (pau-brasil) tem sido pouco estudada para usos medicinais. Entretanto é citado, como remédio adstringente, corroborante e secante,

empregando-se a casca cozida, para debelar diarreias e disenterias e, quando reduzida a pó, a casca também possui aplicação no fortalecimento de gengivas (RAMALHO, 1978).

O extrato do cerne de *C. echinata* foi capaz de inibir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, tais como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris* e *Bacillus cereus* (FREIRE, 2004). A espécie também apresentou potencial antifúngico, o extrato de seus ramos foi capaz de inibir o crescimento de colônias de fungos das espécies *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (SOUZA et al., 2004).

O extrato etanólico bruto (EEB) do cerne de *C. echinata* possui um expressivo potencial antiinflamatório, mesmo quando comparado a fármacos considerados padrões para esta atividade. Quando testado contra duas linhagens tumorais (Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180), o extrato foi capaz de inibir o crescimento de tumores carcinomatosos em até 90%, enquanto a análise dos tumores sarcomatosos apresentou inibição significativa de até 70% (SILVA, 2006).

Em 2002, Alencar et al. avaliaram a atividade biológica da lecitina extraídas das folhas de *C. echinata*, verificando a capacidade de induzir a migração de neutrófilos dependentes e independentes das células residentes (macrófagos, mastócitos e linfócitos), apresentando, desse modo, atividade pró-inflamatória.

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

O extrato etanólico das folhas de *C. echinata* foi avaliado quanto sua atividade antitumoral. O extrato demonstrou redução significativa nos pesos dos tumores com índice de inibição tumoral de 99,4% frente ao Sarcoma 180. Com relação à atividade antinociceptiva e antiinflamatória, o extrato reduziu, de forma dose-dependente, o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste da formalina reduziu o tempo de lambida na pata em ambas as fases. No modelo de inflamação utilizado (edema de pata induzido por carragenina) o extrato não apresentou resultados significativos (GRANGEIRO, 2009).

Segundo Cruz-Silva et al. (2004), as sementes de *C. echinata* possui uma importante aplicação biomédica devido à presença da proteinase serina, enzima envolvida em diferentes processos biológicos ligados à coagulação sanguínea e fibrinogênese.

A brasilina, isolada de *C. echinata* tem ação hipoglicemiante em animais de experimentação portadores de diabetes, efeito este decorrente do aumento no metabolismo de

glicose (MOON et al., 1993). Além disso, a brasilina demonstra também muitos outros efeitos farmacológicos, incluindo atividade antimicrobiana (XU; LEE, 2004), inibição da proteína quinase C e do receptor da insulina em estômago de rato (KIM et al., 1998); proteção da toxicidade induzida por BrCCl₃ em cultura de hepatócitos (MOON et al., 1992).

Além destes efeitos, a molécula constitui um importante imunossupressor, sendo capaz de eliminar a resposta humoral bem como a resposta celular, provavelmente, através da indução da apoptose dos linfócitos do timo e do baço dos camundongos, e da inibição da proliferação linfocítica (YE et al., 2006).

2.2.6 Aspectos Toxicológicos

Estudos realizados por Silva (2006) avaliou as propriedades tóxicas do extrato etanólico do cerne de *C. echinata* através de dois bioensaios, a concentração letal 50% (CL₅₀) em larvas de *Artemia salina* e a dose letal 50% (DL₅₀) em camundongos albinos Swiss, utilizando duas vias de administração: via oral (v.o.) e via intraperitoneal (v.i.p.). O estudo da toxicidade aguda apontou uma DL₅₀ de 995,57 mg/Kg quando administrado por via intraperitoneal, considerado moderadamente tóxico, resultado corroborado com o valor da CL₅₀ (705,61 µg/mL) obtido. Na avaliação da DL₅₀ por via oral, não foi verificado óbito até a dose limite de 4.000 mg/kg, indicando que o extrato quando administrado por esta via apresenta baixa toxicidade.

Em 2009, Grangeiro avaliou a toxicidade aguda por via oral do extrato etanólico das folhas de *C. echinata* (até a dose de 2.000 mg/Kg) em camundongos albinos Swiss. O extrato apresentou baixa toxicidade por essa via de administração.

2.3 TOXICIDADE AGUDA

A investigação do potencial tóxico de plantas medicinais pode elucidar importantes aspectos farmacológicos de seus princípios ativos, permitindo uma utilização segura, respeitando seus possíveis riscos toxicológicos (RABÊLO, 2010).

Uma substância altamente tóxica promoverá um efeito danoso ao organismo vivo e/ou ao ambiente, quando empregada em mínimas quantidades, enquanto que as substâncias de baixa toxicidade precisam de altas doses para promover um efeito tóxico (VENANCIO, 2006).

Os testes de toxicidade são elaborados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias. Na determinação da toxicidade, há necessidade de realizar ensaios pré-clínicos e clínicos. Os ensaios pré-clínicos são realizados em laboratório através de testes *in vivo* e *in vitro*. Os testes *in vivo* utilizam animais, principalmente roedores e mamíferos, como camundongos, ratos, macacos, cães, e outros. Os ensaios *in vitro* empregam freqüentemente órgãos isolados, fluídos corpóreos, organismos inferiores e cultura de células e tecidos (JIE YIN; MYEONG, 2007.).

Um dos primeiros testes realizados para a avaliação do potencial tóxico de quaisquer substâncias é o de toxicidade aguda. Este consiste no efeito que uma substância produz dentro de um curto período de tempo e que resulta da administração de uma única dose ou de doses múltiplas administradas dentro de um período de 24 horas (KUMAR, 2006).

Os estudos de toxicidade aguda são realizados em animais adultos de ambos os sexos e verifica-se o número de animais que morrem durante o período de observação. A avaliação dos resultados permite conhecer a espécie ou sexo mais sensível. Além de dados de mortalidade e peso corporal, podem ser avaliados vários parâmetros como sinais de intoxicação, letargia, mudanças comportamentais, morbidade, alteração no consumo de alimento entre outros. (GAZDA, 2004).

O teste serve de base para o estabelecimento de um regime de doses para pesquisas sobre a toxicidade subaguda e crônica, fornece subsídios sobre o modo de ação tóxica da substância teste bem como o binômio dose-efeito letal, que é estimada por um parâmetro denominado dose letal 50%, mais conhecida como DL_{50} (KLAASSEN; EATON, 1994).

O teste da DL_{50} foi introduzido por Trevan em 1927, e determina um valor estatisticamente derivado da administração de dose única de uma substância que pode provocar a morte de 50% dos animais, sendo expresso em peso da substância teste por unidade de peso do animal experimental (mg/kg). O valor da DL_{50} é usado como um índice para a classificação toxicológica, fornecendo subsídios para estudos de avaliação de risco da exposição humana (SCHLEDE et al., 2005).

Deste modo, este padrão visa à detecção e avaliação do potencial tóxico, para o homem, de qualquer substância ou produto químico acabado, ao qual possa estar exposto. Por meio da observação e quantificação do número de mortes após a administração por diferentes vias em ratos ou camundongos (BIGHETTI et al., 2004).

2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA

As bactérias têm sido classificadas como resistentes ou sensíveis. São ditas resistentes quando são inibidas *in vitro* só em concentrações superiores às atingidas *in vivo*. Essa relação concentração da droga-inibição de crescimento não é completamente verdadeira, pois o sucesso terapêutico não depende exclusivamente dessa relação, mas sim, de fatores que incluem a capacidade da droga em atingir o foco infeccioso. Ainda o comprometimento imunológico do paciente, alvo da terapia, o quanto essa imunidade pode contribuir para auxiliar a terapêutica quimioterápica. Dessa forma, um dado microrganismo é sensível ou resistente quando se observa o sucesso ou insucesso terapêutico, respectivamente. Logo, deve-se encarar a terapêutica de uma maneira mais abrangente, menos simplista, considerando-se: droga, microrganismo, farmacocinética e imunidade do paciente (TOWNER, 2007).

A resistência microbiana à determinada droga pode ser classificada inicialmente como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca ou natural é aquela que faz parte da herança genética do microrganismo, transmitida de geração a geração sem perda da característica. O maior determinante de resistência natural é a presença ou ausência do alvo para a ação da droga. Esta característica fenotípica não apresenta qualquer risco à terapêutica, pois é previsível, bastando-se conhecer o agente etiológico da infecção e os mecanismos de ação dos fármacos disponíveis clinicamente (HAWKEY, 1998).

A resistência não natural ou adquirida ocorre quando há o aparecimento de resistência em uma espécie bacteriana anteriormente sensível à droga em questão. É uma “nova” característica manifestada no microrganismo, que está ausente nas células genitoras. Essa nova propriedade é resultado de alterações estruturais e/ou bioquímicas da célula bacteriana, determinada por alterações genéticas cromossômicas ou extra-cromossômicas (plasmídios). Uma simples alteração genética pode levar ao aparecimento de um exemplar muito resistente, que normalmente não perde viabilidade e patogenicidade (GOLD; MOELLERING, 1996).

Existem vários mecanismos através dos quais os microrganismos se tornam resistentes às drogas, dentre esses podemos citar (TRAVERS, 2002):

- Produção de enzimas inativadoras: bactérias podem conter genes que codificam a produção de enzimas com propriedades de clivar, de quebrar ou ainda de promover alterações estruturais na molécula da droga tornando-a inativa contra aquele microrganismo. Outras

enzimas em vez de quebrar a estrutura molecular da droga, apenas alteram sua conformação, pois são capazes de promover acetilação, adenilação e fosforilação, que reduz sua afinidade pelo receptor, favorecendo a síntese protéica bacteriana.

- Impermeabilidade à droga: muitas bactérias são resistentes por serem impermeáveis à droga, ou por apresentarem alterações em proteínas de ligação.

- Bombeamento ativo de drogas: é um mecanismo através do qual as bactérias diminuem a concentração citoplasmática de drogas para o meio extracelular. O sistema chamado “multi-drug-pum” bombeia inespecificamente várias drogas. Estas não atingem concentrações intracelulares suficientes para promover inibição de síntese protéica bacteriana, pois são quase instantaneamente bombeadas para fora da célula.

- Alteração do receptor para a ação da droga: para que uma droga exerça sua atividade farmacológica frente a um microrganismo é necessário que haja a ligação ou a interação fármaco-receptor. Muitas vezes, por mutação cromossômica, há a alteração bioquímica desse receptor, impedindo uma perfeita ligação entre a droga e seu receptor na bactéria. Esse mecanismo de manifestação de resistência ocorre em inúmeras bactérias para diferentes tipos de antibióticos

As principais conseqüências da resistência bacteriana são: a ineficácia terapêutica, o aumento do custo e do tempo de tratamento, pela utilização de medicamentos mais caros e até mais tóxicos; aumento do tempo de hospitalização; isolamento do paciente; aumento da taxa de mortalidade associada a este tipo de infecção (MARQUES; ZUCCHI, 2006; TRAVERS; BARZA, 2002).

Constata-se hoje que a resistência bacteriana é bem mais complexa do que se pensava e ocorre com freqüência razoável. O uso indiscriminado dos antimicrobianos e a administração de forma não controlada, juntamente com o aumento da prevalência das doenças imunossupressoras tem sido as mais importantes causas da resistência aos antimicrobianos (SILVA et al., 2007).

As dificuldades encontradas na descoberta de agentes de origem sintética ou microbiana merecem a ênfase dada pelos pesquisadores ao estudo das plantas com peculiaridades medicinais. O problema comporta estudos que tem como objetivo a comprovação da atividade antibacteriana de extratos vegetais contra cepas resistentes e multirresistentes, a partir de pesquisas que tenham esse delineamento, um eficaz bactericida/bacteriostático poderá ser desenvolvido.

2.4.1 Agentes Antimicrobianos

Os fármacos usados no tratamento de doenças causadas por bactérias e fungos são denominados agentes antimicrobianos. Estes contribuem de forma decisiva para a diminuição das taxas de morbidade e mortalidade, principalmente das doenças infecciosas de origem bacteriana (SILVA, 2006).

A história dos agentes antimicrobianos é dividida em três grandes eras. A primeira, conhecida também como a era dos alcalóides, data de 1630 cujos registros constata a utilização do extrato da casca de cinchona para tratamento da malária e a raiz de ipecacuanha para tratamento da disenteria amebiana, sendo esses extratos e seus derivados (alcalóides, quinina e emetina) um único grupo conhecido como recurso terapêutico (PELCZAR et al., 2008).

A segunda era, conhecida como a dos compostos sintéticos, foi marcada pela descoberta do médico alemão Paul Ehrlich em 1908 que conduziu a primeira pesquisa sistemática para compostos (neste caso, compostos de arsênico), encontrando um que tinha efeito antimicrobiano sem ser tóxico para humanos, o composto 606 de Ehrlich, também chamado salvarsan, ativo contra o treponema causador da sífilis. Esse composto foi usado como tratamento de escolha para sífilis e posteriormente foi substituído pela penicilina que havia sido descoberta pelo microbiologista britânico Alexander Fleming em 1929 devido à contaminação de uma placa inoculada com *Staphylococcus aureus* por um fungo (do gênero *Penicillium*) formando uma zona clara ao redor de sua colônia, mostrando o poder inibitório da substância produzida pelo mesmo (JORGENSEN et al., 1999).

Em 1936 o químico Frances Jacques Trefouel e sua equipe descobriram um composto incolor chamado sulfanilamida, substância com atividade frente a microrganismos cultivados em meios laboratoriais quanto os presentes em tecidos animais vivos. Quando o efeito curativo das sulfonamidas (derivados das sulfanilamidas) foi demonstrado em ratos, estudos em pacientes com erisipela e outras infecções foram iniciados. Este ano marcou o início da terceira era, conhecida como a era moderna dos antibióticos, marcada pelo controle das infecções por estreptococos e pneumococos com o uso que já vinha sendo feito das sulfonamidas. Em 1941 a penicilina tornou-se disponível em quantidades suficientes para uso clínico. A terceira era é a que perdura até hoje (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Desde seu início até os dias atuais surgiram inúmeros agentes antimicrobianos e o conhecimento dos mecanismos moleculares de replicação das bactérias, fungos e vírus

facilitou o desenvolvimento racional de compostos capazes de interferir nos ciclos vitais dos mesmos. Esses compostos têm sua classificação baseada na estrutura química e no mecanismo de ação (GODMAN & GILMAN, 2003).

Existem propriedades que devem ser comuns as diversas drogas antimicrobianas: (1) apresentar toxicidade seletiva, ou seja, deve agir apenas no microrganismo, sem causar danos ao hospedeiro; (2) ter amplo espectro de ação, ou seja, apresentar atividade sobre várias espécies antimicrobianas; (3) ter mecanismo de ação específico, atuando de maneira diferente nas células-alvo, quer seja, inibindo a síntese da parede celular (penicilina, cefalosporina), destruindo a membrana citoplasmática (polimixina), inibindo a síntese de proteínas (tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol), agindo como antimetabólicos (sulfotrimetropin); (4) ter poucos efeitos colaterais (MURRAY et al., 2002).

Logo, um antimicrobiano ideal, é aquele que apresente atividade letal ou inibitória contra diferentes espécies de microrganismos, não provoque efeitos adversos, seja quimicamente estável e não induza resistência microbiana (SCHENKEL et al., 2004).

A busca de novas alternativas que possam substituir ou melhorar os antimicrobianos disponíveis é necessário, e uma das fontes de pesquisa é representada pelos produtos de origem natural.

2.5 CÂNCER

Os primeiros indícios de tratamento em pacientes com câncer vêm do papiro datado de 1600 a.C. do egiptologista Edwin Smith acredita-se que ele tomou como base documentos ainda mais antigo datado por volta de 3000 a.C. O papiro documenta um procedimento cirúrgico no qual, ficou estabelecido como o método primário de tratar tumores sólidos e tomando as devidas proporções, este método permanece até os dias de hoje (ADAM et al., 2003).

O termo câncer é a tradução latina da palavra grega carcinoma (de *karcinos* = crustáceo, caranguejo) e neoplasia significa “novo crescimento”, do grego *neos* = novo, e *plasma* = algo formado. Esta terminologia foi utilizada pela primeira vez por Galeno (aproximadamente 138-201 d.C) para indicar um tumor maligno de mama no qual as veias superficiais eram túrgidas e ramificadas, semelhando-se às patas de um caranguejo. Atualmente, esse termo é utilizado como sinonímia de neoplasia maligna (COTRAN et al., 2000).

O câncer é uma doença do material genético (o genoma) de nossas células, e decorre do acúmulo progressivo de mutações, ou seja, alterações nos genes. As mutações fazem com que células que antes executavam um programa bem definido, denominado ciclo celular, associado às suas funções em seu tecido de origem, cresçam de maneira descontrolada. Esse crescimento alterado é consequência não só da duplicação celular desordenada, mas também da progressiva resistência à morte celular. Além disso, as células cancerosas ultrapassam os limites dos tecidos de origem, adquirem a capacidade de modificar o ambiente que as cercam, desrespeitam fronteiras e migram pelos diversos tecidos do corpo (OTAKE et al., 2006).

Os tumores apresentam, em graus variáveis, quatro características peculiares: desdiferenciação e perda da função; proliferação descontrolada; poder de invasão sobre tecidos adjacentes e metástases, processo de disseminação do tumor para locais distantes do ponto de origem que resulta em novos tumores (LEMKE; WILLIAMS, 2008).

Para o surgimento do câncer é necessário que ocorra todo um processo, envolvendo várias etapas, denominado carcinogênese. Esse processo pode iniciar-se de forma espontânea ou ser provocada pela ação de agentes carcinogênicos (químicos, físicos ou biológicos). Em ambos os casos, verifica-se a indução de alterações mutagênicas e não mutagênicas ou epigenéticas nas células (OLIVEIRA, 2005).

A incidência, a distribuição geográfica e o comportamento de tipos específicos de cânceres estão relacionados com múltiplos fatores, incluindo sexo, raça, idade, hereditariedade, influências culturais (alimentação, estresse), danos oxidativos nas células, declínio do sistema imune, predisposição genética e exposição à carcinógenos ambientais (HEGEDUS, 2000).

Desses fatores, os ambientais são, provavelmente, os mais importantes. Os carcinógenos físicos (raios ultravioleta, radiação ionizante), químicos (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos principalmente os derivados do tabaco e da queima de combustíveis fósseis, nitrosaminas, aflatoxinas, dentre outras) e biológicos (vírus de ácido desoxirribonucléico (DNA) do grupo herpes e papiloma, bem como vírus de ácido ribonucléico (RNA) do tipo C), foram claramente implicados na indução de câncer no homem e animais. (CULLEN et al., 2002).

O tempo para a carcinogênese ser completada é indeterminável, podendo ser necessários muitos anos para que se verifique o aparecimento do tumor. Teoricamente, a carcinogênese pode ser interrompida em qualquer uma das etapas, se o organismo for capaz

de reprimir a proliferação celular e de reparar o dano causado ao genoma (INCA, 2002). (Figura 9).

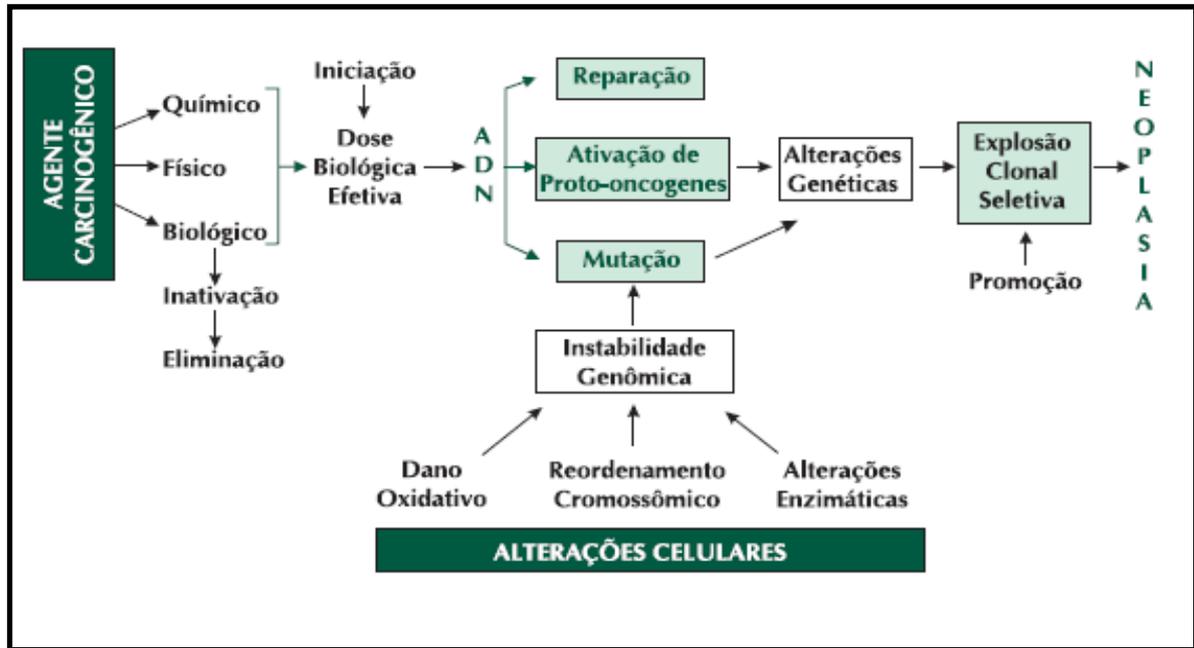


Figura 9 – Esquema simplificado de patogênese do câncer. **Fonte:** INCA, 2002.

Já está estabelecido que duas classes de genes reguladores normais, os protooncogenes promotores do crescimento e os genes supressores do crescimento canceroso (anti-oncogenes ou genes supressores tumorais) são os alvos principais do dano genético. Há uma crescente evidência de que uma terceira categoria de genes, os que controlam a morte celular programada, ou apoptose, também sejam importantes na carcinogênese (GOMES, 2008).

Os proto-oncogenes são transformados em oncogenes por duas grandes categorias de alterações: alterações na estrutura do gene, resultando na síntese de um produto gênico anormal tendo uma função aberrante e alterações na regulação da expressão gênica, resultando no aumento ou produção imprópria da proteína promotora de crescimento estruturalmente normal (ROBBINS et al, 1996).

Os produtos dos genes supressores de tumor freiam a proliferação celular. A função fisiológica destes genes é regular o crescimento da célula, e não impedir a formação de tumor. Em vista de a perda destes genes ser um evento importante em muitos tumores humanos (e talvez em todos), e como sua descoberta resultou do estudo dos tumores, o nome supressor de tumor ou anti-oncogene persiste (SEUNG et al., 2004).

Soma-se a estes sistemas de defesa a habilidade de comunicação intercelular, capaz de detectar células vizinhas defeituosas e induzir apoptose nestas células (TUBIANA, 2008).

2.5.1 Oncologia Experimental

A oncologia experimental é um ramo da oncologia que utiliza modelos experimentais para a realização de seus estudos (MATSUZAKI, 2004).

Na tentativa de se obter modelos experimentais que permitissem o estudo de neoplasias, vários tipos de tumores transplantáveis, utilizando animais de laboratório, foram desenvolvidos. Esses tumores têm permitido uma melhor compreensão da biologia tumoral, assim como o estudo dos efeitos de diversos agentes sobre a patogenia do processo (MATSUZAKI, 2004).

Muitos dos atuais conceitos a respeito do processo de carcinogênese em humanos são fortemente influenciados por modelos de desenvolvimento de câncer em camundongos. Em relação a esse processo, há semelhanças e diferenças entre humanos e esses animais (HAHN; WEINBERG, 2001; RANGARAJAN; WEINBERG, 2003). Apesar de haver diferenças, camundongos de laboratório representam uma ferramenta para o entendimento da complexa patogenia do câncer.

2.5.1.1 Carcinoma de Ehrlich

Em 1896, uma neoplasia originária de adenocarcinoma mamário espontâneo de camundongo fêmea, foi descrita por Paul Ehrlich, sendo denominada tumor de Ehrlich (TE) (EHLICH, 1906). Em 1932, Loewenthal e Jahn descreveram pela primeira vez que células obtidas do TE, quando implantadas na cavidade peritoneal de camundongos, eram capazes de crescer em suspensão em um fluído ascítico.

O TE apresenta rápido crescimento e comportamento muito agressivo. É capaz de crescer em todas as linhagens de camundongos (NASCIMENTO et al., 2006). Este tumor pode crescer na forma ascítica, quando as células tumorais são inoculadas intraperitonealmente, ou de forma sólida, mediante inoculação das células tumorais por via intramuscular ou subcutâneo (GUERRA, 1983).

O modelo de tumor sólido de Ehrlich tem como função a análise de efeitos antineoplásicos de diversos compostos. Com isso, a triagem de possíveis novas drogas

anticâncer torna-se mais eficaz devido à presença de um “sistema de modelos”, que é composto por diferentes formas tumorais, com a finalidade de selecionar o maior número possível de drogas com ação anti-neoplásica (SUGGITT et al., 2005).

2.5.1.2 Sarcoma 180

O Sarcoma 180 (S-180), também conhecido como tumor de Crocker, foi isolado de células de um tumor espontâneo localizado na região axilar de um camundongo Swiss macho (*Mus musculus*). O tumor foi descoberto em 1924 pelo Dr. W. H. Woglom no Laboratório Crocker nos Estados Unidos e é mantido por transplantes sucessivos desde então (ASSEF et al., 2002)

Inicialmente, este tumor foi caracterizado como sendo de origem epitelial, pois, em estudos com microscopia óptica e eletrônica, foram observados contatos intercelulares característicos de células de origem epitelial, indicando que se tratava de um carcinoma. No entanto, estudos posteriores verificaram que estas células não expressam laminina e desta forma não podem ter origem epitelial, sendo realmente classificado como sarcoma, pois provavelmente se originou de um tecido conjuntivo (OLIVEIRA-JÚNIOR, 2008).

O tumor invade músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos. Apesar de seu comportamento agressivo local, esta neoplasia não produz metástases (KURASHIGE; MITSUHASHI, 1982).

As células tumorais podem ser mantidas por meios de cultura celular (suspensão *in vitro*) ou por meio de inoculação em camundongos (repique *in vivo*). Nos animais, este tumor pode ser implantado de duas maneiras - células inoculadas na cavidade intraperitoneal se desenvolvem formando um tumor ascítico (“líquido”), enquanto células neoplásicas inoculadas subcutaneamente formam tumores sólidos (O’ PESSOA, 1992).



3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil fitoquímico, o efeito toxicológico e as atividades antimicrobianas e antitumorais do extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e identificar o material vegetal;
- Preparar o extrato etanólico bruto (EEB);
- Efetuar uma prospecção fitoquímica do extrato;
- Verificar a toxicidade aguda e os efeitos toxicológicos do EEB de *C. echinata* Lam. frente a camundongos albino Swiss *Mus musculus* e determinar a DL₅₀ por via oral e intraperitoneal;
- Avaliar o efeito inibitório do EEB de *C. echinata* Lam. sobre o crescimento de cepas bacterianas e fúngicas;
- Determinar o efeito da administração do EEB de *C. echinata* Lam. quanto à inibição de neoplasias malignas (Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180), em camundongos.



4 ARTIGO I

Artigo submetido à Revista Brasileira de Farmácia.

**Estudo fitoquímico preliminar e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico
bruto de *Caesalpinia echinata* Lam.**

Isla Vanessa Gomes Alves Bastos^{1*}, Grace Kelly Cordeiro da Silva¹, Guilherme Carvalho Ribeiro Rodrigues², Cybelly Marques de Melo³, Haroudo Satiro Xavier⁴ & Ivone Antonia de Souza⁵

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá, s/n, CEP: 50740-521, Recife-PE-Brasil.

²Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, s/n, CEP: 50670-901, Recife-PE-Brasil.

³Graduanda do Curso de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá, s/n, CEP: 50740-521, Recife-PE-Brasil.

⁴Docente do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá, s/n, CEP: 50740-521, Recife-PE-Brasil.

⁵Docente orientador do Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, s/n, CEP: 50670-901, Recife-PE-Brasil.

* E-mail do autor correspondente (Isla Vanessa Gomes Alves Bastos):
islabastos@yahoo.com.br; souzaivas@yahoo.com.br

RESUMO

Caesalpinia echinata Lam é uma espécie bastante estudada, na medicina popular é utilizada como adstringente e cicatrizante. Foi realizada uma prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada analítica para detectar os metabólitos secundários no extrato etanólico bruto (EEB) das flores de *C. echinata* Lam. Os resultados indicaram a presença de flavonóides, proantocianidinas condensadas, açúcares redutores, terpenos e esteróides. A dose letal 50% (DL₅₀) do EEB foi obtida com base em ensaios toxicológicos por via oral (v.o.) e intraperitoneal (v.i.p.) utilizando camundongos albinos Swiss. O estudo da toxicidade aguda apresentou uma DL₅₀ de 1.825 mg/Kg quando administrado por v.i.p., enquanto a v.o. não apresentou óbito até a dose de 5 g/Kg. Dos resultados obtidos verificou-se que o EEB de *C. echinata* mostrou toxicidade moderada quando utilizada por v.i.p., enquanto a administração por v.o. apresentou baixa toxicidade.

PALAVRAS-CHAVE: Plantas medicinais. Toxicologia. DL₅₀. *Caesalpinia echinata* Lam.

ABSTRACT

Phytochemical screening and evaluation of acute toxicity of crude ethanolic extract of *Caesalpinia echinata* Lam

Caesalpinia echinata Lam is a widely studied species, is used in folk medicine as an astringent and healing. Was performed a phytochemical screening by analytical thin layer chromatography to detect the secondary metabolites in crude ethanolic extract (EEB) from flowers of *C. echinata* Lam. The results of phytochemical screening indicated the presence of flavonoids, condensed proanthocyanidins, reducing sugars, terpenes and steroids. The 50% lethal dose (LD₅₀) of EEB was obtained based on toxicological tests orally (v.o.) and intraperitoneal (v.i.p.) using Swiss albino mice. The acute toxicity study showed an LD₅₀ of 1.825 mg / kg when administered by v.i.p., while v.o. showed no death to the dose of 5 g / kg. The results obtained it was found that the EEB *C. echinata* showed moderate toxicity when used by v.i.p., while v.o. administration showed low toxicity.

KEYWORDS: Medicinal plants. Toxicology. LD₅₀. *Caesalpinia echinata* Lam.

INTRODUÇÃO

Atualmente várias enfermidades têm sido tratadas por meio da utilização de plantas medicinais. No entanto, o uso popular, e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar eticamente este recurso natural como medicamentos eficazes e seguros. (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006; AGRA et al., 2008).

Estudos toxicológicos têm a finalidade de avaliar a idéia de que plantas medicinais, por serem naturais, são isentas de efeitos tóxicos ou adversos. É fundamental, porém o estabelecimento da segurança, eficácia e garantia na qualidade das preparações com esses vegetais, como também o conhecimento prévio da composição química para a confirmação da presença dos princípios ativos (CRAVEIRO et al., 2008; MARLIÉRE et al., 2008; VENDRUSCOLO et al., 2005).

O ensaio para determinar a toxicidade aguda é definido como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período de 24 horas após a administração de uma única dose ou de doses múltiplas. A toxicidade aguda tem por objetivo determinar as reações adversas em curto

prazo após a administração de um composto, bem como o binômio dose-efeito letal (BARROS & DAVINO, 2003).

Caesalpinia echinata Lam (Fabaceae, Caesalpinoideae) é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica, explorada ostensivamente desde o descobrimento do Brasil e possui importância cultural, econômica e ambiental. A medicina popular atribui a este vegetal algumas propriedades farmacológicas, sendo o extrato de seu lenho utilizado como adstringente, cicatrizante, odontoálgico e tônico (XAVIER, 1995; SILVA 2001).

O gênero *Caesalpinia* é bastante estudado em todo o mundo, porém a avaliação do potencial tóxico das flores de *C. echinata* Lam é escasso. Logo, esse estudo avaliou o perfil fitoquímico e as propriedades tóxicas através da determinação da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam. por via oral e intraperitoneal.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico e obtenção da matéria-prima

Amostras das flores de *C. echinata* foram coletadas no Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/ PE, Brasil e posteriormente identificadas pela botânica Dr^a Marlene Barbosa. Uma exsicata foi depositada no Herbário UFP – Geraldo Mariz da UFPE, sob o número 63.023. O material (1.104 g) foi pesado em balança eletrônica semi-analítica (modelo BG 400, Gehaka®).

Preparação e concentração do extrato etanólico bruto das flores

O material botânico utilizado foi constituído pelas flores de *C. echinata* Lam. sob a forma de extrato etanólico (EE) a 100%, obtido após maceração, concentrado em evaporador rotativo (TE 120, Tecnal®, Brasil) acoplado a bomba a vácuo sob temperatura constante de 45-50°C para eliminação do solvente orgânico e obtenção do extrato bruto.

Abordagem Fitoquímica

Para a execução dos ensaios fitoquímicos cerca de 5 g de flores foram submetidas á infusão metanólica durante 30 minutos. Alíquotas deste extrato (10 µL) foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), empregando-se como fase estacionária placas cromatográficas de gel de sílica (Merck-Alemanha, art. 105554). As fases móveis e

reveladores foram selecionados de acordo com o grupo de moléculas a ser pesquisado com base nos estudos de HARBONE (1998) e WAGNER (1996).

Esta prospecção fitoquímica coloca em evidência os principais tipos de metabólitos secundários: alcalóides, açúcares redutores, polifenóis (cumarinas, derivados cinâmicos, fenilpropanoglicosídeos, flavonóides, proantocianidinas condensadas, leucoantocianidinas, ácido gálico), terpenóides (monoterpenóides, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, esteróides, iridóides e saponinas).

Toxicidade aguda do extrato e determinação da DL₅₀

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (protocolo número 23076.011798/2010-17). O trabalho experimental foi desenvolvido no Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE a partir da seleção de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) machos, com pesos e idade aproximados, divididos em grupos de seis animais cada previamente marcados e pesados. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em condições controladas de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro) e temperatura de 22 ± 2 °C, com alimentação suspensa 12 horas antes do ensaio e liberação de água *ad libitum*. O extrato etanólico bruto (EEB) foi pesado e dissolvido em solução fisiológica 0,9% de NaCl (p/v). O ensaio foi realizado pela via de administração intraperitoneal e oral. A avaliação da toxicidade aguda e determinação da DL₅₀ foram realizadas de acordo com a metodologia preconizada por Karber & Behrens (1964) efetuada em duas fases, uma preliminar e uma definitiva. Na fase preliminar foram administradas doses crescentes do EEB de *C. echinata* Lam para definir a D₁ (maior dose de sobrevivência) e D₂ (menor dose capaz de determinar 100% de letalidade dos animais). Os dados obtidos na fase preliminar delinearão a fase definitiva. Os animais receberam doses entre D₁ e D₂ seguindo a progressão geométrica de razão 1,2 com determinação da DL₅₀ (Dose letal para 50% dos roedores), todos permaneceram em observação durante 48 horas. Os parâmetros observados pelas vias de administração foram às diversas reações comportamentais como: deambulação, alterações da frequência respiratória, diurese, óbitos, entre outros. O cálculo da DL₅₀ foi obtido com a seguinte fórmula:

Onde:

$$DL_{50} = DF - \frac{\sum(A.B)}{n}$$

DF = dose mínima capaz de matar todos os animais

A = diferença entre duas doses consecutivas

B = número de animais mortos entre duas doses consecutivas

n = número total de animais por lote

A classificação da toxicidade relativa dos agentes químicos de acordo com a DL_{50} seguiu a proposta de Schuartsman (1980) grau 6 ($DL_{50} < 5 \text{ mg Kg}^{-1}$) = supertóxico; grau 5 ($DL_{50} = 5-50 \text{ mg Kg}^{-1}$) = extremamente tóxico; grau 4 ($DL_{50} = 50-500 \text{ mg Kg}^{-1}$) = muito tóxico; grau 3 ($DL_{50} = 0,5-5 \text{ g Kg}^{-1}$) = moderadamente tóxico; grau 2 ($DL_{50} = 5-15 \text{ g Kg}^{-1}$) = pouco tóxico; grau 1 ($DL_{50} > 15 \text{ g Kg}^{-1}$) = praticamente atóxico.

RESULTADOS

Conforme demonstrado na tabela 1, a abordagem fitoquímica da espécie *C. echinata* Lam. realizada com extrato metanólico bruto (EMB) das flores do vegetal, indicou a presença de flavonóides, proantocianidinas condensadas, açúcares redutores, triterpenos e esteróides.

Tabela 1: Metabólitos encontrados no extrato metanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam.

Classe de Metabólitos	Extrato bruto
Alcalóides	-
Cumarinas	-
Derivados Cinâmicos	-
Fenilpropanoglicosídeos	-
Flavonóides	+
Proantocianidinas condensadas	+
Monoterpenóides, Sesquiterpenóides e Diterpenóides	-
Triterpenos e Esteróides	+
Iridóides	-
Saponinas	-
Açúcares redutores	+

+ Presença; - Ausência

Na fase preliminar, do teste de toxicidade aguda por via intraperitoneal, foram administradas doses variadas onde determinou-se a D_1 (dose máxima isenta de mortalidade) de 1.000 mg/Kg e D_2 (dose mínima capaz de levar a óbito 100% dos animais) de 2.160 mg/Kg.

Os sinais de toxicidade da fase definitiva foram observados após administração do EEB de *C. echinata* Lam. que apresentaram efeitos estimulantes como reações de fuga, movimentos circulares, saltos, movimentos estereotipado, ereção de cauda, movimentos de vibrissas, tremores finos/grosseiros, expansão e movimentação do pavilhão auricular.

Após o período de estimulação foi verificado uma diminuição desses sinais ativos em todas as doses (1.000, 1.200, 1.650, 2.160) tais como abaixamento dos membros posteriores, acomodação e agrupamento.

Além desses foram observados efeitos sobre o trato gastrointestinal como: distensão abdominal, contorções e aumento da excreção fecal. Piloereção, diurese, espasmos, palidez, refluxos e edema de focinho foram verificados em grande parte dos animais de cada grupo. Esses efeitos periféricos se acentuaram nas doses mais elevadas.

A taxa de mortalidade do extrato etanólico de *C. echinata* cresceu progressivamente com o aumento da dose como demonstrado na curva dose-resposta (Gráfico 1). A taxa de mortalidade de 0% com 1.000 mg/kg elevou-se gradualmente para 100% com 2.160 mg/kg. A partir dos dados encontrados, foi calculada a DL_{50} , que resultou em 1.825 mg/kg de peso corpóreo do animal.

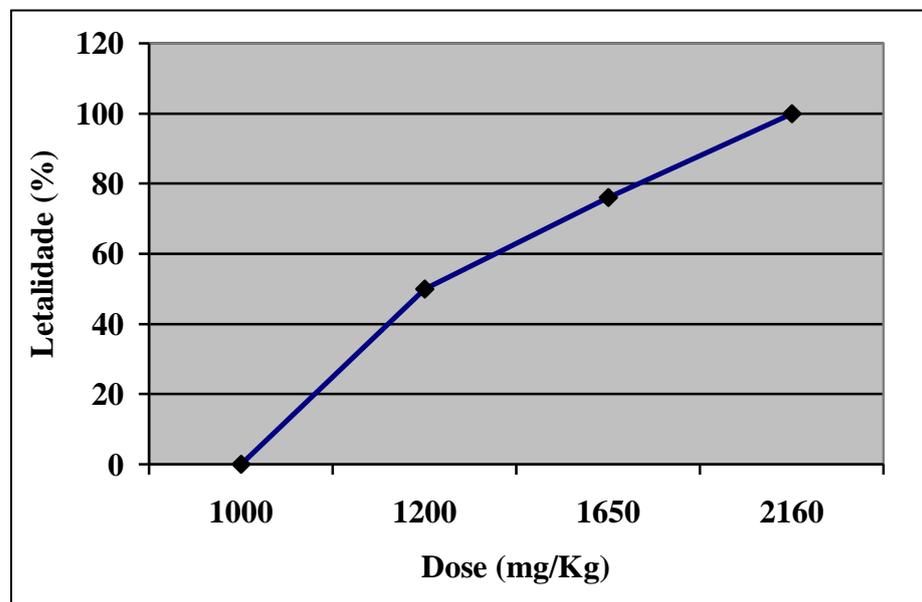


Gráfico 1- Curva Dose-Resposta da toxicidade aguda por via intraperitoneal do extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam.

A análise da toxicidade aguda por via oral demonstrou ação estimulante em todas as doses (2.000, 4.000 e 5.000 mg./Kg). Os animais apresentaram sinais de intensa agitação,

reações de fuga, sibilo, movimentos circulares, tremores finos/grosseiros, movimentos estereotipados, postura em garra, aumento da frequência respiratória, movimentos de vibrissas, expansão do pavilhão auricular e ereção de cauda.

Efeitos depressores também foram visualizados nas doses estudadas tais como prostração e abaixamento do trem posterior. Além destes, outros sinais comportamentais como refluxo, espasmos, petéquias, excreção fecal, piloereção, diurese e coceira foram detectados.

Não foi verificada letalidade nos animais com a dose mais elevada (5.000 mg/kg).

DISCUSSÃO

O conhecimento da composição química das plantas aplicado na medicina popular envolve o estudo de interações do organismo com os efeitos das inúmeras classes de compostos e moléculas que podem existir numa única planta. Esse conhecimento permite identificar a espécie vegetal, conjuntamente com ensaios de atividade biológica, de modo que se podem caracterizar mais facilmente as frações ou substâncias bioativas (TOLEDO et al., 2003).

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

Silva (2006) realizou uma abordagem fitoquímica do extrato etanólico bruto do cerne de *C. echinata* Lam, indicando marcante presença de flavonóides. Cumarinas e taninos catéquicos estiveram presentes em pequenas quantidades.

A partir do perfil fitoquímico foi possível identificar metabólitos secundários de interesse farmacológico presente no extrato em estudo. A presença de flavonóides na caracterização química do EEB das flores está de acordo com a literatura, que relata a presença deste composto como o metabólito mais observado em espécies do gênero *Caesalpinia* (REZENDE et al., 2004).

As reações comportamentais observadas após administração do EEB das flores de *C. echinata* Lam. tanto por via oral quanto por via intraperitoneal, são sugestivas de substâncias que alteram o equilíbrio entre as vias inibitória e excitatórias do Sistema Nervoso Central (SNC), visto que foi observado um período inicial de estimulação seguido por uma fase depressiva (SILVA, 2006). Inicialmente os efeitos estimulantes observados devem-se a presença de compostos que promovem a liberação dos neurotransmissores excitatórios e/ou

inibição da recaptação desses. A inibição da recaptação aumenta a concentração dos neurotransmissores em contato com os receptores, o que leva ao aumento da atividade do circuito neuronal. Os sinais depressores, embora poucos evidentes sugerem fadiga neuronal que ocorre normalmente após uma intensa fase excitatória, ou através da metabolização do(s) princípios ativos da planta ter resultado em algum composto que promova a estimulação direta de neurotransmissores inibitórios, ou ainda pelo esgotamento parcial dos neurotransmissores excitatórios (BLOOM, 2006; SILVA, 2002).

De acordo com a DL₅₀, baseados na classificação de Schuartsman (1980) o extrato etanólico das flores de *C. echinata* Lam. quando administrado por via intraperitoneal, pode ser considerado moderadamente tóxico. Na avaliação da DL₅₀ por via oral, não verificamos óbito até a dose limite de 5.000 mg/kg, indicando que quando administrado por esta via o extrato bruto apresenta baixa toxicidade. Resultados semelhantes foram descritos por Silva (2006), utilizando o extrato etanólico bruto do cerne de *C. echinata* cujo valor da DL₅₀ por via intraperitoneal foi de 995,57 mg/kg e por via oral foi atóxica até a dose de 4.000 mg/Kg.

Esta ausência de letalidade pode estar relacionada aos mecanismos farmacocinéticos de absorção no trato intestinal como pH, superfície de absorção, motilidade intestinal, irrigação sanguínea (KLAASSEN & WATKINS, 2001) e/ou por biotransformação, que possivelmente diminuíram os níveis séricos necessários para provocar efeito letal nos indivíduos, no entanto sinais clínicos de toxicidade foram observados (SILVA, 2006).

CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico preliminar do extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam. demonstrou a presença de flavonóides, proantocianidinas condensadas, açúcares redutores, triterpenos e esteróides.

Baseado nos resultados obtidos da experimentação animal, o extrato etanólico bruto apresentou toxicidade moderada quando utilizado por via intraperitoneal. Em relação à administração oral o referido extrato apresentou baixa toxicidade. Esses dados nos fornecem um parâmetro para o estabelecimento de uma margem terapêutica segura, embora outros estudos sejam necessários para o estabelecimento da sua eficácia sem o acometimento de efeitos colaterais, principalmente após a exposição repetida com outras doses.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D. et al. **Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil**. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18(3): 472-508, 2008.
- BARROS, S.B. & DAVINO, S.C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO, M.M.A. & BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de toxicologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 696 p.
- BLOOM, F.E. Drogas que atuam no Sistema Nervoso Central. In: GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 8 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. 2006. 1.436 p.
- CRAVEIRO, A.C.S.; CARVALHO, D.M.M.; NUNES, R.S. et al. **Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais**. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18(Supl.): 739-743, 2008.
- HARBONE, J.B. **Phytochemical methods**. 3 ed. London: Chapman & Hall, 1998. 228 p.
- KARBER, G. & BEHRENS, B. **Statistical methods in biological assay**. 2 ed. London: Charles Griffin, 1964. 219 p.
- KLAASSEN, C.D. & WATKINS III, J.B. Absorção, distribuição e excreção dos tóxicos. In: _____. **Toxicologia: a ciência básica dos tóxicos de Casarett e Doull**. 5 ed. Lisboa: McGraw- Hill, 2001. p.79-100.
- LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F. et al. **A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil**. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 199-206. 2005.
- MARLIÉRE, L.D.P.; RIBEIRO, A.Q.; BRANDÃO, M.G.L. et al. **Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil**. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18(Supl.): 754-760, 2008.
- REZENDE, C.M.; CORRÊA, V.F.S. & COSTA, A.V.M. **Constituintes Químicos Voláteis das Flores e Folhas do Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata*, Lam.)**. *Química Nova* 27(3): 414-416, 2004.

SILVA, R.C. **Plantas medicinais na saúde bucal**. Vitória: Artgraf, 2001. 136 p

SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002. 334 p.

SILVA, E.C.B. **Avaliação biológica da *Caesalpinia echinata* Lam. Fabaceae-Caesalpinioideae. Usos e riscos**. 2006. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SCHUARTSMAN, S. **Produtos químicos de uso domiciliar segurança e riscos toxicológicos**. São Paulo: Almed, 1980. 92 p.

TOLEDO, A.C.O.; HIRATA, L.L.; BUFFON, M.C.M. et al. **Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica**. *Revista Lecta* 21(1): 7-13, 2003.

TUROLLA, M.S.R. & NASCIMENTO, E.S. **Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 42(2): 189-306, 2006.

VENDRUSCOLO, G.S.; RATES, S.M.K. & MENTZ, L.A. **Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul**. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 15 (4): 361-372, 2005.

WAGNER, H. & BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2 ed. Berlin: Springer Verlag, 1996. 384 p.

XAVIER, M.N.; RAMOS, I.N.C. & XAVIER, L.F. **A Fitoterapia no Combate as Afecções Bucais**. João Pessoa: Idéia. 1995. 101 p.



5 ARTIGO II

Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

Atividade antimicrobiana do extrato de *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae)

BASTOS, I.V.G.A.^{1*}; ARAUJO, R.O.²; SENA, K.X.F.R.²; SARAIVA, I.
PSCIOTTANO, M.N.C.¹; SOUZA, I.A.²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Arthur de Sá, s/n, CEP: 50740-521, Recife-Brasil
*islabastos@yahoo.com.br ²Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Arthur de Sá, s/n, CEP: 50740-521, Recife-Brasil.

RESUMO: *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae) é uma árvore nativa da Mata Atlântica. A medicina popular atribui a este vegetal algumas propriedades farmacológicas, sendo o extrato de seu lenho utilizado como: adstringente, cicatrizante, odontoálgico e tônico. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* contra bactérias Gram-positivas, Gram negativas e o fungo *Candida albicans*, através da técnica de difusão em ágar. O extrato apresentou melhores halos de inibição na técnica do poço frente às espécies *Staphylococcus aureus* (19 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (18 mm), *Staphylococcus coagulase negativo* (18 mm), *Escherichia coli* (16 mm) e *Enterococcus faecalis* (17 mm), enquanto que no teste do disco de papel o extrato foi eficaz contra *Mycobacterium smegmatis* (26 mm). Nas condições desse estudo, os resultados mostraram promissora atividade antibacteriana do extrato testado, confirmando relatos na literatura que sugerem e afirmam a ação antimicrobiana desta planta.

Palavras-chave: fitoterapia, antimicrobiano, *Caesalpinia echinata* Lam.

Antimicrobial activity of the extract of *Caesalpinia echinata* Lam (Fabaceae)

ABSTRACT: *Caesalpinia echinata* Lam (Fabaceae) is a tree native to the Atlantic. The popular medicine attributes to this vegetable some pharmacological properties, being the extract of it's used as: adstringent, healing, analgesic and tonic. The aim of this work was to evaluate *in vitro* the antimicrobial activity of crude ethanol extract from *C. echinata* flowers against Gram-positive bacteria, Gram negative and the fungus *Candida albicans*, using agar diffusion technique. The extract showed better inhibition zones in the technique of the well opposite the species *Staphylococcus aureus* (19 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (18 mm),

Staphylococcus coagulase negativo (18 mm), *Escherichia coli* (16 mm) and *Enterococcus faecalis* (17 mm) where as in the disk test paper the extract was effective against *Mycobacterium smegmatis* (26 mm). In this study, the results showed promising antibacterial activity of the extracts tested, confirming previous studies that suggest the antimicrobial action and claim this plant.

Key words: phytotherapy, antimicrobial, *Caesalpinia echinata* Lam.

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre plantas sempre tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. A humanidade utiliza as plantas com finalidade terapêutica, enquanto buscava alimentação para a sua sobrevivência foi descobrindo as propriedades tóxicas ou curativas dos vegetais (Martins, 2000).

Tem-se verificado cientificamente o uso popular de plantas com a finalidade de obter os mais variados efeitos medicamentosos, incluindo sua aplicação como antimicrobianos (Koo et al., 2003; Burt, 2004).

Apesar da grande diversidade de antimicrobianos que agem sobre diversos microrganismos, as investigações avançam em busca de um antimicrobiano ideal, ou seja, aquele que apresenta maior espectro de ação, sem toxicidade, baixo custo e menor indício de resistência bacteriana (Nascimento et al., 2000; Pazhani, 2004).

Em razão ao grande aumento da resistência de microrganismos à múltiplas drogas e devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos surge a preocupação para o desenvolvimento de substâncias específicas que sejam capazes de combater as estratégias de adaptação que esses organismos elaboram (Oliveira et al., 2007).

Nos últimos anos, o uso de extratos e componentes químicos vegetais ambos com propriedades antimicrobianas vêm contribuindo com resultados satisfatórios nas aplicações terapêuticas (Albuquerque & Hanazaki, 2006; Silva et al., 2008).

Caesalpinia echinata Lam. é uma árvore da família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae, nativa da floresta pluvial atlântica (Giudice-Neto et al., 2004). Desde sua descoberta o vegetal tem sido intensamente explorado devido à qualidade de sua madeira, por apresentar propriedades acústicas (Matsunaga et al., 2000) e, especialmente, devido à extração do pigmento brasilina (Cardoso et al., 1998). O uso deste vegetal na medicina popular é

bastante restrito. Segundo Xavier (1995) e Silva (2001) o lenho costuma ser utilizado como adstringente, corroborante e secante.

Embora na literatura haja poucos relatos sobre sua atuação como agente antibacteriano, várias substâncias com esta atividade têm sido descritas em espécies do gênero *Caesalpinia*. No Brasil seu uso não é bem difundido, diferente do que ocorre em outras partes do mundo onde já se conhece há bastante tempo suas atividades e emprego no uso medicinal (Kim et al., 2004).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antimicrobiano *in vitro* do extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam. frente à cultura de algumas bactérias e o fungo *Candida albicans*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico e obtenção da matéria-prima

Amostras das flores de *C. echinata* foram coletadas no Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/ PE, Brasil e posteriormente identificadas pela botânica Dr^a Marlene Barbosa. Uma exsicata foi depositada no Herbário UFP – Geraldo Mariz da UFPE, sob o número 63.023. O material (1.104 g) foi pesado em balança eletrônica semi-analítica (modelo BG 400, Gehaka®).

Preparação e concentração do extrato etanólico bruto das flores

O material botânico utilizado foi constituído pelas flores de *C. echinata* Lam. sob a forma de extrato etanólico (EE) a 100%, obtido após maceração, concentrado em evaporador rotativo (TE 120, Tecnal®, Brasil) acoplado a bomba a vácuo sob temperatura constante de 45-50°C para eliminação do solvente orgânico e obtenção do extrato bruto.

Atividade Antimicrobiana

Cepas bacterianas

Foram utilizados neste estudo, linhagens bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativo*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* que pertencem à coleção de microrganismos do

Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE (Tabela 1).

Preparação dos inóculos

As culturas bacterianas inoculadas em Ágar Muller-Hinton após 24 horas de incubação a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ foram suspensas em 5 ml solução fisiológica estéril e comparadas as turvações do tubo 0,5 da escala McFarland ($10^8\text{ UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$) (NCCLS, 2003).

TABELA 1. Relação dos microrganismos utilizados no teste de difusão em ágar.

Código	Cepa	Origem
AM 103	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
AM 642	<i>Staphylococcus aureus</i>	Secreção
AM 789	<i>Staphylococcus coagulase</i>	
AM 245	<i>negativo</i>	Secreção de Cateter
AM 997	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina
AM 1056	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299
AM 428	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sangue
AM 206	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 14502
AM 247	<i>Escherichia coli</i>	-
AM 1050	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218
AM 342	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Secreção
AM 379	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Secr. ferida cirúrgica

ATCC (American Type Culture Collection). AM (Coleção de culturas microbianas do Laboratório de Análises Microbiológicas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE).

Técnica de difusão em poços

O semeio dos inóculos foi realizado com swab de algodão estéril na superfície da placa de Petri contendo 20 ml de Ágar Muller-Hinton, procedendo subsequente à perfuração asséptica dos poços com um dispositivo contendo cilindros metálicos esterilizados de 6,0 mm de diâmetro. A seguir, os poços foram completamente preenchidos com auxílio de pipeta automática na razão de 100 μL do extrato etanólico bruto (EEB) das flores de *C. echinata* utilizando intervalos de 12,5 mg/ml a 100 mg/ml (fator 2), além do antibiótico Gentamicina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e o controle negativo DMSO (dimetilsufóxido) à 30%. Em seguida foi colocado papel de filtro esterilizado na tampa de cada placa para reter a água de condensação. As placas foram incubadas à $37\text{ °C} \pm 1$ por 24 horas. As medidas dos halos de inibição e seus resultados foram avaliados conforme os seguintes parâmetros: halos $< 9\text{ mm}$, inativo; 9-12 mm, pouco ativo; 13-18 mm, ativo; $> 18\text{ mm}$, muito ativo (ALVES, 2000).

Teste de difusão em disco de papel

A atividade antimicrobiana do EEB das flores de *C. echinata* foi avaliada também pelo método de difusão em disco de papel (Bauer, 1966). O extrato foi testado frente a bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), *Micrococcus luteus* (UFPEDA 06), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16) e *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138); Gram-negativas: *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Serratia marcescens* (UFPEDA 398) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39); álcool-ácido-resistente: *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71) e a levedura *Candida albicans* (UFPEDA 1007), obtidas da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os microrganismos teste foram padronizados pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland em solução fisiológica, que corresponde a uma concentração de aproximadamente 10^7 UFC/mL para fungos e 10^8 UFC/mL para bactérias.

As bactérias foram inoculadas em Ágar Mueller Hinton (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. marcescens*) e em glicose extrato de levedura (*E. faecalis* e *M. smegmatis*). Para a inoculação do fungo *C. albicans* foi utilizado o meio Sabouraud. Sobre a superfície do meio, semeado com as suspensões microbianas foram colocados discos de papel xarope estéreis, de 6 mm de diâmetro, impregnados com 10 µL da solução do EEB de modo que cada disco ficou na concentração de 2.000 µg/mL. As placas foram incubadas entre 24 h e 48 h à temperatura de 37 °C. Após este período foi realizada a leitura dos resultados, pela medição do diâmetro do halo de inibição formado em volta do disco. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição em mm e calculado o desvio padrão. Os antibióticos ampicilina, kanamicina e cetoconazol foram utilizados no teste como padrões, nas concentrações de 10 µg/disco, 30 µg/disco e 300 µg/disco, respectivamente. Halos iguais e superiores a 10 mm foram considerados significativos de atividade antibiótica (Awadh Ali et al., 2001; Bakshu et al., 2001; Khan et al., 2001; Chowdhury et al., 2002; Nascimento et al., 2007).

RESULTADO E DISCUSSÃO

O uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos tem proporcionado o surgimento de resistência dos microrganismos aos fármacos de uso corrente e, como consequência, a necessidade de se pesquisar novos produtos que possam substituir aqueles que já não têm eficácia (Masurani & Tavares, 2007).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é considerada como um problema inerente à terapia antimicrobiana, por este motivo é preciso sempre buscar novas fontes terapêuticas. Testar produtos naturais pode ser uma medida alternativa importante para ajudar a resolver esse problema de resistência (Silva et al., 2010).

O extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* apresentou atividade antibacteriana contra bactéria Gram positivas (*S. aureus*, *S. coagulase negativo* e *E. faecalis*) e Gram negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*) pelo método de difusão em poços (Tabela 2).

TABELA 2. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam. através do método de difusão em poços.

Linhasgens Bacterianas	Extrato de <i>C. echinata</i> (mg/mL)				Gentamicina (µg/mL)	DMSO
	100	50	25	12.5	100	(30%)
<i>Staphylococcus aureus</i> (AM 103)	19	16	13	11	32	–
<i>Staphylococcus aureus</i> (AM 642)	18	16	13	11	28	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AM 428)	18	13	–	–	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AM 206)	14	11	–	–	20	–
<i>Klebsiela pneumoniae</i> (AM 379)	–	–	–	–	20	–
<i>Klebsiela pneumoniae</i> (AM 342)	–	–	–	–	19	–
<i>Staphylococcus coagulase negativo</i> (AM 245)	18	15	13	11	28	–
<i>Staphylococcus coagulase negativo</i> (AM 789)	18	16	13	11	34	–
<i>Escherichia coli</i> (AM 1050)	16	13	10	–	20	–
<i>Escherichia coli</i> (AM 247)	18	15	13	11	22	–
<i>Enterococcus faecali</i> (AM 1056)	18	15	12	10	–	–
<i>Enterococcus faecalis</i> (AM 997)	17	14	12	10	13	–

Halos de inibição (mm). Os traços (–) indicam ausência de halo de inibição. ATCC (American Type Culture Collection). AM (Coleção de culturas microbianas do Laboratório de Análises Microbiológicas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE. DMSO (dimetilsufóxido).

Segundo Alves (2000), halos de inibição com diâmetros menores que 9 mm são considerados inativos, esses resultados não foram observados neste trabalho com exceção para *K. pneumoniae* que não apresentou atividade em nenhuma concentração testada.

Por outro lado, halos com diâmetros entre 9-12 mm são pouco ativos, com 13-18 mm são ativos e maiores que 18 mm são muito ativos. Os resultados obtidos enquadram-se na categoria ativos quando a concentração de 100 mg/mL é considerado, com exceção da bactéria *S. aureus* cujo halo de inibição foi de 19 mm (muito ativo). Observou-se uma diminuição nos tamanhos dos halos quando a concentração do extrato é reduzida, não sendo eficaz contra *P. aeruginosa* a partir de 25 mg/mL e *E. coli* em 12,5 mg/mL.

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a atividade antimicrobiana das flores dessa espécie, mas existem alguns estudos sobre os ramos e cerne. Freire (2004) demonstrou que o extrato etanólico dos ramos de *C. echinata* teve ação contra bactérias, em especial as Gram-negativas como *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *E. coli*, e *Bacillus cereus*. Por outro lado, os resultados encontrados por Silva (2006) diferem do autor citado. O extrato etanólico do cerne de *C. echinata* mostrou-se totalmente inativo contra as espécies bacterianas utilizadas *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*.

A gentamicina é um antimicrobiano utilizado no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas (Skopnik, 1991). Os resultados desta pesquisa indicaram essa atividade. Porém observa-se na Tabela 2 que esse fármaco utilizado como padrão, não foi capaz de produzir halos de inibição contra a cepa de *P. aeruginosa* (AM 428) e de *E. faecalis* (AM 1056) diferente do extrato utilizado que formou halos de 18 mm na concentração de 100 mg/mL para as duas espécies de bactérias.

O solvente DMSO utilizado como controle negativo não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana frente a qualquer microrganismo testado, demonstrando a efetividade do ensaio.

Na Tabela 3, encontram-se os dados referentes ao teste de difusão em disco de papel. O extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* formou halos de inibição (26 ± 1 mm) apenas para a bactéria *M. smegmatus*. Embora tenham sido usadas algumas espécies de bactérias semelhantes (*S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*) ao ensaio de difusão em poços.

Das técnicas utilizadas para determinação da atividade antimicrobiana, o teste de difusão em poços apesar de empregar volumes maiores (100 µl) (Caetano, 2002), em relação aos empregados nos discos de papel (10 µl) (Voravuthikunchai, 2005), tem a vantagem de

propiciar maior facilidade de contato entre o extrato e os microrganismos testados, permitindo assim, uma difusão tanto radial como de superfície.

TABELA 3. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam. através do teste de difusão em disco de papel.

Linhasgens Bacterianas	Extrato de <i>C. echinata</i> (2.000 µg/disco)	Kanamicina (30 µg/disco)	Ampicilina (10 µg/disco)	Cetoconazol (300 µg/disco)
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA 01)	–	21 ± 0,5	–	–
<i>Micrococcus luteus</i> (UFPEDA 06)	–	33 ± 0,5	–	–
<i>Bacillus subtilis</i> (UFPEDA 16)	–	34 ± 0,5	–	–
<i>Enterococcus faecalis</i> (UFPEDA138)	–	–	37 ± 0,5	–
<i>Escherichia coli</i> (UFPEDA 224)	–	25 ± 0,5	–	–
<i>Serratia marcescens</i> (UFPEDA 398)	–	24 ± 0,5	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 39)	–	21 ± 1,0	–	–
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (UFPADA 71)	26 ± 1,0	33 ± 0,5	–	–
<i>Candida albicans</i> (UFPEDA 1007)	–	–	–	44 ± 1,0

Halos de inibição (mm). Os traços (–) indicam ausência de halo de inibição. UFPEDA (Coleção de culturas microbianas do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Outra explicação está relacionada à dificuldade de difusão do extrato no meio de cultura. Bandeira et al. (1999) observou que a difusão de produtos naturais pode estar relacionada à sua hidrossolubilidade e a sua massa molecular.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas condições deste estudo mostram que o extrato bruto das flores de *C. echinata* possui potencial antimicrobiano sobre bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. coagulase negativo* e *E. faecalis*) e Gram negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*). Quando comparados os dados da atividade antibacteriana do extrato utilizando a técnica de difusão em poço e o teste em disco de papel, foi observada uma discordância entre as duas técnicas analisadas, sendo que a primeira demonstrou melhores halos de inibição, frente às bactérias testadas.

Este trabalho serve de subsídio a futuros experimentos que visem elucidar as substâncias ativas deste extrato bem como seu mecanismo de ação e atividade antimicrobiana frente a outros microrganismos.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, supl., p.678-89, 2006.
- ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.3, p.367-73, 2000.
- AWADH, A.; JULICH, W.D.; KUSNICK, C.; LINDEQUIST, U. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.173-9, 2001.
- BAKSHU, L.M.D.; RAM, A.J.; RAJU, R.R.V. Antimicrobial activity of *Securinega leucopyrus*. **Fitoterapia**, v.72, p.930-3, 2001.
- BANDEIRA, M.F.C.L.; OLIVEIRA, M.R.B.; PIZZOLITO, A.C.; BENATTI-NETO, C.; JORGE-NETO, J. Estudo farmacológico preliminar de *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba). **Jornal Brasileiro de Clínica & Estética em Odontologia**, v.3, p.39-41, 1999.

BAUER, A.W.; PERRY, M.B.; KIRBY, W.M.M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-6, 1966.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-53, 2004.

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M.C.B.; MAIA, M.B.S. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, supl., p.132-5, 2002.

CARDOSO, M.A.; PROVAN, J.; POWELL, W.; FERREIRA, P.C.G.; OLIVEIRA, D.E. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Molecular Ecology**, v.7, p.601-8, 1998.

CHOWDHURY, D.; SAYEED, A.; ISLAM, A.; BHUIYAN, M.S.A.; KHAN, G.R.M.A.M. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Aerva lanata*. **Fitoterapia**, v.73, p.92-4, 2002.

FREIRE, M.L.L.B. **Avaliação da atividade antitumoral e antibacteriana do extrato etanólico da *Caesalpinia echinata* Lam.** 2004. 25p. Monografia (Conclusão de Curso) – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

GIUDICE-NETO, J.D.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y. Herança e ligação em locos isoenzimáticos de *Caesalpinia echinata* L. (Pau-brasil). **Revista do Instituto Flor**, v.16, n.2, p.101-10, 2004.

KHAN, M.R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A.D. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchensis*. **Fitoterapia**, v.72, p.825-8, 2001.

KIM, K.J.; YU, H.H.; JEONG, S.; CHA, J.D.; KIM, S.M.; YOU, Y.O. Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p.81-7, 2004.

KOO, H.; HAYACIBARA, M.F.; SCHOBEL, B.D.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; PARK, Y.K.; VACCA-SMITH, A.M.; BOWEN, W.H. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm

accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.782-9, 2003.

MASURANI, A.; TAVARES, L.C. Estudos de QSAR-3D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade frente a *Staphylococcus aureus* multi-resistente. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.2, p.101-16, 2007.

MATSUNAGA, M., SAKAI, K.; KAMITAKAHARA, H.; MINATO, K.; NAKATSUBO, F. Vibrational property changes of spruce wood by impregnation with water-soluble extractives of pernambuco (*Guilandina echinata* Spreng.). **Journal of Wood Science**, v.45, n.3, p.470-74, 2000.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E.. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2000. 220 p.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p. 247-56, 2000.

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, P.O.; BARBOSA, J.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.108-13, 2007.

NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão**, Norma M2-A8, 8.ed. v.23, n.1, p.1-54, 2003.

OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; VIEIRA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V.N.; LIMA, I.O.; SILVA-FILHO, R.N. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti- *Candida* activity of some clinically used antifungals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.186- 90, 2007.

PAZHANI, G.P.; SARKAR, B.; RAMAMURTHY, T.; BHATTACHARYA, S.K.; TAKEDA, Y.; NIYOGI, S.K. Clonal multidrug-resistant *Shigella dysenteriae* Type 1 strains

associated with epidemic and sporadic dysenteries in Eastern India. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.2, p.681-4, 2004.

SKOPNIK, H.; WALLRAF, R.; NIES, B.; TRÖSTER, K.; HEIMANN, G. Pharmacokinetics and antibacterial activity of daily gentamicin. **Archives of Disease in Childhood**, v.67, p.57-67, 1991.

SILVA, R. C. **Plantas medicinais na saúde bucal**. Vitória: Artgraf, 2001. 136p.

SILVA, E.C.B. **Avaliação Biológica da *Caesalpinia echinata* Lam. Fabaceae-Caesalpinioideae. Usos e riscos**. 2006. 116p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SILVA, J.G.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; SIMÕES, C.C.; ARAÚJO, D.B.; ARAÚJO, R.P.C. Estudo *in vitro* e *in vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.18, p.84-9, 2008.

SILVA, V.A.; FREITAS, A.F.R.; PEREIRA, M.S.V.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.P.; PEREIRA, A.V.; HIGINO, J.S. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.12, n.4, p.452-5, 2010.

SUGGIT, M.; BIBBY, M.C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 971-981, 2005.

VORAVUTHIKUNCHAI, S.P.; KITPPIPIT, L. Activity of medicinal plant extracts against hospital isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, p.493-512, 2005.

XAVIER, M.N.; RAMOS, I.N.C.; XAVIER, L.F. **A Fitoterapia no Combate as Afecções Bucais**. João Pessoa: Idéia. 1995. 101p.



6 ARTIGO III

Artigo a ser submetido à Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine

Atividade antitumoral das flores de *Caesalpinia echinata* Lam. frente ao Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180

Isla Vanessa Gomes Alves Bastos¹, Grace Kelly Cordeiro da Silva¹, Guilherme Carva
Ribeiro Rodrigues², Cybelly Marques de Melo³ & Ivone Antonia de Souza^{4*}.

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Arthur de Sá, s/n, CEP: 50740-521, Recife - Brasil.

²Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, CEP: 50670-901, Recife - Brasil.

³Graduanda do Curso de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Arthur de Sá, s/n, CEP: 50740-521, Recife - Brasil.

⁴Docente orientador do Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, CEP: 50670-901, Recife - Brasil.

RESUMO

A pesquisa de novos produtos antitumorais é uma das principais áreas estudadas atualmente. Diversas instituições têm concentrado esforços na busca de novos medicamentos mais eficazes e seguros a serem utilizados no tratamento do câncer. *Caesalpinia echinata* Lam (Fabaceae/Caesalpinioideae), é uma árvore considerada de valor histórico e econômico. Utilizada popularmente como adstringente, tônico e cicatrizante. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito antitumoral do extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam. O procedimento foi realizado pelo método de Stock (1955) com indução de duas linhagens tumorais – Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180. Para todos os testes foram usadas doses de 250 e 500 mg/Kg do extrato etanólico do referido vegetal (grupos tratados). Com base nos resultados, pode-se concluir que o extrato da planta foi capaz de reduzir os pesos dos tumores com índice de inibição tumoral na maior dose de 78,5% para o Carcinoma de Ehrlich. No entanto, para o Sarcoma 180 o extrato nas referidas doses não apresentou inibição tumoral.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer. Tumor sólido. Carcinoma. Sarcoma. *Caesalpinia echinata* Lam.

Antitumor activity of flowers of *Caesalpinia echinata* Lam against the Ehrlich carcinoma and Sarcoma 180

ABSTRACT: The search for new anticancer products is one of the major areas currently under study. Several institutions have concentrated efforts on finding new drugs more effective and safe for use in cancer treatment. *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae/Caesalpinoideae) is a tree with considerable historical and economic value. Popularly used as an astringent, tonic and healing. This objective of this work was to investigate the antitumoral effect of the ethanolic crude extract from the flowers of *C. echinata* Lam. The procedure was performed by the method of Stock (1955) with the induction of two tumor cell lines - Ehrlich Carcinoma and Sarcoma 180. For all tests were used doses of 250 and 500mg/kg of the ethanolic extract of that plant (test groups). Based on this results, it was conclude that the plant extract reduce in the tumors weight with tumor inhibition rates in the highest does of 78,5% to Carcinoma de Ehrlich. However, to extract the Sarcoma 180 in those doses showed no tumor inhibition.

KEYWORDS: Cancer. Solid tumor. Carcinoma. Sarcoma. *Caesalpinia echinata* Lam

INTRODUÇÃO

O câncer é uma das maiores causas de morte no mundo e, por conseqüência, tornou-se uma preocupação de saúde pública. Considerando a situação atual, uma nova alternativa para o tratamento do câncer é urgente, visto que muitas células malignas não respondem à farmacoterapia disponível ou até mesmo desenvolvem resistência a estes agentes (VECHIA et al., 2009).

As plantas são fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos nos processos tumorais, muitos dos quais constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Assim, a seleção de espécies vegetais para pesquisa e desenvolvimento baseada na alegação de um dado efeito terapêutico, pode constituir em um valioso atalho para a descoberta de novos fármacos mais efetivos, menos tóxicos e/ou com novos mecanismos de ação (OLIVEIRA et al., 2010).

O extrato bruto de plantas nativas brasileiras com estudos, *in vivo* e *in vitro*, têm contribuído favoravelmente no processo de ação antineoplásica podendo ser utilizado como biomateriais de ação farmacológica eficiente (SENEL & McCLUER, 2004).

Caesalpinia echinata Lam é uma árvore de porte médio, encontrada na costa atlântica brasileira desde o Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro (AGUIAR & PINHO, 2007). Algumas de suas propriedades terapêuticas têm sido descritas, sendo seu lenho adstringente, secante, e odontoálgico (XAVIER, 1995; SILVA, 2001).

Informações das propriedades anticancerígenas do extrato das flores de *C. echinata* são inexistentes, entretanto outras espécies do gênero já possuem atividade comprovada (NAKAMURA, 2002).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antitumoral do extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* frente ao Carcinoma de Ehrlich e ao Sarcoma 180 implantados em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*).

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico e obtenção da matéria-prima

Amostras das flores de *C. echinata* foram coletadas no Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/ PE, Brasil e posteriormente identificadas pela botânica Dr^a Marlene Barbosa. Uma exsicata foi depositada no Herbário UFP – Geraldo Mariz da UFPE, sob o número 63.023. O material (1.104 g) foi pesado em balança eletrônica semi-analítica (modelo BG 400, Gehaka®).

Preparação e concentração do extrato etanólico bruto das flores

O material botânico utilizado foi constituído pelas flores de *C. echinata* Lam. sob a forma de extrato etanólico (EE) a 100%, obtido após maceração, concentrado em evaporador rotativo (TE 120, Tecnal®, Brasil) acoplado a bomba a vácuo sob temperatura constante de 45-50°C para eliminação do solvente orgânico e obtenção do extrato bruto.

Animais

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (protocolo número 23076.011798/2010-17). O processo experimental foi desenvolvido no Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE (Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental) a partir da seleção de camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) machos, com pesos e idade aproximados,

divididos em grupos de seis animais cada, previamente marcados e pesados. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em condições controladas de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro) e temperatura de 22 ± 2 °C, com alimentação e água *ad libitum*.

Transplante dos tumores

Para o implante dos tumores (Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180), foi retirada a massa tumoral de um animal doador que foi transferida para outro recipiente e fragmentado. Uma amostra com cerca de 3 mm de diâmetro foi introduzido na região axilar do animal receptor por via subcutânea de acordo com a metodologia proposta por Stock et al., 1955 e Koniyama & Funayama, 1992.

Tratamento dos animais

Os animais induzidos com os fragmentos foram divididos em três grupos: controle, padrão e tratado. Ao grupo controle foi administrado solução fisiológica 0,9 %, o padrão Metotrexato (10 mg/Kg) e ao grupo tratado, o extrato etanólico bruto (EEB) de *C. echinata* Lam. nas doses de 250 mg/Kg e 500 mg/Kg, todos por via oral (v.o.). A quimioterapia foi iniciada 48 horas após o transplante dos tumores durante uma semana. Ao final do tratamento, todos os animais foram pesados, sacrificados e os tumores extirpados, dissecados e pesados. A inibição do crescimento tumoral foi calculada em comparação ao grupo controle após pesagem dos tumores com base na seguinte fórmula:

$$TWI\% = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Onde:

TWI = Percentual de inibição do peso do tumor

C = Média dos pesos dos tumores do grupo controle

T = Média dos pesos dos tumores do grupo tratado.

Médias de variações de peso

Para avaliar a variação de peso dos camundongos, foi calculada a diferença entre o peso final (após os 8 dias de tratamento) e o peso inicial dos animais (peso que os mesmos apresentavam no dia da inoculação do tumor). Os resultados obtidos foram expressos de acordo com a média final (REBELLO, 2005).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm 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

Inicialmente foi avaliada a massa corporal dos animais portadores de Carcinoma de Erlich e verificado que tanto os grupos tratados com o EEB de *C. echinata* nas doses de 250 e 500 mg/Kg bem como, os grupos controle e padrão não apresentaram perdas significativas durante o período experimental (Gráfico 1). As referidas doses dos grupos tratados foram baseadas no valor da DL₅₀ (5 % e 10 %, respectivamente).

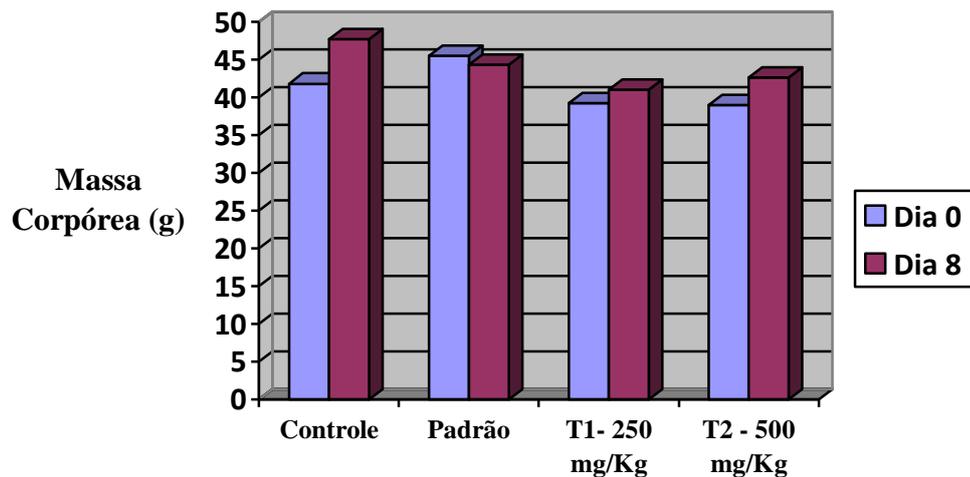


Gráfico 1. Massa corporal média dos camundongos portadores de Carcinoma de Erlich (n = 6) antes (Dia 0) e após (Dia 8) os tratamentos por v.o. com o EEB de *C. echinata* Lam. nas doses de 250 (T1) e 500 mg/Kg (T2), Metotrexatao (Padrão) e solução salina 0,9 % (Controle).

O gráfico 2 representa os dados referentes à massa corporal média dos animais portadores de Sarcoma 180 (S-180). Tanto o grupo controle como os grupos tratados com o EEB de *C. echinata* nas doses de 250 e 500 mg/Kg aumentaram de peso entre o dia 0 e o 8º dia, porém essa variação não foi estatisticamente significativa. Em relação ao grupo padrão, verificamos que não houve alteração de peso durante esse período.

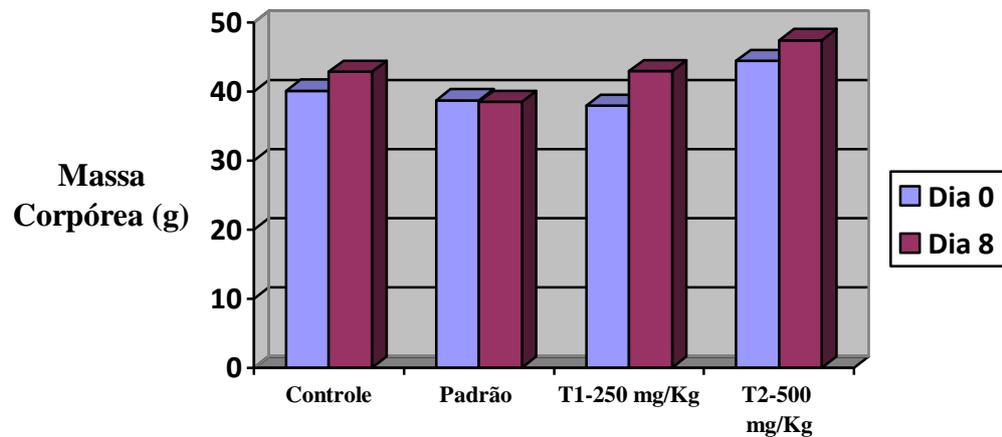


Gráfico 2. Massa corporal média dos camundongos portadores de Sarcoma 180 (n = 6) antes (Dia 0) e após (Dia 8) os tratamentos por v.o. com o EEB de *C. echinata* Lam. nas doses de 250 (T1) e 500 mg/Kg (T2), Metotrexato (Padrão) e solução salina 0,9 % (Controle).

O EEB de *C. echinata*, administrado por via oral, foi capaz de inibir significativamente, em 75,30%, o crescimento do tumor sólido Carcinoma de Ehrlich, em camundongos com a dose obtida (250 mg/Kg) quando comparado com o grupo controle. Em relação à dose de 500 mg/Kg, foi verificada inibição de 78,50%. O fármaco padrão, Metotrexato (10 mg/kg), inibiu o crescimento tumoral em 88,80 % (Gráfico 3).

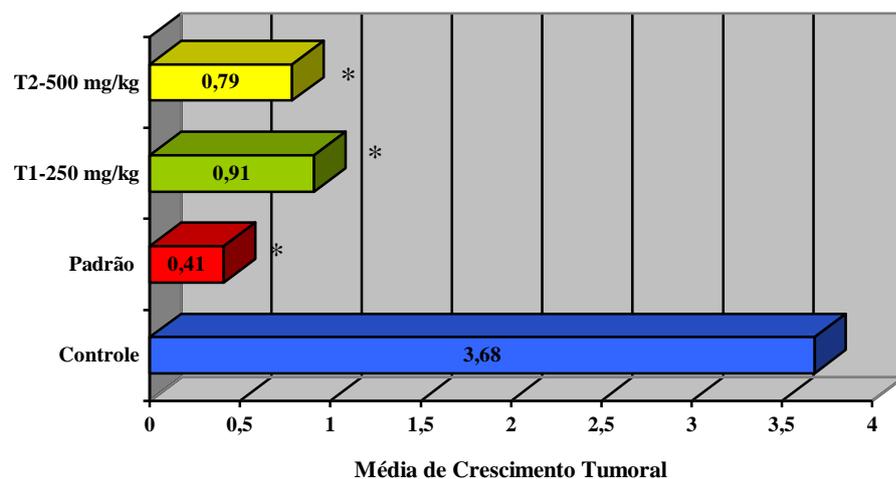


Gráfico 3 - Comparação das médias de crescimento tumoral em camundongos, portadores de Carcinoma de Ehrlich, tratados por v.o. com o EEB de *C. echinata* Lam. nas doses de 250 mg/kg (T1) e 500 mg/kg (T2), Metotrexato (Padrão) e solução salina 0,9% (Controle). Os valores representam a média \pm desvio padrão. * P < 0,05 comparado os grupos tratados com o controle. Teste "t" de Student (n = 6/grupo).

Para S-180, o tratamento com o EEB de *C. echinata* por via oral, em camundongos não demonstrou redução na média de peso tumoral na dose de 250 mg/Kg. Entretanto, os animais tratados com a dose mais elevada (500 mg/Kg) não apresentaram inibição tumoral em relação ao grupo controle. O Metotrexato (10 mg/Kg) atingiu índices de inibição significativo na ordem de 76 %.

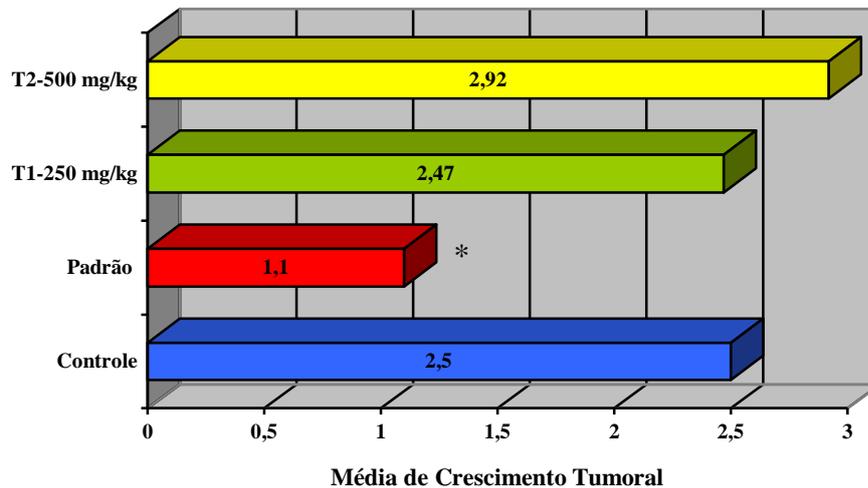


Gráfico 4 - Comparação das médias de crescimento tumoral em camundongos, portadores de Sarcoma 180, tratados por v.o. com o EEB de *C. echinata* Lam. nas doses de 250 mg/kg (T1) e 500 mg/kg (T2), Metotrexato (Padrão) e solução salina 0,9% (Controle). Os valores representam a média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$ comparado os grupos tratados com o controle. Teste "t" de Student ($n = 6$ /grupo).

DISCUSSÃO

De acordo com o grande número de aplicações farmacológicas de substâncias oriundas de plantas, recentes trabalhos têm investigado as atividades anti-tumorais desses produtos naturais (KIDD, 2000; ALVES et al., 2004). Esses fatores somados ao limitado efeito dos medicamentos sintéticos em doenças crônicas têm estimulado à pesquisa de plantas medicinais como alternativa terapêutica, com resultados bastante satisfatórios (RATNER & BRYANT, 2004).

Os protocolos realizados com ensaios pré-clínicos têm contribuído para investigar os diversos aspectos relacionados aos processos neoplásicos em humanos. O modelo animal para o estudo de tumores ganhou um novo impulso, na última década, após constatar-se que os mesmos desenvolvem o câncer por motivos semelhantes aos humanos (QI & XU, 2006).

Parâmetros ponderais, como por exemplo, alterações da massa corpórea é de extrema importância para monitorar os efeitos de tratamento com drogas anti-neoplásicas, embora em

ambos os tipos tumorais (S-180 e Carcinoma de Ehrlich) esses dados não sofreram variações significativas (BEZERRA et al., 2006).

Como demonstrado nos resultados, o EEB de *C. echinata* Lam apresentou atividade quando utilizado no tratamento do Carcinoma de Ehrlich. Esse tumor é um modelo experimental transplantável de origem epitelial que cresce rapidamente, apresenta um comportamento muito agressivo e tem sido amplamente citado na literatura para investigação das propriedades antitumorais de novos agentes terapêuticos (AJITH & JANARDHANAN, 2003; KANENO et al., 2004; MELO et al., 2004). Verificamos que a dose mais elevada apresentou maior inibição, mostrando claramente que efeito do EEB, nesse caso é dose-dependente.

A atuação do EEB de *C. echinata* Lam frente a linhagem sarcomatosa mostrou-se inativa. S-180 é um tumor que invade músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos (STEWART et al., 1959). Apesar de seu comportamento agressivo local, esse tumor não produz metástases (KURASHIGE & MITSUHASHI, 1982). Cresce rapidamente em 90 a 100% dos animais inoculados, e é considerado uma das linhagens mais freqüentemente utilizadas em pesquisas de avaliação da atividade antitumoral *in vivo* (PITA, 2010).

Foi observado, crescimento tumoral para S-180, no grupo tratado com a dose de 500 mg/Kg do EEB, sugestivo de sinergismo entre compostos químicos ou à existência de substâncias indutoras. Ming (1999) relatou a presença de determinadas substâncias em plantas, com potencial indutor de mitoses, sendo, portanto, estimulantes da divisão celular.

Segundo Silva (2006) o extrato etanólico bruto de cerne de *C. echinata* Lam apresentou maior atividade quando utilizado no tratamento do Carcinoma de Ehrlich (90,40%) em relação ao S-180 (73,65%) pela via intraperitoneal.

Outro estudo, realizado com o extrato etanólico das folhas de *C. echinata* Lam. frente ao S-180 apresentou inibição tumoral de 99,4% quando administrado pela via oral (GRANGEIRO, 2009).

Os dados obtidos nesse trabalho diferem dos autores acima citados em relação à espécie vegetal apresentar inibição tumoral frente ao S-180. Uma possível explicação para os resultados obtidos seria o efeito antitumoral de determinados constituintes do extrato etanólico de *C. echinata* Lam. como terpenos, flavonóides e taninos estarem atuando isoladamente ou em sinergismo, uma vez que essas classes de compostos têm pronunciadas atividade anti-câncer já testadas (CAI et al, 2004, FERNANDES et al., 2005; KUO, 1996). A

outra seria a diferença de ação do extrato de *C. echinata* frente às duas linhagens tumorais por possuírem origem e fisiologia diferente. Vale ressaltar que tumores do tipo sarcomatoso são difíceis de tratar, isto porque ele afeta regiões como tecidos ósseo e músculos (ALMEIDA et al., 2005).

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam. apresentou inibição tumoral significativa em relação ao grupo controle apenas para o Carcinoma de Ehrlich. Sugere-se, no entanto, um estudo mais detalhado utilizando outras vias de administração do extrato, bem como a utilização de outras linhagens tumorais.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, F.A. & PINHO, R.A **Pau-brasil *Caesalpinia echinata* Lam. *Árvore Nacional***. São Paulo: Instituto de Botânica, 2007. 35p.
- AJITH, T.A. & JANARDHANAN, K.K. **Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat**. *Journal of Ethnopharmacology* 84: 157-162, 2003.
- ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.D.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. **Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específico e ciclo celular não específico que interagem com o DNA: uma introdução**. *Química Nova*. 28(1): 118-129, 2005.
- ALVES, A.P.N.N.; GUEDES, R.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.E.A.; PESSOA, C.O.; FERREIRA, F.V.A.; MORAES, M.O. **Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinossarcoma de Walker 2561**. *Acta Cirurgica Brasileira*. 19(4): 251-258, 2004.
- BEZERRA, D.P.; CASTRO, F.O.; ALVES, A.P.N.N.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ELMIRO, F.J.M.; COSTA-LOTUFO, L.V. **In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by pipartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper***. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research*. 39(6): 801-807, 2006.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. **Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer.** *Life Sciences* 74: 2157-2184, 2004.

FERNANDES, J.; DA FONSECA, C.O.; TEIXEIRA, A.; GATTASS, C.R. **Perillyl alcohol induces apoptosis in human glioblastoma multiforme cells.** *Oncology Reports.* 13: 943-947, 2005.

GRANGEIRO, A.R.S. **Avaliação do potencial toxicológico e farmacológico das folhas de *Caesalpinia echinata* Lam.** 2009. 55 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

KANENO, R.; FONTANARI, L.M.; SANTOS, S.A.; DI STASI, L.C.; RODRIGUES FILHO, E.; EIRA, A.F. **Effects of extracts from Brazilian sun-mushroom (*Agaricus blazei*) on the NK activity and lymphoproliferative responsiveness of Ehrlich tumor-bearing mice.** *Food and Chemical Toxicology.* 42(6): 909-916, 2004.

KIDD, P.M. **The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment.** *Alternative Medicine Review.* 5: 4- 27, 2000.

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

KUO, S.M. **Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon câncer cells.** *Cancer Letter.* 10: 41-48, 1996.

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

MELO, P.S; JUSTO, G.Z.; DURÁN, N.; HAUN, M. **Natural Killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives.** *European Journal of Pharmacology.* 487: 47-54, 2004.

MING, L.C. *Ageratum conyzoides*: a tropical source of medicinal and agricultural products. In: JANICK, J. (Org.). **Perspectives on new crops and new uses.** Alexandria: ASHS Press, 1999. p.469-473.

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, F. JR. **Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds.** *Cancer Letter* 177(2): 119-124, 2002.

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, F. JR. **Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis.** *Journal of Ethnopharmacology*. 81: 135-137, 2002.

OLIVEIRA, L.P.; PINHEIRO, R.C.; VIEIRA, M.S.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F.; VALADARES, M. C. **Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 20(2): 201-207, 2010.

QI, L. & XU, Z. **In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 16(16): 4243-4245, 2006.

PITA, J.C.L.R. **Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do Trachylobano-360 de *Xylopiya langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae).** 2010. 105 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

RATNER, B.D. & BRYANT, S.J. **Biomaterials: where we have been and where we are going.** *Annual Review of Biomedical Engineering*. 6: 41-75, 2004.

REBELLO, J. **Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de análogos sintéticos da acetofenona e pró-oxidante e antitumoral de chalconas sintéticas.** 2005. 112 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SENEL, S. & McCLURE, S.J. **Potential applications of chitosan in veterinary medicine.** *Advanced Drug Delivery Review*. 56(10): 1467-1480, 2004.

SILVA, R.C. **Plantas medicinais na saúde bucal.** Vitória: Artgraf, 2001. 136 p.

SILVA, E.C.B. **Avaliação biológica de *Caesalpinia echinata* Lam. Fabaceae-Caesalpinioideae. Usos e riscos.** 2006. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

STEWART, H.L.; SNELL, K.C.; DUNHAM, L.J.; SCHYLEN, S.M. Transplantable and Transmissible Tumors of Animals. In: _____. **Atlas of Tumor Pathology.** Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1959. 261p.

STOCK, C.C.; PHILIPS, F.S.; CLARKE, D.A.; BARCLAY, R.K. **Sarcoma 180 Inhibition Screening Data.** *Cancer Research.* 2 (Suppl.): 179-331, 1955.

VECHIA, L.D.; GNOATTO, S.C.B. & GOSMANN, G. **Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante.** *Quimica Nova.* 32(5): 1245-1252, 2009.

XAVIER, M.N.; RAMOS, I.N.C. & XAVIER, L.F. **A Fitoterapia no Combate as Afecções Bucais.** João Pessoa: Idéia, 1995. 101 p.



7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos resultados obtidos a partir dos objetivos propostos e sob as condições que foram realizados os procedimentos, permite as seguintes considerações:

- A prospecção fitoquímica do extrato etanólico bruto das flores de *C. echinata* Lam. indicou a presença de flavonóides, terpenos e esteróides, açúcares redutores e proantocianidinas condensadas;
- De acordo com o valor obtido na DL₅₀ (1.825 mg/Kg), o vegetal estudado apresenta toxicidade moderada quando administrado por via intraperitoneal;
- O extrato etanólico das flores de *C. echinata* Lam apresenta baixa toxicidade por via oral;
- Quanto à avaliação microbiológica, o extrato etanólico de *C. echinata* Lam. apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações testadas frente as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus coagulase negativo*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*;
- Em relação à capacidade de inibir o desenvolvimento tumoral, o extrato etanólico bruto de *C. echinata* Lam nas doses de 250 e 500 mg/Kg apresentaram redução significativa dos pesos dos tumores frente ao Carcinoma de Ehrlich de 75,3% e 78,5%, respectivamente.



8 REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADAM, J.K.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Immune responses in câncer. *Pharmacology Therapeutics*, v. 99, p. 113-132, 2003.
- AGUIAR, F.F.A.; AOKI, H. Regiões de ocorrência natural do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 4., 1982, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Silvicultura. 1983. p. 1-5.
- AGUIAR, F.F.A.; PINHO, R.A. *Pau-brasil - Caesalpinia echinata* Lam. 2 ed. São Paulo: Instituto de Botânica, 1996. 14p.
- ALENCAR, V.B.M.; MELO, S.C.; ALBUQUERQUE, K.F.; FIGUEIREDO, I.S.T.; TUPINAMBÁ, D.D.; FREITAS, B.T.; ALENCAR, N.M.N.; SAMPAIO, A.H.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. Pro-inflammatory effect of galactose binding lectin isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. seeds. In: BOO-HANSEN, T.C., (Eds). *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Lemchesvej (DK): TEXTOP Publisher, 2002. 714 p.
- APG II (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 141, p. 399-436, 2003.
- ASSEF, M.L.M.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.; MORETÃO, M.P.; AZAMBUJA, A.P.; IACOMINI, M.; BUCHI, D.F. Histological and immunohistochemical evaluation of Sarcoma 180 in mice after treatment with na α -d-glucan from the lichen *Ramalina celastri*. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, v. 19, n. 2, p. 49-54, 2002.
- BIGHETTI, A.E.; ANTÔNIO, M.A.; POSSENTI, A.; FOGLI, M.A.; SIQUEIRA, M. G.; CARVALHO, J.E. Efeitos da administração aguda e subcrônica da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini. *Lecta*, v. 22, n. 1/2, p. 53-58, 2004.
- BRUNEAU, A.; FOREST, F.; HERENDEEN, P.S.; KLITGAARD, B.B.; LEWIS, G.P. Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast trnL intron sequences. *Systematic Botany*, v. 26, p. 487-514, 2001.
- BUENO, E.; LIMA, H.C. Epílogo: Raízes do futuro. In: BUENO, E. (Ed). *Pau-brasil*. São Paulo: Axis Mundi. 2002. p. 251-266.
- CARDOSO, M.A.; CARDOSO, S.R.S.; FERREIRA, P.C.G. Protegendo os remanescentes de pau-brasil. *Ciencia Hoje*, v. 29, n. 174, p. 65-68, 2001.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 780 p.
- CRONQUIST, A. *An Integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press, 1981. 1262 p.
- CRONQUIST, A. *The evolution and classification of flowering plants*. 2 ed. New York: New York Botanical Garden Press, 1988. 555 p.

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. *Biological Chemistry*, v. 385, n. 11, p. 1083-1086, 2004.

CULLEN, J.M.; PAGE, R.; MISDORP, W. Tumors of bones. In: MELTEN, D.J.(Eds.) *Tumors in Domestic Animals*. 4 ed. EUA: Iowa State Press, 2002. p. 3-44.

DOYLE, J.J. DNA data and Legume Phylogeny: A progress report. In: CRISP, M.; DOYLE, J.J. (Eds). *Advances in Legume Systematics 7*. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 1995. p. 11-30.

DOYLE, J.J.; CHAPPILL, J.A.; BAILEY, D.C.; KAJITA, T. Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from rbcL sequences and non-molecular data. In: HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, A. (Eds). *Advances in Legume Systematics 9*. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2000. p. 1-20.

DOYLE, J.J.; LUCKOW, M.S. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology*, v. 131, p. 900-910, 2003.

EHRlich, P.; APOLANT, H. Beobachtungen uber maligne mausetumoren. *Berliner Klinischer Ocheschirift*, v. 28, p. 871-874, 1906.

FONTES, R.S. *Pau-brasil, um sonho de resgate*. Recife: FUNBRASIL, 1995. 217p.

FREIRE, M.L.L.B. *Avaliação da atividade antitumoral e antibacteriana do extrato etanólico da Caesalpinia echinata Lam.* 2004. 25 f. Monografia (Conclusão de Curso) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2004.

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, 2003, São Paulo. *Anais...* São Paulo: FAPESP, 2003.

GAZDA, V.E. *Abordagem química e estudo da atividade biológica das raízes de Chiococca alba (L.) Hitchc. (Rubiaceae)*. 2004. 164 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2004.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro: Editora McGraw Hill, 1996. 374 p.

GOLD, H.S.; MOELLERING, R.C. JR. Antimicrobial-Drug Resistance. *New England Journal of Medicine*, v. 335, p. 1445-1453, 1996.

GOMES, J.P.M. *Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica in vitro de produtos naturais*. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo. 2008.

GRANGEIRO, A.R.S. *Avaliação do potencial toxicológico e farmacológico das folhas de Caesalpinia echinata Lam.* 2009. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2009.

GUERRA, J.L. *Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores de tumor de Ehrlich.* 1983. 79 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1983.

HAHN, W.; WEINBERG, R.A. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Reviews*, v. 2, p. 231-41, 2001.

HAWKEY, P.M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *British Medical Journal*, v. 317, p. 657-660, 1998.

HEGEDUS, Z.L. The probable involvement of soluble and deposited melanins, their intermediates and the reactive oxygen side products in human diseases and aging. *Toxicology*, v. 145, p. 85-101, 2000.

HEYWOOD, V.H. *Flowering plants of the world.* New York: Oxford University Press, 1979. 335 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Fisiopatologia do Câncer. In: INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). *Ações de enfermagem no controle do câncer.* 2 ed. Rio de Janeiro: INCA, 2002. p. 49-77.

JIE YIN, G.J.K.; MYEONG, H.W. The antioxidant and cytotoxic activities of *Sonchus oleraceus* L. extracts. *Nutrition Research Practice*, v. 1, n. 3, p. 189-194, 2007.

JORGENSEN, J.H.; TURNIDGE, J.D.; WASHINGTON, J.A. Antimicrobial susceptibility test: Dilution and Disk Diffusion Methods. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*, 6 ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 1999. p. 1526-1543.

JUCHUM, F.S.; AMORIM, A.M.; COSTA, M.A.; CORRÊA, R.X. Caracterização de sequência de DNA cloroplastídico para análise filogenética dos variantes morfológicos foliares de *Caesalpinia echinata* Lam. (PAU-BRASIL). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 51., 2007, Águas de Lindóia, São Paulo. *Resumos...* Ribeirão Preto: SBG, 2007.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. *Plant Systematics a Phylogenetic Approach.* Massachusetts: Sinauer Associates, 1999. 464 p.

KIM, H.K.; CHEON, B.S.; KIM, Y.H.; KIM, S.Y.; KIM, H.P. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure– activity relationships. *Biochemical Pharmacology*, v. 58, n. 5, p. 759–765, 1998.

KLAASSEN, C.D.; EATON, D.L. Principles of Toxicology. In: AMDUR, M.O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C.D. (Eds.). *Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons.* 4 ed. New York: McGraw-Hill Inc, 1994. p. 12-49.

KUMAR, V.P.; CHAUHAN, N.S.; PADH, H.; RAJANI, M. Search for antibacterial and antifungal agents from selected indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, n. 2, p.182-188, 2006.

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

LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. *Principles of medicinal chemistry*. 6 ed. EUA: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.1377 p.

LEWIS, G.P. *Caesalpinia, a revision of the Poincianella – Erythrostemon Group*. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 1998. 233 p.

LEWIS, G.P.; SIMPSON, B.B.; NEFF, J.L. Progress in understanding the reproductive biology of the Caesalpinioideae (Leguminosae). In: HERENDEEN, P.S.; BRUNEAU, A. (Eds). *Advances in Legume Systematics 9*. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2000. p. 65-78.

LEWIS, G.P.; SCHIRIRE, B.D. Leguminosae or Fabaceae? In: KLITGAARD, B.B.; BRUNEAU, A. (Eds). *Advances in Legume Systematics part 10: Higher Level Systematic*. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2003. p. 1-3.

LEWIS, G.P.; SCHIRIRE, B.D.; MACKINDER, B.; LOCK, M. *Legumes of the World*. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 2005. 577 p.

LIMA, H.C.; LEWIS, G.P.; BUENO, E. Pau-brasil: uma biografia. In: BUENO, E. (Eds). *Pau-brasil*. São Paulo: Axis Mundi, 2002. 39-76 p.

LINNAEUS, C. VON. *Species Plantarum*. v. 1. Holmiae: Laurentii Slavii1, 1753. 567 p.

LIRA, C.F.; CARDOSO, S.R.S.; FERREIRA, P.C.G.; CARDOSO, M.A.; PROVAN, J. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Molecular Ecology*, v. 12, p. 3219-3225, 2003.

LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, MC.; MENDONCA, 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, p.199-206. 2005.

MARIZ, S.R. *Estudo toxicológico pré-clínico de Jatropha gossypifolia L.* 2007. 186 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João-Pessoa. 2007.

MARQUES, D.C.; ZUCCHI, P. Comissões farmacoterapêuticas no Brasil: quem das diretrizes internacionais. *Revista Panamericana de Salud Pública*, v. 19, n. 1, p. 58-63, 2006.

MATSUZAKI, P. *Avaliação dos efeitos do extrato etanólico, resíduo butanólico e resíduo aquoso de Pfaffia paniculata sobre o crescimento do tumor de Ehrlich em sua forma ascíticas e sólida*. 2004. 116 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

- MELO, S.C.O. *Estrutura genética e fluxo gênico de Caesalpinia echinata (Pau-brasil) por meio de marcadores microssatélites*. 2005. 71 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-Bahia. 2005.
- MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- MOON, C.K.; PARK, K.S.; KIM, S.G.; WON, H.S.; CHUNG, J.H. Brazilin protects cultured rat hepatocytes from BrCCl₃ induced toxicity. *Drug Chemical Toxicology*, v. 15, n. 1, p. 81-91, 1992.
- MOON, C.K.; LEE, S.H.; LEE, M.O.; KIM, S.G. Effects of brazilin on glucose oxidation, lipogenesis and therein involved enzymes in adipose tissues from diabetic KK-mice. *Life Sciences*, v. 53, n. 16, p. 1291– 1297, 1993.
- MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. *Microbiologia Médica*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 604 p. 2002.
- NASCIMENTO, A.A.; RIBEIRO, E.A.N.; OLIVEIRA, J.M.; MEDEIROS, F.A.; SILVA, M.S.; MEDEIROS, I.A. Cardiovascular effects induced by the hydroalcoholic extract of the steam of *Xylopia cayennensis* in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 17-21, 2006.
- OLIVEIRA, L.F.C; EDWARDS, H.G.M.; VELOZO, E.S.; NESBITT, M. Vibrational spectroscopic study of brazilian and brazilin, the main constituents of brazilwood from Brazil. *Vibrational Spectroscopy*, v. 28, p. 243-249, 2002.
- OLIVEIRA, L.G.; GOZZO, A.J.; NUNES, V.A.; SILVA, I.C.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M.; ARAÚJO, M.S. Inibidores de proteases encontrados em sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) – isolamento e caracterização do inibidor de tripsina. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, p. 72-74. 2002.
- OLIVEIRA, A.P.A. *Potencial metastático e reconhecimento da E-selectina em culturas e em tecidos colonizados pelo tumor ascítico de Ehrlich*. 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.2005.
- OLIVEIRA JUNIOR, R.J. *Análises citogenéticas e expressão da telomerase em Sarcoma 180*. 2008. 132 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. 2008.
- O’PESSOA, C. *Testes “in vivo” e “in vitro” para avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral de plantas do nordeste brasileiro*. 1992. 106 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 1992.
- OTAKE, A.H.; CHAMMAS, R.; ZATZ, R. Câncer. Novo salvos para tratamento. *Ciência Hoje*, v. 38, n. 223, p. 28-33, 2006.
- PELCZAR, J.R.; Michael J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, NOEL R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2. ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 2008.

POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H.; STIRTON, C.H. Evolution and systematics of the Leguminosae. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. (Eds.) *Advances in Legume Systematics*. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 1981. p.1-26.

RABÊLO, W.F. *Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da índia (Syzygium aromaticum)*. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís. 2010.

RAMALHO, R.S. *Pau-brasil (Caesalpinia echinata Lam.)*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1978. 11 p.

RANGARAJAN, A.; WEINBERG, R.A. Comparative biology of mouse versus human cells: modeling human cancer in mice. *Nature Reviews*, v. 3, p. 952-959, 2003.

REZENDE, C.M.; CORRÊA, 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*, v. 27, n. 3, p. 414-416, 2004.

ROBBINS, S.L.; CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; SCHOEN, F.J. *Patologia estrutural e funcional*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1.277 p.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. *Farmacognosia e farmacobiotechnologia*. São Paulo: Premier, 1997. 372 p.

ROCHA, Y.T. Conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam. Leguminosae). In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO, 15., 2001, UBATUBA. *Resumos...* São Paulo: Sociedade Botânica de São Paulo da Universidade de Taubaté, 2004.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. *Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma*. São Paulo: Atheneu, 2005. 118 p.

SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Eds.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre: Ed. Univ./UFRGS/UFSC, 2004. p. 371-379

SCHLEDE, E.; GENSCHOW, E.; SPIELMANN, H.; STROPP, G.; KAYSER, D. Oral acute toxic class method: A successful alternative to the oral LD50 test. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 42, p. 15 – 23, 2005.

SEUNG, J.B.; JONG-SILK, K.; FEKIK, R.J.; THOMAS, E.E.; MICHAEL, F.M.; SEONG-HO, L. Epicatechin gallate-induced expression of NAG-1 is Associated with growth inhibition and apoptosis and colon cancer cells. *Carcinogenesis*, v. 25, p. 2425-2432, 2004.

SILVA RC. *Plantas medicinais na saúde bucal*. Vitória: Artgraf, 2001. 136 p.

SILVA, E.C.B. *Avaliação Biológica da Caesalpinia echinata Lam. Fabaceae Caesalpinoideae. Usos e riscos*. 2006. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2006.

- SILVA, P. *Farmacologia*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1398 p.
- SILVA, T.M.S.; NASCIMENTO, R.J.B.; BATISTA, M.M.; AGRA, M.F.; CÂMARA, C.A. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 35-38, 2007.
- SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; ENDRESS, P.K.; CHASE, M.W. *Phylogeny and Evolution of Angiosperms*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Sunderland, 2005. 370 p.
- SOUZA, R.T.D.; AGRIPINO, D.G.; YOUNG, M.C.M.; MORENO, P.R.H. Caracterização da Presença de ácido daniélico em extratos de Pau-brasil com Atividade Fungitóxica. In: SIMPÓSIO PAU-BRASIL, 2003, São Paulo. *Resumos...* São Paulo: FAPESP, 2003. p. 29-29.
- TOWNER, K.J. The problem of resistant. In: GREENWOOD, D.; EMMERSON, A.; FINCH, R. G. (Eds.). *Antimicrobial chemotherapy*. 3 ed. New York: Oxford University Press, 2007. 504 p.
- TRAVERS, K.; BARZA, M. Morbidity of Infections Caused by Antimicrobial-Resistant Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, v. 34, Suppl 3, p. 131-134, 2002.
- TUBIANA, M. Généralités sur la cancérogenèse. *Comptes Rendus Biologies*, v. 331, p.114-125, 2008.
- TUCKER, S.C. Floral development in legume. *Plant Physiology*, v. 131, p. 911-926, 2003.
- VENANCIO, A.M. *Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do óleo essencial do Ocimum basilicum L. (manjeriço), em Mus musculus (camundongos)*. 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Sergipe, Aracajú. 2006.
- VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química. Nova*, v. 29, p. 326-337, 2006.
- XU, H.X.; LEE, S.F. The antibacterial principle of *Caesalpinia sappan*. *Phytotherapy Research*, v. 18, n. 8, p. 647-51, 2004.
- YE, M.; XIE, W.D.; LEI, F.; MENG, Z.; ZHAO, Y.N.; SU, H.; DU, L.J. Brazilein, an important immunosuppressive component from *Caesalpinia sappan* L. *International Immunopharmacology*, v. 6, n. 3, p. 426-432, 2006.
- ZAIA, H.A.B.A. *Desenvolvimento floral de Caesalpinia echinata Lam., C. peltophoroides Benth. e C. ferrea var. leyotachia Benth. (Fabaceae/ Caesalpinioideae)*. 2004. 53 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2004.



APÊNDICES

APÊNDICE A – Placas Cromatográficas

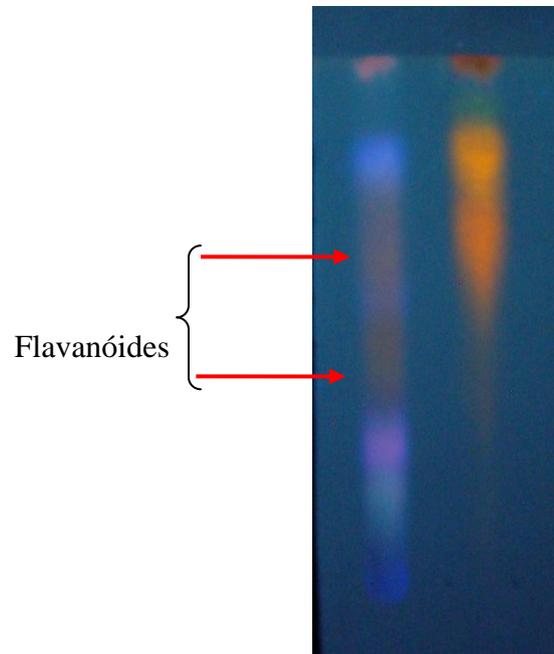


Figura 1. Cromatograma de flavonóides em A – Extrato metanólico das flores; B – Extrato metanólico das folhas.

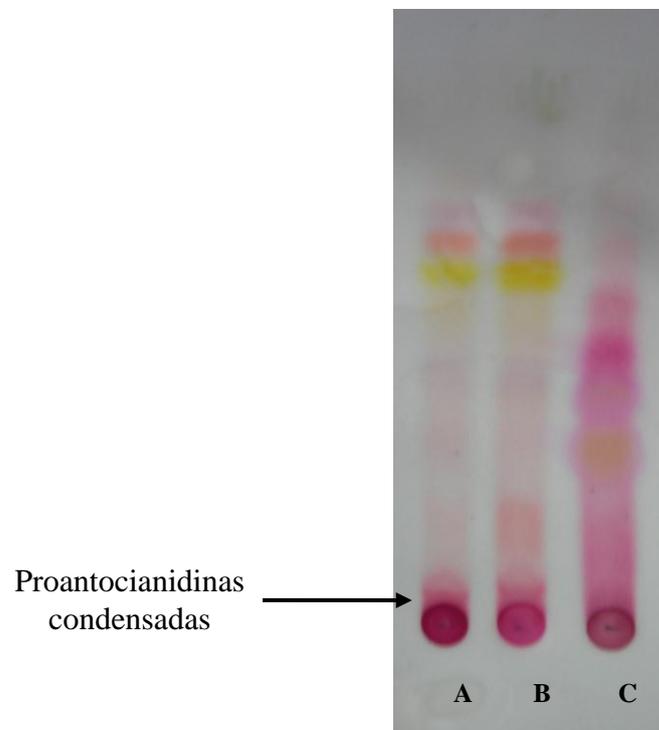


Figura 2. Cromatograma de taninos em A – Extrato etanólico das flores; B – Extrato metanólico das flores e C – padrão casca da jurema.

APÊNDICE B – Placas Cromatográficas

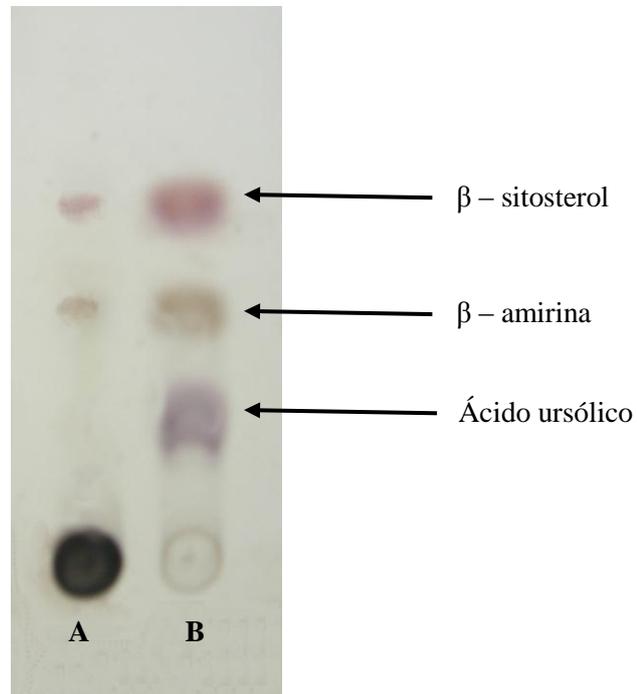


Figura 3. Cromatograma de triterpenos e esteróides em A – Extrato metanólico das flores; B – Padrão (ácido ursólico, β – sitosterol e β – amirina)

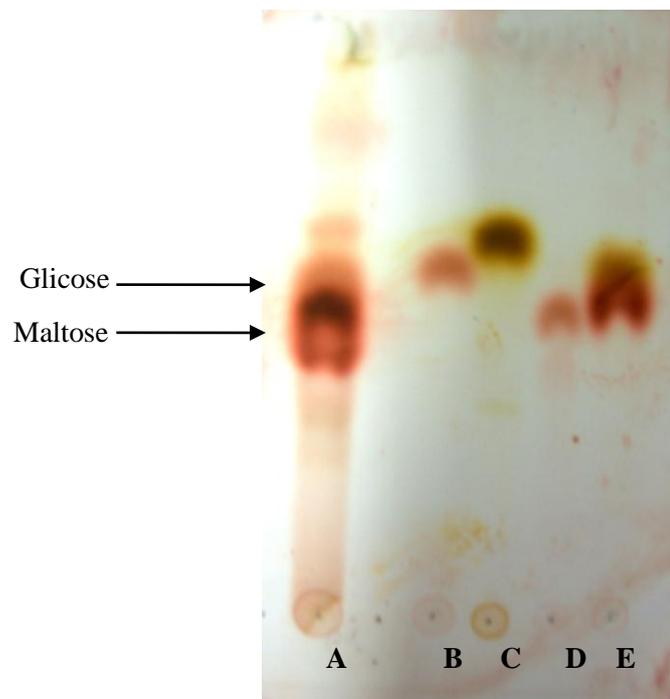


Figura 4. Cromatograma de açúcares redutores em A – Extrato metanólico das flores; B – Padrão glicose; C – Padrão xilose; D – Padrão maltose e E – Padrão sacarose + arabinose.

APÊNDICE C – Tabela de Toxicidade Aguda/Via Intraperitoneal

Tabela 01 – Sinais clínicos da toxicidade aguda, observada em camundongos albinos Swiss machos, tratados com diferentes doses do extrato etanólico bruto de *Caesalpinia echinata* Lam., por via intraperitoneal.

Parâmetros	Dose (mg/Kg)			
	1.000	1.200	1.650	2.160
Estimulante				
↑ Reação de fuga		++	++	+++
↑ Freqüência respiratória		-	+	+
↑ Sibilo		-	+	+
Movimentos estereotipados		++	++	+++
Tremores finos/grosseiros		+	++	++
Movimentos circulares		+++	+++	+++
Agitação		-	+	+
Postura em garra		-	+	++
Movimentos de vibrissas		+	++	+++
Saltos		++	++	++
Postura de ataque		-	+	++
Ereção de cauda		+	+	++
Piloereção		++	+++	+++
Ondulações/fasciculações na cauda		-	++	++
Expansão do pavilhão auricular		+	++	+++
Depressão				
Prostração		-	-	-
Alteração de Marcha		++	++	+++
Postura estática		+	++	++
Sonolência		-	-	-
Abaixamento do trem posterior		+	+	+
Dispnéia		-	-	-
Outros				
Edema de focinho		-	-	-
Refluxo		+	++	++
Espasmos		+	++	++
Petéquias		-	-	-
Palidez		+	+	+
Excreção fecal		++	++	+++
Distensão abdominal		+++	+++	+++
Contorções		+++	+++	+++
Diurese		+	+	++
Lacrimejamento		-	-	-
Coceira		-	-	+
Agressividade		-	+	+
Hipertrofia testicular		-	-	-
Exoftalmia		-	-	-
Nº de Óbitos		0	3	5

- = sem efeito + = efeito leve ++ = efeito moderado +++ = efeito acentuado

APÊNDICE C – Tabela de Toxicidade Aguda/Via Oral

Tabela 02 – Sinais clínicos da toxicidade aguda, observada em camundongos albinos Swiss machos, tratados com diferentes doses do extrato etanólico bruto de *Caesalpinia echinata* Lam., por via oral.

Parâmetros	Dose mg/Kg		
	2.000	4.000	5.000
Estimulantes			
Reação de fuga	+++	+++	+++
↑ Frequência respiratória	+	++	++
Sibilo	+	++	++
Movimentos estereotipados	+++	++	+++
Tremores finos/grosseiros	+	++	++
Movimentos circulares	++	+	++
Agitação	+	-	-
Postura em garra	++	++	+++
Movimentos de vibrissas	+	++	++
Saltos	+	-	-
Postura de ataque	-	-	-
Ereção de cauda	+	+	+
Piloereção	++	++	++
Ondulações/fasciculações na cauda	-	+	+
Expansão do pavilhão auricular	++	++	++
Depressão			
Prostração	++	++	++
Alteração de Marcha	++	-	-
Postura estática	+	++	++
Sonolência	-	++	++
Abaixamento do trem posterior	+	+	+
Dispnéia	-	-	-
Outros			
Edema de focinho	+++	-	-
Refluxo	++	++	++
Espasmos	++	++	++
Petéquias	+	+	+
Palidez	+	-	-
Excreção fecal	++	++	++
Distensão abdominal	-	+	+
Contorções	-	-	-
Diurese	++	++	++
Lacrimejamento	-	+	-
Coceira	+	+	++
Agressividade	+	-	-
Hipertrofia testicular	+	-	-
Exoftalmia	-	-	++
Nº de Óbitos	0	0	0

- = sem efeito + = efeito leve ++ = efeito moderado +++ = efeito acentuado



ANEXOS

ANEXO A – Folha de aprovação do Comitê de Ética

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 16 de Novembro de 2010.

Ofício nº 322/10

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof^a. Ivone Antonia de Souza**
Departamento: Departamento de Antibióticos
Processo nº 23076.011798/2010-17

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Avaliação da Atividade Farmacológica de *Caesalpinia echinata Lam. (Flores)***"

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Observação: Origem dos animais: Biotério do Depto de Antibióticos da UFPE; Animais: Camundongos e ratos; linhagem: Ratos Wistar e camundongos albinos Swiss; machos; Idade: Ratos com aproximadamente 90 dias e camundongos com 60 dias; N° de Animais previsto no projeto: 70 (setenta) camundongos e 25 (vinte e cinco) ratos.

Atenciosamente,

 Prof. Maria Teresa Jansen
Presidente do CEEA

ANEXO B – Tabela utilizada na abordagem fitoquímica

Sistemas cromatográficos e reveladores utilizados para a prospecção fitoquímicos de *Caesalpinia echinata* Lam.

METABÓLITOS	FASE MÓVEL	REVELADOR	REFERÊNCIA
Alcalóides	A-A-A-A	Dragendorff	Wagner, 1996.
Cumarinas	T-E-A	UV-KOH 5%	Wagner, 1996.
Derivados Cinâmicos	A-A-A-A	UV-NEU	Wagner, 1996.
Fenilpropanoglicosídeo	A-A-A-A	UV-NEU	Wagner, 1996.
Flavonóides	A-A-A-A	UV-NEU	Wagner, 1996.
Proantocianidina	A-A-A-A	Vanilina Clorídrica	Robertson, 1955.
Taninos Hidrolisáveis	T-E-A	UV-NEU	Xavier, 2001.
Terpenos menores	T-A (3%)	Vanilina Sulfúrica	Wagner, 1996.
Terpenos maiores	T-A (10%)	Liebermann	Sharma, 1991.
Iridóides	A-A-A-A	Vanilina Sulfúrica	Harbone, 1998.
Saponósidos	A-A-A-A	Anisaldeído	Wagner, 1996.
Açúcares redutores	A-B-T	TTZ	Walenfels, 1950.

A-A-A-A – AcOEt-OHCOOH-AcOH-H₂O (100:11:11:26), T-E-A – Tolueno-Et₂O (1:1: sat ACOH 10%), T-A (3%) – Tolueno-Acetato de etila (3%) (97:10), T-A (10%) – Tolueno-Acetato de etila (10%) (90:10), A-B-T – (Me₂CO-n-BuOH-Tampão fosfato pH 5,0) (5:4:1), NEU – (Sol. 1% de difenilboriloxietilamina em MeOH), UV – ultravioleta 365 nm, TTZ – Cloreto de trifeniltatrazóico (4% em MeOH), Kedd – Sol. 3% de Ác. 3,5 dinitrobenzóico em EtOH), Dragendorff – Segundo Munier e Machebolerf.