

Carlos Roberto Weber Sobrinho

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
CITOTÓXICA DE EXTRATOS DA CASCA DO CAULE DE
Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan var. *Cebil* (Griseb.)
Von Reis Alt. (ANGICO-DE-CAROÇO)**

**Recife
2010**

Carlos Roberto Weber Sobrinho

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
CITOTÓXICA DE EXTRATOS DA CASCA DO CAULE DE
Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan var. *Cebil* (Griseb.)
Von Reis Alt. (ANGICO-DE-CAROÇO)**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia do Centro de
Ciências da Saúde - Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito final para a
obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.

Coorientadora: Prof^ª. Dr. Márcia Silva do Nascimento

**Universidade Federal de Pernambuco
Recife
2010**

Weber Sobrinho, Carlos Roberto
Determinação da atividade antimicrobiana e citotóxica
de extratos da casca do caule de *Anadenanthera*
colubrina (vell.) Brenen var. *Cebil* (Griseb.) Von Reis
Alt. (Angico-de-carço) / Carlos Roberto Weber
Sobrinho. – Recife: O Autor, 2010.
84 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCS. Patologia, 2010.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. *Anadenanthera colubrina*. 2. Doenças
infecciosas. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Atividade
citotóxica. I. Título.

616
616.07

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2010-027

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE- REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

D I R E T O R DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Hilton Justino da Silva

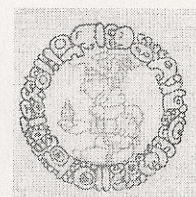
R E C I F E

2010



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo
Fone/Fax: (81) 2126.8529
<http://www.pgmap@ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>



Dissertação defendida para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Autor: **CARLOS ROBERTO WEBER SOBRINHO**

Data: **11 de Fevereiro de 2010.**

Área de Concentração: **Patologia**

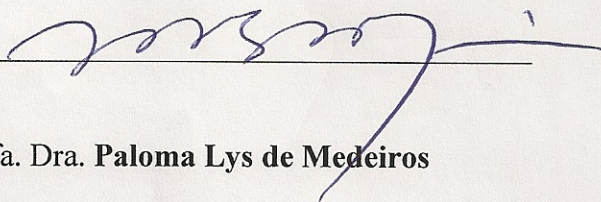
Nome da Dissertação: **“Determinação da atividade antimicrobiana e citotóxica de *Anadenanthera Colubrina* (Vell.) Brenan Var. *Cebil* (Griseb) Von Reis Alt. (Angico de Caroço)”.**

Orientadora: **Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes**

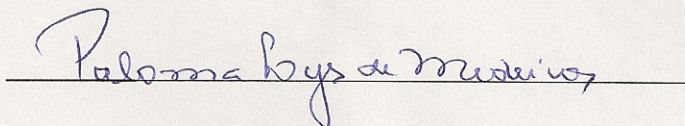
Co-Orientadora: **Márcia Silva do Nascimento**

Banca Examinadora:

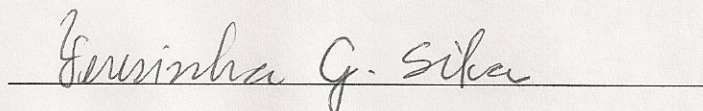
Profa. Pós - Dra. **Maria Bernadete de Sousa Maia**



Profa. Dra. **Paloma Lys de Medeiros**



Profa. Pós - Dra. **Teresinha Gonçalves da Silva**



“A ciência infundada gera ateus,
a verdadeira ciência leva os homens a se
curvarem diante da divindade”.

Voltaire

Dedico este trabalho ao meu pai, Marco Aurélio Weber, que em vida não soube da conquista da aprovação no Mestrado, no entanto, muito me ajudou em memória e em espírito.

- Aqui está minha singela contribuição, em seu nome, para a evolução do prognóstico e tratamento do mal que o tirou nós.

Agradecimentos

O ingresso no mestrado me abriu um grande horizonte de conhecimentos, de oportunidades e sem dúvida alguma de imenso prazer. Hoje tenho a certeza que ninguém caminha sozinho, sempre existe alguém em quem se apoiar nos momentos de fraqueza, ou compartilhar os momentos de alegria. É para algumas delas que apresento meus mais sinceros agradecimentos e carinho:

Minha mãe Sonia Inês Weber, por todo amor, por toda dedicação, por estar comigo sempre, por ser a minha base e minha força em todos os momentos da minha vida.

Minha avó materna, Alaíde Inês dos Santos, por todos os ensinamentos, por toda a torcida, preocupação e orações dedicadas a mim desde o início da minha caminhada.

A minha prima e madrinha do coração, Luzia Ribeiro, por toda a confiança e carinho. Pelas horas de conversa e conselhos, e pela ajuda indispensável ao meu crescimento como ser humano.

A minha orientadora e coorientadoras, Prof^ª. Dr^ª Eulália Ximenes, Prof^ª. Dr^ª. Teresinha Silva e Prof^ª. Dr^ª. Márcia Nascimento por toda a colaboração e ajuda no desenvolvimento deste estudo;

Ao meu grande amigo Ulrich Vasconcelos, por toda ajuda e pela paciência em ouvir lamentos de um mestrando em desespero;

A minha amiga e chefe, Prof^ª. Dra^a. Cleide Miranda, pelos conselhos, apoio, confiança e credibilidade depositada em mim;

As minhas grandes amigas e professoras Dr^ª. Magali de Araújo e Dr^ª. Glícia Calazans, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis.

Ao amigo e professor Dr. Nicodemos Teles, pela compreensão e ajuda sempre que solicitada.

E por último, e não menos importante, a Deus, causa primária de tudo, a quem tentamos compreender e ser agradecidos pela dádiva da vida. A todos aqueles que de maneira anônima estiveram ao meu lado com intuito de ajudar e compartilhar o amor fraternal.

A todos o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Patologias Infecciosas	19
2.2 Terapêutica Microbiana	21
2.3 A Medicina Popular e as Plantas Medicinais	22
2.4 Fitoterapia	23
<i>2.6.1 Princípios ativos naturais</i>	25
<i>2.6.2 Antimicrobianos de Origem Vegetal</i>	28
2.5 O Câncer	29
2.6 Agentes antitumorais vegetais	31
2.7 Ensaios <i>in vitro</i>	34
<i>2.7.1 Cultivo de células e tecidos</i>	34
<i>2.7.2 Linhagens de células neoplásicas (HEP-2 e NCI-H292)</i>	35
<i>2.7.3 Importância e vantagens dos ensaios “in vitro”</i>	36
<i>2.7.4 Citotoxicidade</i>	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral	40
3.2 Objetivos Específicos	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Material Botânico	42
4.2 Obtenção das Frações e Estudo Fitoquímico	42
<i>4.2.1 Obtenção das Frações</i>	42
<i>4.2.2 Abordagem Fitoquímica da Casca do Caule</i>	43
<i>4.2.3 Ensaios quantitativos específicos</i>	44
4.2.3.1 Determinação de Fenois totais	44

4.2.3.2 Dosagem de flavonoides	44
4.3 Atividade Antimicrobiana	45
4.3.1 <i>Preparação e padronização das frações</i>	45
4.3.2 <i>Micro-organismos</i>	45
4.3.3 <i>Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) das frações de A. colubrina</i>	46
4.4 Ensaio de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	49
4.4.1 <i>Células neoplásicas utilizadas nos testes</i>	49
4.4.2 <i>Atividade citotóxica</i>	49
4.5 Análise Estatística	50
5 RESULTADOS - Artigo Original	52
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO 1	
ANEXO 2	
ANEXO 3	
APÊNDICE A	

Lista de Tabelas

Tabela 2.1- Agentes antineoplásicos de origem vegetal utilizados clinicamente	33
--	----

4.0 Metodologia

Tabela 4.1 – Testes específicos para identificar as principais classes de compostos fitoquímicos	43
---	----

Tabela 4.2 – Origem e perfil de susceptibilidade dos microrganismos utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima.	48
--	----

5.0 Artigo Original

Tabela 1 – Origem e perfil de susceptibilidade dos microrganismos utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima.	55
--	----

Tabela 2 – Quantificação de fenois totais em equivalente de ácido gálico e Flavonoides.	57
--	----

Tabela 3 – Atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos multirresistentes.	58
---	----

Tabela 4 – Citotoxicidade dos extratos de <i>A. colubrina</i> frente a linhagens de células humanas tumorais.	58
--	----

Lista de Figuras

4.0 Metodologia

Figura 4.1 - Obtenção do extrato bruto etanólico	42
Figura 4.2 - Protocolo panorâmico de obtenção dos extratos, hidroalcoólico, ciclohexânico e acetato de etila.	43
Figura 4.3 - Esquema de determinação do CIM das frações de <i>A. colubrina</i> .	47

Resumo

O gênero *Anadenanthera* é reconhecido pela medicina popular por apresentar um enorme potencial cicatrizante, no entanto, ainda apresenta questionamentos científicos relacionadas a outras indicações de tratamento. Este fato nos levou ao presente estudo, que visou determinar CIM (Concentração Inibitória Mínima) e IC₅₀ (Concentração Inibitória de 50%) dos extratos da casca do caule de *Anadenanthera colubrina* frente a micro-organismos multirresistentes e células tumorais. Foi realizada a extração de compostos através da adição sucessiva de solventes com polaridade crescente ao extrato bruto do caule (etanol), iniciando pelo ciclo-hexano, acetato de etila e etanol-água (1:1 - v/v). Foram dosados compostos fenólicos totais e flavonoides. Para a determinação da CIM foi utilizada a técnica de diluição seriada em microplaca revelados com TTC e para determinação da citotoxicidade foi utilizada a técnica do MTT. As frações hidroalcoólica e acetato de etila apresentaram teores de fenois totais de 177,85 e 171,26 respectivamente, e teores de flavonoides totais de 13,48 e 34,16. As linhagens de *S. aureus* foram as mais sensíveis às frações hidroalcoólica, acetato de etila e ciclo-hexânica (apresentando CIM com média geométrica de 62,5; 62,5 e 125, respectivamente) quando comparados a *P. aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. A fração ciclo-hexânica foi a única fração que apresentou atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais HEP-2 e NCI-H292, com IC₅₀ de 8,45 e 12,87 respectivamente. O potencial de inibição da proliferação de células tumorais pela fração ciclo-hexânica de *A. colubrina* observado no presente estudo abre perspectivas para a sua utilização como medicamento alternativo no tratamento e controle de neoplasias. Ao mesmo tempo em que a fração hidroalcoólica apresenta uma ação bactericida e fungicida, possuindo assim valor terapêutico como um agente antibacteriano contra várias linhagens de micro-organismos resistentes aos antibióticos.

Palavras-chave: *Anadenanthera colubrina*, atividade antimicrobiana, atividade citotóxica.

Abstract

Folk medicine acknowledged the genera *Anadenanthera* due to its tissue-recovering potential. However, indications for the treatment of other conditions are still matter of scientific approaches. Such fact encouraged us to design this present study, which aimed to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and the Half Maximal Inhibitory Concentration (IC_{50}) of *Anadenanthera colubrina* bark extract using multi-drug-resistant microorganisms and tumoral cells. Extraction was carried out through successive addition of the solvent ordered by increasing polarity compared to the raw bark extract (ethanol): first, cyclohexane, second, ethyl acetate and third, ethanol-water (1:1 – v/v). Then, total phenolic compounds and total flavonoids were measured. Serial microdilution technique by using TCC was performed for the MIC determination and MTT technique was achieved for the cytotoxicity assay. Test was developed by using TCC. Ethanol-water and ethyl acetate fractions contained 177.85 and 171.26 of total phenolic compounds, as well as, 13.48 and 34.16 of total flavonoids, respectively. Compared to strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* revealed to be the most sensitive strains to water-ethanol, ethyl acetate and cyclohexane fractions (MIC geometric mean of 62.5; 62.5 and 125, respectively). Only cyclohexane fraction showed cytotoxic activity with IC_{50} in tumoral cells HEP-2 and NCI-H292 of 8.45 and 12.87, respectively. It was observed an inhibitory potential on tumoral cells proliferation by the cyclohexane fraction of *A. colubrina*. It highlights the perspective of an alternative medicine for the treatment and control of neoplasia. At the same time, water-ethanol fraction also showed therapeutic value due to the bactericidal and fungicidal activity against a wide range of multi-drug-resistant microorganisms.

Keywords: *Anadenanthera colubrina*, antimicrobial activity, citotoxical atctivity.

1 APRESENTAÇÃO

1 APRESENTAÇÃO

A grande preocupação com as patologias infecciosas é a resistência dos agentes etiológicos aos antibióticos e quimioterápicos usualmente utilizados em seu tratamento. A resistência bacteriana é um problema emergente no âmbito mundial e é responsável por um importante aumento na morbidade e na mortalidade relacionadas às doenças infecciosas. Esta resistência é a causa de um grande aumento nos custos diretos e indiretos envolvidos no tratamento das infecções, o que as tornam mais severas e prolongadas, aumentando assim o tempo de internação e o afastamento do paciente de suas atividades (COHEN, 1992).

Apesar das indústrias farmacêuticas terem produzido um expressivo número de antibióticos nas últimas três décadas, a resistência microbiana a essas drogas também aumentou. Em geral, as bactérias têm a habilidade genética de adquirir e de transmitir a resistência aos agentes antimicrobianos que são utilizados no tratamento das doenças infecciosas (COHEN, 2002; LORIAN, 1996).

Na literatura, alguns casos inspiram preocupação, como o crescimento da prevalência de *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina, de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, de *Enterococcus* resistente à vancomicina e de bacilos Gram-negativos produtores de beta-lactamases. Estes são exemplos do crescente problema da resistência antimicrobiana documentado recentemente pelos sistemas de vigilância nacionais e internacionais (MIRANDA et al, 2006).

Outro grande problema de saúde pública no âmbito mundial são as doenças degenerativas como as neoplasias, que são definidas como enfermidades multicausais crônicas, caracterizada pelo crescimento descontrolado das células (WCRF, 2009). A prevenção e o tratamento destas patologias através do desenvolvimento de novos fármacos têm tomado uma dimensão importante no campo da ciência, uma vez que recentemente foi apontada como um das causas primordiais de mortalidade no mundo, juntamente com patologias cardiovasculares (WCRF, 2009; WHO, 1998).

A utilização de extratos vegetais cujas atividades antimicrobiana e antineoplásica são cientificamente reconhecidas, e pode ter um grande significado na terapêutica, uma vez que constitui uma fonte potencial para solucionar ou minimizar estes problemas. Inúmeros estudos com vegetais superiores estão sendo desenvolvidos, em diferentes países com objetivo de comprovar sua eficácia farmacológica, em especial a atividade antimicrobiana (SLOWING; CARRETERO; VILLAR, 1994;

KARLA; CARRETERO; VILLAR, 1994; DE LIMA; MARTINS; SOUZA Jr., 1998; DORMAN; DEANS, 2000; MURUGANANDAN et al, 2001; JAGETIA; BALIGA, 2002; SHAFI et al, 2002; TIMBOLA et al, 2002; CHANDRASEKARAN; VENKATESALU, 2004; TEIXEIRA; FUCHS, 2006; MUTHU et al, 2006; BRAGA et al, 2007; KUMAR et al, 2008) e atividade antitumoral (SCHICK et al, 1989; RIES et al, 1993; MALPEZZI et al, 1995; ALMEIDA et al, 2004; BRINGMANN et al, 2008; NOGUEIRA et al, 2008; DA SILVA et al, 2009)

Os produtos obtidos a partir de plantas são reconhecidos por suas substâncias ativas, os metabólitos secundários como os taninos, flavonoides, alcaloides, terpenos, esteroides, etc (NASCIMENTO; CHIAPPETA; LIMA, 1990; HAO; BRACKETT; DOYLE, 1998; DJIPA; DELMEE; QUETIN-LECLERCQ, 2000; NASCIMENTO et al, 2000).

Nos últimos anos, tem-se verificado um crescente aumento na utilização e na fabricação de fitoterápicos, cosméticos, bem como utilização de matéria-prima para síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos (CRUZ, 1995; OKUNADE et al, 2004; DREWES; GEORGE; KHAN, 2003; LA CRUZ, 2005).

Segundo informações da Organização Mundial de Saúde (OMS), entre 60-80% da população mundial utilizam medicamentos de origem natural, fazem parte da chamada terapia tradicional (OMS, 2002).

Um insistente e crescente apelo observado nos dias atuais é a da necessidade de determinar a segurança e eficácia da utilização prática de produtos naturais. A ênfase é dada ao apoio à implantação de infra-estrutura apropriada para o desenvolvimento de pesquisa em centros acadêmicos e em outras instituições, com intuito de averiguar ação dos fitoterápicos. (OMS, 2006).

Por outro lado, é de amplo conhecimento popular e acadêmico que o Brasil, possuidor da maior biodiversidade do planeta, apresenta uma imensa flora medicinal nativa ainda desconhecida ou pouco estudada. Assim, muitos trabalhos têm sido realizados com os objetivos de isolar e caracterizar o princípio ativo das plantas (PACHTER et al, 1959; FISCH et al, 1955; IACOBucci et al, 1964; YAMASATO et al, 1972; KINGSTON, 2000; VEROta et al, 2000).

A obtenção de extratos de plantas com supostas propriedades terapêuticas tem levado à obtenção de diversos compostos purificados com ação farmacológica bem definida como ARAGAL (MORETÃO et al, 2003), com atividade imunomoduladora e antineoplásica, e a anadanthoflavona (GUTIERREZ-LUGO et al, 2004).

Nesta conjuntura, o estudo fitoquímico e farmacológico do gênero *Anadenanthera* parece oportuno. O gênero *Anadenanthera* pertence à subfamília *Mimosoideae* da família *Leguminosae*. Inicialmente proposta por Brenan em 1955, consistia de quatro espécies, anteriormente incluídas no gênero *Piptadenia* devido às semelhanças morfológicas. Em 1964, o pesquisador Altschul em sua revisão taxonômica sobre o gênero *Anadenanthera*, o considerou composto de apenas duas espécies, *A. Peregrina* (L.) Speg. e *A. colubrina* (Vell.) Brenan, cada uma delas contendo duas variedades.

A espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *Cebil* (Griseb.) Von Reis Alt., alvo deste estudo, apresenta diversos sinônimos na nomenclatura científica, bem como inúmeros nomes populares, dos quais são destacados: angico, angico-de-carço, angico-vermelho, angico-do-campo, angico-preto, arapiraca, curupá e angico-de-casca. (ALTSCHUL, 1964).

A. colubrina é uma árvore de caule tortuoso e inerme de 13 até 20 m de altura. A casca é rica em taninos e uma das mais empregadas pelos curtumes brasileiros. Dela exsuda abundante goma-resina com aplicações industriais e medicinais, a qual se destaca pela ação no combate a bronquites (CORRÊA, 1984; LORENZI, 1998).

A utilização de produtos farmacêuticos da espécie *A. colubrina*, como o medicamento distribuído no Brasil com o nome comercial de Elixir Sanativo® (*Piptadenia colubrina* e associações), por exemplo, origina-se das propriedades adstringentes de sua casca. A decocção da casca ralada é utilizada no tratamento de complicações do fígado, gonorreia, leucorreia, infecção dos ovários e como depurativo do sangue. O xarope da casca e da resina é administrado por via oral no tratamento da bronquite e da angina. Também é utilizada em gargarejos e no tratamento da piorreia. Para dores de cabeça, resfriados e secreção pulmonar são realizados inalações de quantidades pequenas de sementes previamente secas ao sol, assadas e moídas (PAULA, 1981; MONTEIRO et al, 2006).

Dentre muitos estudos, um se destaca pelo fato de sugerir que extratos da casca do caule *A. colubrina* apresentam atividade antioxidante. Estes extratos apresentam atividade contra o íon peroxila, importantes agentes que intermediam a peroxidação lipídica, danificando assim as membranas celulares, e em consequência desta propriedade, pode desempenhar um papel importante além da atividade de anti-inflamatória desta planta descrita na literatura (DESMARCHELIER et al, 1999)

A aplicação de plantas para curar doenças infecciosas é ampla na cultura popular (CARLINI, 1983; MOREIRA, 2000), e este fato tem contribuído bastante para o direcionamento das pesquisas, cujos resultados revelam grande potencial terapêutico, embora grande parte delas ainda não tenha sido estudada. Esta afirmação vem endossar a necessidade de pesquisas direcionadas à obtenção de drogas vegetais que sejam eficazes e seguras na terapia anti-infecciosa principalmente em se tratando de micro-organismos multiresistentes (MDR), especialmente em indivíduos imunocomprometidos (NASCIMENTO et al, 2000).

Diante deste relato, a presente dissertação traz com a realização de estudos fitoquímico, microbiológico e análise de citotoxicidade de frações de *A. colubrina* uma importante contribuição, porquanto referencia mais uma alternativa de compostos naturais ao tratamento de doenças infecciosas e doenças crônico-degenerativas como o câncer, bem como sua aplicação futura em produtos de aplicação humana e veterinária.

Baseada no modelo de dissertação proposto pelo Centro de Ciências da Saúde, a presente dissertação de mestrado estrutura-se em uma ampla revisão de literatura e dupla produção científica. A primeira, uma revisão sistemática intitulada “*Anadenanthera colubrina*: um estudo do potencial terapêutico” (Apêndice), a qual aborda uma visão geral sobre as indicações terapêuticas e bioensaios realizados com a espécie *Anadenanthera colubrina* até o ano de 2010. Este foi submetida à Revista Brasileira de Farmácia (Anexo 2). O segunda produção científica, resultado do trabalho de pesquisa de 8 meses, é o artigo original intitulado “Atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos da casca do caule de *Anadenanthera colubrina*” (Capítulo de Resultados), submetida a revista internacional Letters Applied Microbiology, e é o artigo científico que contempla todos os resultados da pesquisa obtida a partir do projeto de dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Patologia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Patologias Infecciosas

As doenças infecciosas podem ser caracterizadas como processos agudos, de alta letalidade ou como processos crônicos, capazes de subsistir durante a maior parte da vida do portador, aparentemente sem produzir maiores prejuízos. Essas doenças constituem um grupo muito heterogêneo e possuem em comum apenas o fato de serem ocasionadas por micro ou macroparasitas: agentes etiológicos vivos, adquiridos em algum momento pelos hospedeiros a partir do ambiente externo (PIGNATTIM, 2004). Uma definição menos ampla de infecção inclui, necessariamente a presença e multiplicação de organismos, tais como bactérias, fungos, protozoários, vírus e helmintos em um hospedeiro vivo, com estimulação de uma resposta imunológica evidente, podendo ser localizada ou generalizada (KONEMAN, 2008).

As doenças infecciosas têm seu destaque na história da humanidade por constituírem um grande problema de saúde pública. Malária, cólera, febre tifoide, hanseníase, peste bubônica, entre outras, tiveram uma grande incidência em todo o mundo durante todo o século XIX (SÁ; SOUZA; DINIZ, 1992). A melhoria da qualidade de vida nos países do hemisfério norte, bem como os efeitos da Revolução Industrial e, particularmente, os fenômenos de urbanização e aceleração tecnológica, restringiram essas doenças às “áreas pobres” do mundo, dentre essas as zonas tropicais (SÁ; SOUZA; DINIZ, 1992).

As infecções estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade nas populações dos países em desenvolvimento desde os tempos remotos (COURO; CASTRO, 2001). Elas são importantes causas de mortes prematuras no mundo, com uma estimativa de 50.000 óbitos por dia, e estão juntamente com as doenças crônico-degenerativas como câncer e doenças cardiovasculares entre as patologias de maior preocupação mundial (WHO, 2009). No Brasil, o quadro epidemiológico do início da década atual caracteriza-se pela coexistência de doenças crônico-degenerativas (como câncer, doenças cardiovasculares) e endêmicas, e o retorno de velhas doenças infecciosas (como dengue e tuberculose). Nas últimas décadas, as doenças infecciosas têm apresentado valores próximos a 10% do total de internações em todo o país, sendo estes mais elevados nas Regiões Norte e Nordeste (PINHEIRO et al, 2002). As alterações ocorridas no perfil de morbimortalidade, principalmente a partir dos últimos

25 anos do século passado, contribuíram para criar uma falsa expectativa de que todo esse grupo de doenças estaria próximo à extinção. Entretanto o seu impacto na morbidade ainda é importante, especialmente aquele produzido pelas doenças para as quais não se dispõe de mecanismos eficazes de prevenção e controle (MINISTÉRIO DA SAÚDE - BR, 2004).

Atualmente, existe outra grande preocupação entre as patologias infecciosas, o grupo designado de infecções hospitalares ou nosocomiais. Estas infecções são definidas como aquelas adquiridas em hospitais, podendo ocorrer durante, ou ainda, em decorrência desta hospitalização (VILLAS BOAS; RUIZ, 2005). Os quadros infecciosos, principalmente em UTI estão associados ao maior tempo de internação, além da elevação da morbidade e da mortalidade. Estas patologias têm um impacto econômico importante, pois requerem dos sistemas de saúde, um alto investimento para o seu controle (BURKEJE, 2003).

Alguns estudos brasileiros avaliaram o impacto das infecções em ambiente hospitalar. Toufen Jr et al (2003) estudaram a prevalência de infecção nosocomial em um Hospital Universitário e encontraram uma alta taxa de incidência, aliada ao predomínio de bactérias resistentes a grande parte dos antimicrobianos comumente utilizados. Pesquisas recentes apontaram como agentes responsáveis por essas infecções os bacilos Gram-negativos como *Pseudomonas* e cocos Gram-positivos, principalmente dos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus*. A taxa de mortalidade de pacientes com infecções nosocomiais, nestes estudos variou de 34,7% até 46,6%. Outro dado importante revelado pelos mesmos estudos verifica que 65% dos casos de infecções evoluíram para um quadro de choque séptico (SILVA et al, 2004; SALES JUNIOR et al, 2007). Vários fatores contribuem para a prevalência e a dificuldade no controle das infecções, como o aumento do número de pacientes imunocomprometidos, o crescente número de procedimentos invasivos, principalmente pela utilização de catéteres, ventilação mecânica, diálises (MUDIM et al, 2003).

O Brasil possui uma população extremamente heterogênea em relação às realidades regionais, incluindo diferentes condições de acesso aos serviços de saúde (LISBOA et al, 2007). Agregado a este fato, está o surgimento de novas doenças ou de novas formas de manifestação das doenças na população, aumento na severidade por surgimento de novas linhagens de bactérias patogênicas resistentes aos antimicrobianos, assim como à persistência de problemas como a desnutrição e doenças endêmicas. Essa situação implica manutenção de estruturas dispendiosas de atenção médica que

competem por recursos escassos, os quais poderiam, em caso da não-existência desses problemas, vir a serem utilizadas na solução de problemas de saúde de maior complexidade, como as doenças crônicas não transmissíveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE - BR, 2004).

2.2 Terapêutica Microbiana

O conceito de que substâncias derivadas de um organismo vivo podem eliminar outros organismos é traduzido por antibiose. Ele é quase tão antigo quanto a Microbiologia como uma ciência. A aplicação da antibioticoterapia, sem que fosse reconhecida como tal, é consideravelmente antiga. Há mais de 2500 anos, os chineses tinham conhecimento das propriedades terapêuticas da “papa mofada” do feijão-soja, empregada em carbúnculos, foliculites e inflamações semelhantes. Durante muitos séculos a literatura médica registrou descrições dos efeitos benéficos resultantes da aplicação em certas infecções, de terra e várias plantas muitas das quais eram provavelmente fontes de fungos e bactérias produtoras de antibióticos (GILMAN; GOODMAN; GILMAN, 2006). O bolor do pão também era utilizado para o tratamento de ferimentos pelos antigos egípcios, porém, ainda não existia nenhum conhecimento sobre o que estes fungos continham (BLACK, 2002).

A antibiose, conceito pioneiro, passou a ser investigado as observações de Flemming (1928), o qual percebeu a capacidade de uma linhagem de *Penicillium notatum* em inibir o crescimento de *Staphylococcus sp.* No entanto, somente após a descoberta da estreptomicina, feita por Waxmam (1944) a partir de bactérias do gênero *Streptomyces*, ocorreu a introdução do termo antibiótico como sendo uma substância química produzida por bactérias ou fungos, com capacidade de inibir o crescimento ou de destruir bactérias. A quimioterapia antimicrobiana teve seu marco com a descoberta das sulfas, apesar da sua limitada utilização. Após estas descobertas, outros agentes antibacterianos como os aminoglicosídeos, cefalosporinas, foram sendo isolados e desenvolvidos (BLACK, 2002).

Mesmo com a descoberta de vários fármacos utilizados na terapêutica específica de patologias infecciosas, uma preocupação era notada: a utilização indiscriminada e prolongada de antimicrobianos sem prescrição médica. Este fato, dentre outros, trouxe como consequência a seleção de micro-organismos patogênicos mutantes resistentes a diversos antibióticos e quimioterápicos (CRISAN et al, 1995). O

problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva da aplicação de drogas antimicrobianas no futuro é incerta. Portanto, estudos têm sido realizados para que seja possível reduzir este problema, como por exemplo, ressaltar a importância de controlar o emprego indiscriminado de antibióticos, desenvolver pesquisas para melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e continuar o estudo de desenvolvimento de novas drogas tanto sintéticas como naturais (BREIMAN et al, 1994; STRAUSBAUGH et al, 1996; NASCIMENTO et al, 2000).

2.3 A Medicina Popular e as Plantas Medicinais

Segundo Oliveira (1985), pode-se conceituar a medicina popular como: “Conjunto de saberes, técnicas e práticas de cura, inserido nos aspectos cultural, histórico e psicossocial de determinada população”. Trata-se de uma prática que resiste política e culturalmente à medicina acadêmica e se diferencia desta em diversos aspectos: é uma medicina descentralizada e é independente da tecnologia estrangeira e do imperialismo econômico.

A medicina popular foi recriada no espaço urbano através do fenômeno das migrações para os grandes centros. Pessoas oriundas do meio rural trouxeram seus saberes e técnicas de manipulação e cultivo de plantas medicinais e se adaptaram às novas condições de espaço e ambiente (AMOROZO, 1996).

A utilização de produtos naturais pelo homem, oriundos da medicina popular, é tão antiga quanto sua própria história, evoluindo com ele ao longo dos anos. O uso das plantas se dava tanto para fins nutricionais como para fins terapêuticos, garantindo a manutenção da saúde humana. Essa utilização durante a história foi fundamental para que a produção de medicamentos desse os primeiros passos. Foi por meio de tentativas e erros que o homem primitivo adquiriu conhecimentos, determinando quais plantas poderiam ser utilizadas como alimentos, medicamentos e quais plantas eram venenosas ou apresentavam algum perigo a saúde (AMOROZO, 2002).

Atualmente, nos grandes centros, a medicina popular e as plantas medicinais compete com a medicina acadêmica e os medicamentos industrializados, podendo encontrar sua prática em clínicas, em lojas de produtos naturais, feiras livres, em núcleos religiosos. Pode-se dizer que estas aplicações mantêm viva a utilização da medicina popular, mas não a garante às futuras gerações, uma vez que os detentores

deste conhecimento, via de regra, não o transmitem aos seus descendentes (AMOROZO, 1996;).

Dentro desta problemática, é visível a necessidade de estudos nesta área, pois pode ocorrer a quebra de um ciclo de transmissão oral desta cultura que não está nos livros e nem se aprende nas universidades. Mas que é tão eficiente quanto qualquer medicamento industrial ou prática moderna de saúde (AMOROZO, 1996; AMOROZO, 2002).

2.4 Fitoterapia

Até o século passado, os medicamentos utilizados eram basicamente à base de plantas medicinais. O aumento da preferência pelos medicamentos industrializados, depois da revolução industrial, devido ao aumento na produção de compostos sintéticos (mais puros) e agravados pelo difícil controle de qualidade de extratos vegetais, não durou muito (TOLEDO, 2002). Com o crescente interesse pelas terapias alternativas, as plantas medicinais voltaram a ser estudadas (RIBEIRO; LEITE; DANTAS-BARROS, 2005).

Carvalho (2004) define alguns conceitos para o estudo da fitoterapia: Planta medicinal é a planta selecionada e utilizada popularmente como remédio no tratamento de doenças. Segundo a OMS (1978) “[...] é toda e qualquer planta que quando aplicada sob determinada forma, e por alguma via, no homem, é capaz de provocar um efeito farmacológico”. A legislação em vigor no Brasil define como conceito de fitoterápico “[...] aquele medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações técnico-científicas em publicações ou ensaios clínicos (BRASIL, 2004).

Os medicamentos fitoterápicos são preparações farmacêuticas, tais como, extratos, tinturas, pomadas e cápsulas de ervas medicinais obtidas a partir de uma ou mais plantas, que podem ser utilizadas para o tratamento de várias doenças. Usualmente as substâncias ativas responsáveis pelo seu efeito farmacológico são desconhecidas. Dentre as inúmeras vantagens dos fitoterápicos estão seu largo uso terapêutico, seu

baixo custo e a grande disponibilidade para a população de baixa renda (CALIXTO, 2000).

Os vegetais são excelentes fontes de matéria-prima na busca de novos fármacos, tendo-se em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química. A fantástica variedade e a complexidade dos metabólitos biossintetizados pelas plantas sofrem influências dos estímulos ambientais, bastante variáveis de natureza química, física e biológica, sobre a composição química sintetizando moléculas de estruturas complexas e com grande diversidade de esqueletos e grupos químicos funcionais (ALVES, 2001; RISSATO; ALMEIDA; SILVA, 2004). Deve-se ainda ressaltar a importância de compostos de origem vegetal na medicina moderna, pois entre 1984 e 1994, dos medicamentos aprovados pelo Ministério da Saúde do Brasil, 6% foram extraídos diretamente de espécies vegetais, 24% foram produzidos a partir de produtos derivados de vegetais e 9% foram produzidos através da modelagem molecular de estruturas químicas de compostos vegetais que serviram de protótipos. No início da última década, a estimativa para ela foi que metade dos 25 medicamentos de maior utilização no mundo fosse originados de metabólitos secundários dos vegetais (ALVES, 2001; GARCIA et al, 1996).

No Brasil, assim como em outros países latino-americanos, a fitoterapia tornou-se uma alternativa terapêutica econômica em relação aos medicamentos alopáticos, caracterizando-se pela utilização direta da planta no tratamento das doenças (LEHIR, 1985; DI STATI et al, 1994). A biodiversidade brasileira é uma das mais ricas do planeta, com milhares de exemplares em sua flora, estando o Brasil, entre os sete países considerados “mega-diversidades” com cerca de 50% das espécies vegetais do mundo (NODARI; GUERRA, 2000). Rodrigues e Calini (2002) justificam o título de “mega-diversidade” do Brasil ao fato de ocorrer nele os cinco principais biomas: floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga. Este fato torna o Brasil foco prioritário de investigações farmacológicas de novas drogas. Porém, com a velocidade com que ocorre a extinção de espécies vegetais (GARCIA et al, 1996), um número muito grande de plantas com propriedades medicinais corre um enorme risco de desaparecer, mesmo antes de seu valor fitoterápico ser conhecido, tornando-se urgente aumentar as pesquisas e os investimentos nessa área.

2.4.1 Princípios ativos naturais

Os princípios ativos naturais são substâncias sintetizadas pelas plantas e armazenadas durante seu crescimento, porém, nem tudo que é sintetizado possui valor nutricional. Em todas as espécies existem ao mesmo tempo princípios ativos e substâncias inertes (substância sem qualquer efeito farmacológico ou tóxico). Os princípios ativos concentram-se principalmente nas flores, raízes ou folhas, e de modo esporádico, nos frutos e nas cascas. Outra característica dos vegetais é que não apresentam concentrações uniformes de princípios ativos durante o seu ciclo de vida, variando com seu habitat, a colheita e a preparação (TESKE; TRENTINI, 1997). Segundo Ferreira (2003) várias são as formas de avaliar a autenticidade de um extrato vegetal, entre elas, os testes fitoquímicos são os mais usados.

Os lipídios, as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucleicos, que são comuns às diversas espécies de plantas e são essenciais para a manutenção das células. São originados do metabolismo chamado primário (SIMÕES, 2007). Já as substâncias produzidas a partir de rotas biossintéticas diversas, e que estão restritas a determinados grupos de organismos, são chamados de metabólitos secundários, também designados por Gottlieb et al (1999) como metabólitos especiais (PERES, 2009).

Diferente do primário, o metabolismo secundário não é essencial para o desenvolvimento do vegetal, mas é imprescindível para a sobrevivência de uma espécie dentro de um ecossistema, viabilizando a adaptação do indivíduo no ambiente, respondendo pelas relações e interações entre planta-ambiente (MONTANARI Jr., 2009). Esses metabólitos ainda não possuem suas funções fisiológicas completamente elucidadas, no entanto são substâncias que promovem mecanismo de defesas contra fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos e animais superiores, além de promover resistência contra os raios ultravioleta (UV) e consequentes alelopatias ou ainda atuando na competição entre plantas e atração de organismos benéficos que atuam como polinizadores, dispersores de sementes e micro-organismos simbiotes (HAENEN, 1985; WINK, 1990; MOLINA-TORRES; GARCÍA-CHAVEZ; RAMÍREZ-CHÁVEZ, 1999; MONTANARI Jr., 2002; SOUZA; LORENZI, 2005; SIMÕES, 2007; PERES, 2009).

Muitos dos metabólitos são comercialmente importantes para os setores alimentício, agrônômico, de perfumaria e principalmente farmacêutico, o qual visa principalmente o grande número de substâncias farmacologicamente ativas (WINK;

SCHNEIDER, 1990; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; SIMÕES, 2007). A abrangente atuação dos metabólitos secundários dos vegetais, desde produção de substâncias farmacologicamente ativas até a interferência na interação entre vegetais em um sistema de produção, mostra a importância e a necessidade do conhecimento sobre esses compostos. Compreender a sua atuação pode abrir inúmeras possibilidades de estudos que direcionem a busca pela solução de importantes problemas enfrentados atualmente como a resistência de células neoplásicas e resistência microbiana às drogas sintéticas (SOUZA; LORENZI, 2005).

Os três principais grupos de metabólitos secundários são os terpenos e esteroides, os compostos fenólicos (o qual estão inclusos neste grupo os taninos, flavonoides) e os alcalóides (PERES, 2009).

A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre na natureza, mas sob forma de ésteres ou de heterosídeo. Este fato os confere a característica de ser solúvel em água e em solventes orgânicos polares. Apresentam facilidade em se complexar a proteínas devido à capacidade de formar pontes de hidrogênio. Estes compostos contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais (SIMÕES, 2007; MOREIRA et al, 2002).

Flavonoides são compostos fenólicos que ocorrem em plantas superiores, responsáveis pela coloração das flores. São, provavelmente, a maior classe de metabólitos secundários vegetais, e apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, atuando como antifator de agregação plaquetária, atividade anti-espasmódica, entre outras (MOREIRA et al, 2002). O emprego destas substâncias ainda é empírico. Embora alguns resultados tenham mostrado que os flavonoides podem apresentar efeito mutagênico, em geral são considerados benéficos (BJELDANES; CHANG, 1977; VARGAS et al, 1990).

Os heterosídeos são compostos resultantes da ligação covalente formada entre uma ou mais unidades de açúcar e outra estrutura diferente, chamada aglicona (SIMÕES, 2007). Os heterosídeos fenólicos, em geral, são compostos sólidos, incolores e constituem substâncias de reserva dos organismos vegetais ou atuam como estimulantes. Possuem gosto muito amargo e pertencem a uma classe de compostos que envolvem uma grande diversidade de estruturas. A maioria dos heterosídeos tem aplicações terapêuticas por apresentarem atividades analgésicas, anti-séptica, diuréticas, entre outras (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991; OLIVEIRA; LUCÍA; GARCIA, 1993).

Saponinas são glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos, cujo interesse farmacológico é devido tanto à sua utilização como adjuvante em formulações, componentes ativos em drogas vegetais, com ação expectorante e poderosa ação no músculo cardíaco, sendo utilizado também como diurético, tônico, cardíaco e emético. A sua atividade mais comum é a capacidade de produzir hemólise (GLAUBERT; DINGLE; LUCY, 1962; HARUNA et al, 1995). Além das atividades antibacteriana e antifúngica, as saponinas triterpênicas apresentam atividades contra outros micro-organismos como vírus (CHAKRABORTY et al, 2002) e protozoários como *Leishmania infantum* (GERMONPREZ et al, 2005), atividade imunomoduladora realizada em animais de experimentação como cães, camundongos, porcos e primatas não humanos.

Tanino é um nome genérico descritivo para um grupo de substâncias poliméricas fenólicas capazes de curtir couro ou precipitar gelatina em solução, propriedade conhecida como adstringência. São encontradas na maioria dos órgãos vegetais, como casca, caule, folhas, frutos e raízes. Uma de suas ações moleculares é a de formar complexos com proteínas através de forças denominadas “não-específicas”, como pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas, assim como pela formação de ligações covalentes. Muitas atividades fisiológicas como a estimulação das células fagocíticas e a ação antitumoral, além de uma larga faixa de atividades antimicrobianas, têm sido atribuídas aos taninos (COWAN, 1999).

Os alcaloides são encontrados em todos os grupos de vegetais e possuem várias ações farmacológicas como, por exemplo, antibacteriana, antifúngica (HUFFORD et al, 1980), antitumoral (RIER et al, 1993) antivirais (BOUSTIE et al, 1998), citotóxica (STÉVIGNY et al, 2005), antiplaquetários (JANTAN; RAWEH; YASIN, 2006), antimaláricos (LIKHITWITAYAWUID et al, 1993), leishmanicida (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRIGUEZ, 2001) e atividades tripanocida (HOET et al, 2004). Além disso, eles são bons agentes dopaminérgicos que podem ser usados para o tratamento da doença de Parkinson, como é o caso da R-(-)-apomorfina (ZHANG et al, 2007).

Como anteriormente explanado, o crescente interesse pelos fitoterápicos fez emergir a necessidade de investigação destas substâncias por meio de estudos fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos (CRUZ, 1995; OKUNADE et al, 2004; DREWES et al, 2003; LA CRUZ, 2005). Assim, muitos trabalhos têm sido realizados com os objetivos de isolar e caracterizar os metabólitos especiais oriundos de plantas,

bem como identificar os constituintes que possuam atividades biológicas ou farmacológicas (KINGSTON, 2000; VEROTA et al, 2000). Todos estes trazem imensa evolução no tratamento de doenças pela elaboração de fitoterápicos eficientes. No entanto, a ideia que os produtos naturais não inspiram cuidados na sua administração ou posologia por não apresentam efeitos colaterais é falsa (CALIXTO, 2000). Para serem comercializados, é necessário que seus princípios ativos passem por testes toxicológicos prévios (DI STATI, 1996; LAPA et al, 2000; RODRIGUES, 2005).

2.4.2 Antimicrobianos de origem vegetal

Com o aumento de micro-organismos resistentes às drogas antimicrobianas já conhecidas, vários extratos de plantas medicinais foram testados, com a finalidade de se procurar novas drogas com atividades antimicrobianas reconhecidas. Os vegetais ricos em taninos, flavonoides e polifenóis estão entre os extratos e óleos essenciais mais testados para esta atividade.

Os extratos aquosos e acetônicos de várias plantas possuem atividade antibacteriana e parece estar relacionada ao seu teor de tanino (DJIPA *et al*, 2000). O mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos é explicado por três hipóteses. A primeira pressupõe que os taninos inibem enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexando com os substratos dessas enzimas; a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo, e a terceira fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991).

Outro importante estudo, desta vez realizado por Rauha et al (2000) obtiveram resultados efetivos quando confrontaram alguns extratos ricos em flavonoides e outros compostos fenólicos com bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, utilizando o método de difusão em Agar. Ensaio biológico usando combinações isoladas revelam que os flavonoides exibem uma grande ação sobre os sistemas biológicos demonstrando ser excelente antimicrobiano frente a bactérias, vírus e fungos (PELZER et al, 1998; MACHADO et al, 2008). Estes efeitos podem estar relacionados às propriedades inibitórias que os flavonoides desempenham nos vários sistemas enzimáticos (FERGUSON, 2001; MACHADO et al, 2008)

Ao avaliarem a atividade antimicrobiana de 13 plantas medicinais brasileiras frente às bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, Holetz et al (2002)

obtiveram resultados das Concentração Inibitória Mínima (CIM) bastante variados em 10 dos extratos testados. Quando testaram 137 extratos de espécies nativas do semiárido brasileiro que apresentavam alto teor de taninos e flavonoides, Novaes et al (2003) obtiveram eficácia em sete extratos pertencentes às famílias *Leguminosae* e *Rutaceae* contra *S. aureus* e nenhuma atividade ao testarem todos os extratos contra *E. coli*. A ação antibacteriana de extratos etanólicos de várias plantas indianas medicinais ricas em flavonoides e taninos, testadas contra bactérias multirresistentes foi comprovada em estudos realizados por Ahmad e Beg (2005).

2.5 O Câncer

A palavra câncer é de origem latina (Cancer) que significa “caranguejo”, a qual deve ter sido empregada em analogia entre a morfologia do crustáceo e ao modo de crescimento infiltrante do tumor (DE ALMEIDA et al, 2005).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2009), Neoplasia ou Câncer são nomes dados a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. O câncer é uma doença em que as células com alterações genéticas crescem de forma anormal, invadindo outros tecidos e perdendo sua função original (FENECH, 2002). Durante a vida do indivíduo, as células normais dividem-se rapidamente até atingir a fase adulta do mesmo. Já as células cancerosas diferem das células normais, pelo fato de continuarem a crescer e se dividir, não obedecendo ao controle biológico natural do organismo (HANAHA; WEINBERG, 2000). Dividindo-se rapidamente, estas células adquirem novas características genéticas que as tornam mais agressivas, determinando a formação de tumores primários ou neoplasias malignas ou câncer, com propriedades de invasão e destruição do tecido adjacente, bem como de metastatização (HANAHA; WEINBERG, 2000; INCA, 2009).

As causas primárias ainda não estão muito bem esclarecidas, mas as neoplasias surgem devido às mutações genéticas espontâneas ou induzidas por agentes indutores de patogênese como metais, radiações, radicais livres do oxigênio, inflamações crônicas e xenobióticos (tabaco, álcool, pesticidas, etc.) entre outros que promovem desordem no ciclo de multiplicação celular, ocorrendo excesso na taxa de proliferação e deficiência nas taxas de morte celular. Este processo culmina com a

formação de agrupamentos de clones de células neoplásicas, isto é, tumores (FERRARI; TORRES, 2002). Em suma, uma célula normal transforma-se em células cancerosas em decorrência de uma ou mais mutações no seu DNA, as quais podem ser congênitas ou adquiridas (RANG, 2004).

O câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo responsável até o ano de 2004 por mais de seis milhões de óbitos por ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo. Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, dos dez milhões de casos novos anuais de câncer, cinco milhões e meio são diagnosticados nos países em desenvolvimento (WHO, 2002)

O processo global de industrialização, ocorrido principalmente no século passado, conduziu a uma crescente integração das economias e das sociedades dos vários países, desencadeando a redefinição de padrões de vida com uniformização das condições de trabalho, nutrição e consumo (WATERS, 2001). Paralelamente, deu-se uma significativa alteração na demografia mundial, devido à redução nas taxas de mortalidade e natalidade com aumento da expectativa de vida e envelhecimento populacional. Este processo de reorganização global determinou grande modificação nos padrões de saúde-doença no mundo. Tal modificação, conhecida como transição epidemiológica, foi caracterizada pela mudança no perfil de mortalidade com diminuição da taxa de doenças infecciosas e aumento concomitante da taxa de doenças crônico-degenerativas, especialmente as doenças cardiovasculares e o câncer. Esta transformação do perfil epidemiológico das populações vem tornando-se, ao longo dos anos, cada vez mais complexa e de difícil entendimento, em função do aparecimento de novas doenças e o ressurgimento de antigos agravos à saúde - Aids/HIV, malária, dengue, tuberculose, entre outros - no cenário da saúde pública mundial (GUERRA et al, 2005).

As previsões mais otimistas estimam que a incidência do câncer chegue a 489.270 casos novos de câncer para os anos de 2010 e 2011, somente no Brasil (INCA, 2009). A incidência, a distribuição geográfica e o comportamento de tipos específicos de cânceres estão relacionados a múltiplos fatores, incluindo gênero, idade, raça, predisposição genética e exposição à carcinógenos ambientais (BRASIL, 2002). Os agentes ambientais possuem um papel mais proeminente na etiologia das mutações devido à introdução indiscriminada de novos produtos químicos sintéticos (BOFFETTA; FREDRICK, 2003).

Nesta conjuntura, os últimos anos trouxeram um aumento no interesse de investigação da atividade antitumoral de produtos naturais. Além do aumento nos novos casos de câncer e o grande número de aplicações farmacológicas de substâncias naturais oriundas de plantas, o limitado efeito dos medicamentos sintéticos em doenças crônicas tem estimulado à pesquisa de plantas medicinais como alternativa terapêutica ao tratamento de neoplasias, com resultados bastante satisfatórios (RATNER; BRYANT, 2004; KIDD, 2000; ALVES et al, 2004).

2.6 Agentes antitumorais vegetais

Na tentativa de evitar a evolução do câncer, existem três tipos principais de tratamento: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Com o objetivo de erradicar o câncer, normalmente se utiliza mais de um tipo de tratamento. A massa tumoral originada a partir de um único clone celular é constituída por uma população de células heterogêneas. As subpopulações de células diferem em relação a vários atributos fenotípicos, como cariótipo, responsividade hormonal e suscetibilidade a agentes antineoplásicos. Por exemplo, tumores com baixa fração de crescimento como o câncer de mama e de colo do útero possuem uma menor suscetibilidade à quimioterapia, bem como a ausência de antigenicidade das células proporciona uma maior resistência ao ataque imunológico (KUMMAR et al, 2004; DE ALMEIDA et al, 2005). Assim, no âmbito da quimioterapia, cujo objetivo primário é destruir as células neoplásicas preservando as células normais, apesar do considerável arsenal de drogas já existentes para o tratamento do câncer, em muitos casos, o sucesso terapêutico não é alcançado por causa de falhas nos esquemas terapêuticos, altos índices de recidivas e redução da sobrevida. Como os agentes quimioterápicos em sua maioria possuem um mecanismo de ação não específico, lesando células neoplásicas e normais, o aparecimento de efeitos colaterais como náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções, torna-se comum (SALMONM, 1998; NEWMAN; CRAGG, 2007).

Ainda que o organismo se recupere após o tratamento, faz-se necessário que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável, uma vez que este reflete a segurança relativa de um medicamento. O desenvolvimento de novos fármacos exige uma completa investigação da eficácia e segurança das substâncias por elas estudadas. O potencial de risco e benefício dessas

substâncias é cuidadosamente considerado, de modo que os benefícios do uso da nova molécula superem os efeitos colaterais existentes (KRISHNA et al, 1998).

As primeiras observações de regressão tumoral induzida por fármacos datam do início da década de 1940 e foram feitas com as mostardas nitrogenadas. Com o passar do tempo, novos fármacos quimioterápicos foram adicionados ao arsenal da terapia antineoplásica. No entanto, a pesquisa com plantas como fonte de agentes antitumoral somente iniciou-se na década de 1950 com o descobrimento e o desenvolvimento de alcaloides diméricos da planta pervinca (*Vinca rosea* Linn.), como a vimblastina, vincristina, vinleurosina, vinrosidina e o isolamento das podofilotoxinas. Apesar de maior atividade antitumoral e menor toxicidade, o fundamento racional da ação dessas novas moléculas estava baseado em conceitos relativamente antigos do ciclo celular. A ação se caracterizava por interromper ou perturbar etapas importantes de proliferação celular, levando as células em fase de duplicação à morte (SAMPAIO FILHO et al, 2006).

Como resultado, o Instituto de Câncer dos Estados Unidos (NCI) iniciou uma extensa coleção de plantas em 1960, focada principalmente nas regiões temperadas, estendendo-se mais tarde, 1986, a uma nova coleção de plantas e outros organismos, desta vez oriundos de regiões tropicais e subtropicais (CASSADY; DOUROS, 1980; CRAGG; NEWMANN, 2005).

Isso levou ao descobrimento de vários quimiotipos (Tabela 2.1) com atividades citotóxicas como os taxanos e camptotecinas. Atualmente uma nova geração de fármacos tem-se desenvolvido rapidamente. Esses agentes, atuando na membrana celular ou no ambiente intracelular, induzem a morte da célula neoplásica com pouco ou nenhum efeito deletério sobre outras células. Fazem parte dessa nova classe, fármacos como anticorpos monoclonais, inibidores da enzima tirosino-quinase, entre muitos outros (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Hoje, as plantas constituem uma importante fonte de compostos para a terapia do câncer e cerca de 60% dos agentes antineoplásicos utilizados na clínica, sejam as moléculas puras ou derivados sintéticos ou semi-sintéticos, são obtidos de fontes naturais, incluindo as plantas, organismos marinhos e microorganismos (CRAGG; NEWMAN, 2005; NEWMAN; CRAGG, 2007).

Tabela 2.1 – Agentes antineoplásicos de origem vegetal utilizados clinicamente.

Planta de Origem	Princípio ativo	Mecanismo de ação
<i>Camptotheca acuminata</i>	Camptotencina	Inibição da enzima Topoisomerase I (DA SILVA et al, 2003)
Derivado da camptotencina	Topotecano	Inibição da enzima Topoisomerase I (DA SILVA et al, 2003)
Derivado da camptotencina	Irinoteno	Inibição da enzima Topoisomerase I (LI et al, 2006)
<i>Catharanthus roseus</i> <i>Vinca rosea</i>	Vimblastina Vincristina	Inibição do fuso mitótico, interrompendo a divisão celular na metáfase (DE ALMEIDA et al, 2005)
<i>Taxus breviflora</i> <i>Taxus canadensis</i> <i>Taxus baccata</i>	Paclitaxel	Impede a despolimerização da tubulina (SOUZA, 2004)
Conversão semi-sintética do taxol	Docetaxel	Impede a despolimerização da tubulina (SOUZA, 2004)
<i>Podophyllum pelatum</i> <i>Podophyllum emodii</i>	Podofilotoxina	Bloqueio das fases S e G ₂ do ciclo celular e inibição da enzima topoisomerase II (DE ALMEIDA et al, 2005)
Derivado semi-sintético da epipodofilotoxina (isômero da podofilotoxina)	Etoposídeo	Inibição da enzima Topoisomerase II (McCLENDON; OSHEROFF, 2007)
Derivado semi-sintético da epipodofilotoxina (isômero da podofilotoxina)	Tenoposídeo	Inibição da enzima Topoisomerase II (McCLENDON; OSHEROFF, 2007)
<i>Bleekeria vitensis</i>	Elliptinum	Intercalação com o DNA (DUGUE; AUCLAIR; MEUNIER, 1986)
<i>Cephalotaxus harringtonia</i>	Homoharringtonina	Inibição da síntese de proteínas e indução de diferenciação (KANTARJIAN et al, 2001)

Entre as várias indicações terapêuticas, a vincristina e a vimblastina são importantes agentes clínicos para o tratamento de leucemias, linfomas e câncer testicular. A vinorelbina tem atividade contra o câncer de pulmão e de mama (ROWINESKY; DONEHOWER, 1995).

O paclitaxel, isolado pela primeira vez da casca do teixo ocidental em 1971 (WANI et al, 1971), exibe ações farmacológicas únicas como o inibidor de mitose, diferindo dos alcaloides da pervinca por promover a formação de microtúbulos ao invés de inibir. Esta droga foi aprovada, após estudos clínicos, para o tratamento de câncer ovariano, e atividade promissora contra câncer de mama, pulmão, esôfago, cabeça e pescoço (ROWINESKY; MCGUIRE; DONEHOWER, 1993; ROWINESKY; DONEHOWER, 1995).

A podofilotoxina, extraída da planta popularmente conhecida como mandrágora (*Podophyllum pelatum*, *Podophyllum emodii*) era usado pelos índios por possuir efeito emético, catárticos e anti-helmínticos. Dois glicosídeos semissintéticos do

princípio ativo podofilotoxina foram elaborados, e mostraram significativa atividade terapêutica frente a diversas neoplasias como leucemia, carcinoma de pulmão, tumores testiculares, doença de Hodgkin e linfomas. Estes derivados são denominados etoposida (Vepesid VP-16-213) (POMMIER; FESEN; GOLDWASSER, 1996).

2.7 Ensaios *in vitro*

2.7.1 Cultivo de células e tecidos

A necessidade de criar modelos experimentais fora do organismo vivo representou uma forma de adiantar resultados de modo a respeitar os conceitos éticos da medicina, além de respeitar os dogmas sócio-culturais existentes. Em relação às vantagens desenvolvidas, o processo representou uma maior economia, rapidez, segurança, além de um progresso científico e tecnológico (BELLAMY, 1992).

Iniciado no século XIX, o modelo *in vitro* nasceu da necessidade de se estudar, de forma mais detalhada, os tecidos e órgãos em suas unidades. O objetivo foi o de se reproduzir as condições existentes *in vivo* que permitissem o crescimento, em cultivo, de células normais e tumorais (CARVALHO, 1996; FRESHNEY, 2000).

O primeiro experimento com cultura de tecido organizado foi feito por Wilhelm Roux, em 1885, que isolou e manteve em solução salina aquecida, placas medulares de Galináceos. Dois anos depois, em 1887, J. Arnold cultivou leucócitos artificialmente. Em 1898, C. A. Ljunggren manteve, durante algumas semanas, fragmentos de pele humana em líquido ascítico. J. Jolly, em 1903, completou estudos mais detalhados relacionados à sobrevivência celular e divisão de leucócitos fora do organismo original. Hanau, em 1889, obteve o primeiro transplante homólogo de tumor animal espontâneo e Jensen, em 1903, relatou que um tumor espontâneo de roedor poderia ser cultivado por sucessivas gerações (PARKER, 1961; WASLEY; MAY, 1970; ASSIS et al, 2002). Carrel e Burrows (1911) iniciaram a manutenção em cultura com nutrição adequada, fibroblastos de embrião de Galináceos e tumores *in vitro*, auxiliado por Eagle (1955) e Hirschberg (1958), que também se dedicaram ao estudo dos requerimentos nutricionais para células animais.

Hoje, testes *in vitro* têm ampla utilização na pesquisa relacionada à atividade citotóxica de produtos de origem natural e/ou de síntese (BELLAMY, 1992; CARVALHO, 1996).

2.7.2 Linhagens de células neoplásicas (HEp-2 e NCI-H292)

Atualmente, graças aos progressos tecnológicos alcançados, podemos cultivar, em laboratório, uma gama de células normais (FRESHNEY, 2007) e também células tumorais (EAGLE, 1995). Diversas linhagens multiplicam-se *in vitro* facilmente, apresentando grande número de células uniformes. Dentre elas, a linhagem NCI-H292, derivada da metástase de nódulos linfáticos de carcinoma mucoepidermoide pulmonar. Estas células foram isoladas em um meio definido quimicamente (HITES - inicialmente contendo cinco fatores de suplementação para o crescimento: hidrocortisona, insulina, transferrina, estradiol e selênio), com posteriores adaptações para crescimento em meio suplementado com soro (SIMMS et al, 1980). Novos registros afirmam que esta linhagem originou-se de fragmentos sub-genômicos transfectados no interior de células humanas em estudos com HBV – vírus da Hepatite B, e seus genes individuais na patogênese do câncer de fígado e hepatite viral (GOLDIN et al, 1979; GIULIANI et al, 1979; FÁVARO et al, 1990; MORIER et al, 1996).

Além desta, a linhagem HEp-2 (Human Epidermoide Cancer Cells) é bastante utilizada. São células derivadas de um tumor primário de laringe humana. Elas foram observadas inicialmente em 1952 por Moore, Sabachewsky e Toolan (1955) a partir de tumores que tinham sido produzidos em ratos irradiados e tratados com cortisona, recém desmamados, após a inoculação com tecido carcinoma epidermoide de laringe de um homem de 56 anos de idade. A linhagem HEp-2 é caracterizada pela alta resistência, uma vez que resiste à mudanças nutricionais, ambientais e de temperatura sem perda de viabilidade (TOOLAN, 1954). Estas células forneceram suporte ao desenvolvimento de 10 das 14 arbovirose (BEARD, 1957) e vírus do sarampo (BLACK; MELNICK; REISSIG, 1956), e tem sido utilizado em ensaios de citotoxicidade, atividade antineoplásica de fármacos (PLAERMO; SOVADINOVA; KURODA, 2009; VARAMINI et al, 2009; MOO-PUC; ROBLEDO; FREILE-PELEGRÍN, 2009; CHENG et al, 2010; DOS SANTOS et al, 2010; LI et al, 2010; FAHMY et al, in press 2010).

Assim, sob a conjuntura exposta, é possível relatar que cultura de tecidos tem, ao longo da história, ajudado a conquistar avanços biotecnológicos e científicos, na indústria farmacêutica, na agroindústria e na pecuária, na engenharia genética e orientados estudos em biologia molecular, mostrando-se como uma alternativa a modelos em animais (BELLAMY, 1992; CARVALHO, 1996).

2.7.3 Importância e vantagens dos ensaios “*in vitro*”

Uma droga ideal para o combate ao câncer seria aquela tóxica para células cancerosas, mas pouco prejudicial às células normais. Em sua maioria, as drogas antineoplásicas são bastante lesivas para o organismo que a recebe, fato que justifica a validade dos ensaios de citotoxicidade como triagem preliminar (FÁVARO et al, 1990).

Um fator primordial para verificar a aplicação farmacológica de uma substância fitoterápica é a realização de uma análise comparativa entre a atividade biológica e a toxicidade desta substância. Existe uma tendência normativa que condiciona a liberação de novas drogas, cosméticos, aditivos alimentares e outras matérias primas à exaustiva bateria de testes de toxicidade (FRESHNEY, 1994; MELO; DURÁN; HUAN, 2001)

Testes *in vivo* aplicados à cancerologia experimental têm sido os mais recomendáveis, apesar de serem dispendiosos, com respostas não muito rápidas. Os ensaios *in vitro* eliminam estes problemas, mas exigem confirmação *in vivo*. Não obstante, a necessidade da resposta *in vivo*, os testes *in vitro* auxiliam a triagem de substâncias naturais com potencial ação antineoplásica. Estes ensaios permitem a análise de um grande número de amostras, viabilizando a localização dos princípios ativos em determinadas frações obtidas durante o processo de extração de produtos de origem natural (FÁVARO et al, 1990; RODRIGUES, 2001; FRESHNEY, 2005)

Atualmente, um dos debates éticos em ampla evidência está relacionado ao uso de animais em experimentos laboratoriais. Adicionalmente, além da questão ética, existe um fator financeiro envolvido nos estudos de toxicidade *in vivo*. Uma das soluções para essa problemática sugere a realização de ensaios de toxicidade *in vitro*, fortemente recomendados para a realização da fase preliminar de testes, com o intuito de prever o potencial tóxico de uma substância, utilizando-se, posteriormente, um menor número de animais experimentais (FRESHNEY, 1994; MELO; DURÁN; HAUN, 2001). O sistema permite a análise imediata do impacto destes compostos sobre a célula, fornecendo respostas rápidas, importantes na seleção destes novos fármacos (BELLAMY, 1992; CARVALHO, 1996), bem como fornece análise do impacto de diferentes produtos ao mesmo tempo, reduzindo o uso de animais de experimentação, além de permitir observar o poder mutagênico dos fármacos em células de mamíferos (EVANS et al, 1984; ISHIDATE; HARNOIS; SOFUNI, 1988; AGUILAR-SANTAMARÍA et al, 2007).

Espera-se que, se um produto produz efeitos deletérios *in vitro*, em diferentes linhagens celulares, algum efeito deve ser previsível quando o produto for utilizado no animal. Outra grande vantagem é a disponibilidade atual de uma grande variedade de linhagens em bancos de células, possibilitando maior acesso à utilização de modelos *in vitro* (CHU, 1995).

Embora modelos desenvolvidos em computadores, animais inferiores, órgãos isolados ou culturas celulares, todos apresentam grande limitação e, em grande parte, não podem ser considerados alternativas satisfatórias, nem razoáveis, para substituição dos testes com animais. Conquanto alternativas viáveis e substitutivas ao seu uso devam ser continuamente buscadas, torna-se imperativo adotar dispositivos regulamentares lúcidos e realistas que garantam a continuação da utilização de animais no ensino e na pesquisa científica. Tudo isso por que a pseudomoralidade muitas vezes utilizada como subterfúgio para tentar diminuir a grandiosidade do incontestável conhecimento advindo da experimentação com animais, não pode negar que eles prestaram e prestam grandes benefícios à humanidade. Atualmente, os animais são utilizados nos processos do ensino e da pesquisa científica e, com o conhecimento que dispomos até então, eles continuam sendo indispensáveis a essa prática (MARQUES et al, 2005).

2.7.4 Citotoxicidade

Toxicidade é um evento complexo expresso em um largo espectro de efeitos, que variam desde simples morte celular até mudanças metabólicas complexas como neuro, hepato e/ou nefrotoxicidade, onde não há morte celular necessariamente, mas sim alterações funcionais. Devido a essas considerações, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* devem abranger diversos parâmetros que avaliem diferentes alvos celulares (ROGUET et al, 1993). Estudos *in vitro* fornecem importantes ferramentas para ampliar os conhecimentos sobre os efeitos citotóxicos causados por agentes químicos e para estimar estes efeitos *in vivo* (EISENBRAND et al, 2002).

Alguns testes, como por exemplo, a análise de incorporação do corante vermelho neutro (2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenanzina), a redução do MTT [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio)], a exclusão do azul de tripan, o conteúdo de ácido desoxirribonucleico (DNA), e a atividade das fosfatases, têm adquirido atenção considerável como indicativos de citotoxicidade. Estes ensaios

forneem informações sobre diferentes funções ou compartimentos celulares (RENZI; VALTOLINA; FORSTER, 1993).

Um dos procedimentos largamente utilizados para avaliar a citotoxicidade é o ensaio de redução do MTT. O MTT é um corante amarelo, que é reduzido por células que mantêm a integridade mitocondrial para um composto azul (formazan), insolúvel em solução aquosa. Nesse caso, a função metabólica celular é avaliada através da redução enzimática do MTT, principalmente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SLATER et al, 1963), obtendo-se informações sobre a integridade funcional dessa organela. Somente células viáveis reduzem o MTT para o formazan, e portanto, a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis presentes (DENIZOT; LANG, 1986; MOSMANN, 1983).

Muitos ensaios utilizam a *Artemia salina* (um microcrustáceo de água salgada) para comprovar citotoxicidade numa investigação primária (LUNA et al, 2005, BRASILEIRO, 2006). No entanto, a atividade citotóxica de novas drogas em células de linhagens tumorais ainda tem importância primordial para a sua investigação farmacologia.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Realizar estudos fitoquímico, microbiológico e citotóxico *in vitro* dos extratos da casca do caule de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. Cebil (Griseb.) Von Reis Alt.

3.2 Objetivos Específicos:

3.2.1 Identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes nas cascas do caule de *A. colubrina*;

3.2.2 Obter frações ciclo-hexânica, acetato de etila e hidroalcólico a partir do extrato etanólico bruto das cascas do caule da *A. colubrina*;

3.2.3 Determinar a concentração de fenois totais e flavonoides nas frações hidroalcoólico e acetato de etila da casca do caule de *A. colubrina*;

3.2.4 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações ciclohexânica, acetato de etila e hidroalcólica da casca do caule de *A. colubrina*, frente à bactérias multirresistentes e de coleção: *Staphylococcus aureus* (n=10), *Pseudomonas aeruginosa* (n=10), *Shigella sonnei* (n=5), *Salmonella* entérica (n=4) e *Escherichia coli* (n=1), e sobre 10 cepas de *Cândida albicans*;

3.2.5 Determinar *in vitro* a atividade citotóxica dos extratos da casca do caule de *A. colubrina* frente a duas linhagens de células neoplásicas: carcinoma de pulmão (NCI-H292) e células derivadas de tumor primário de laringe (HEp-2).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Botânico:

Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan var. Cebil (Griseb.) von reis Alt. foi coletada na Fazenda Jatobá, Município de Serra Talhada – PE(07°59'31"S-38°17'54"W) em fevereiro de 2009. Identificada pela equipe de botânicos do herbário pertencente ao Departamento de Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco com exsicata tombada sob nº PE UFR-49643. A madeira foi desidratada em temperatura ambiente por 15 dias (Simões et al, 2007; ROBBERS, SPEEDIE e TYLER, 1997). O material vegetal utilizado na pesquisa foi a casca do caule, que foram moídas para a obtenção do pó com granulometria diminuta, posteriormente pesado e acondicionado em saco plástico até a preparação dos extratos.

4.2 Obtenção das frações e estudo fitoquímico:

A produção de extratos, bem como o estudo fitoquímico de *A. colubrina* foi realizado no Laboratório de Fitoquímica no Departamento de Antibióticos da UFPE, sob a supervisão da Prof^a. Dr. Márcia da Silva Nascimento.

4.2.1 Obtenção das Frações

A extração foi realizada com uma massa inicial de 265,3g da casca do tronco de *A. colubrina* pulverizada e adicionando-se a ela 2 litros de etanol a 95% (EtOH), por um período 20 dias, sendo realizadas trocas do solvente em dias alternados durante esse período. Este procedimento foi realizado a temperatura ambiente e sob proteção da luz (Figura 1). O extrato bruto etanólico foi concentrado em evaporador rotativo e seu rendimento calculado.

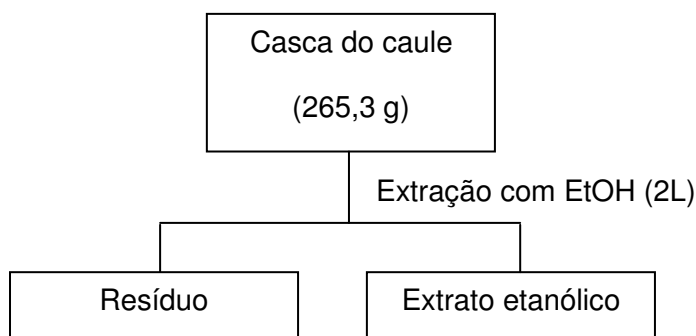


Figura 4.1 - Obtenção do extrato bruto etanólico

Posteriormente, o extrato etanólico foi dissolvido em Etanol/H₂O 1/1 v/v e realizado uma extração líquido-líquido primeiramente com ciclohexano (C₆H₁₂) e em seguida com acetato de etila (AcOEt), com auxílio de um funil de separação. As frações obtidas foram concentrados em evaporador rotativo e seus rendimentos calculados (Figura 4.2).

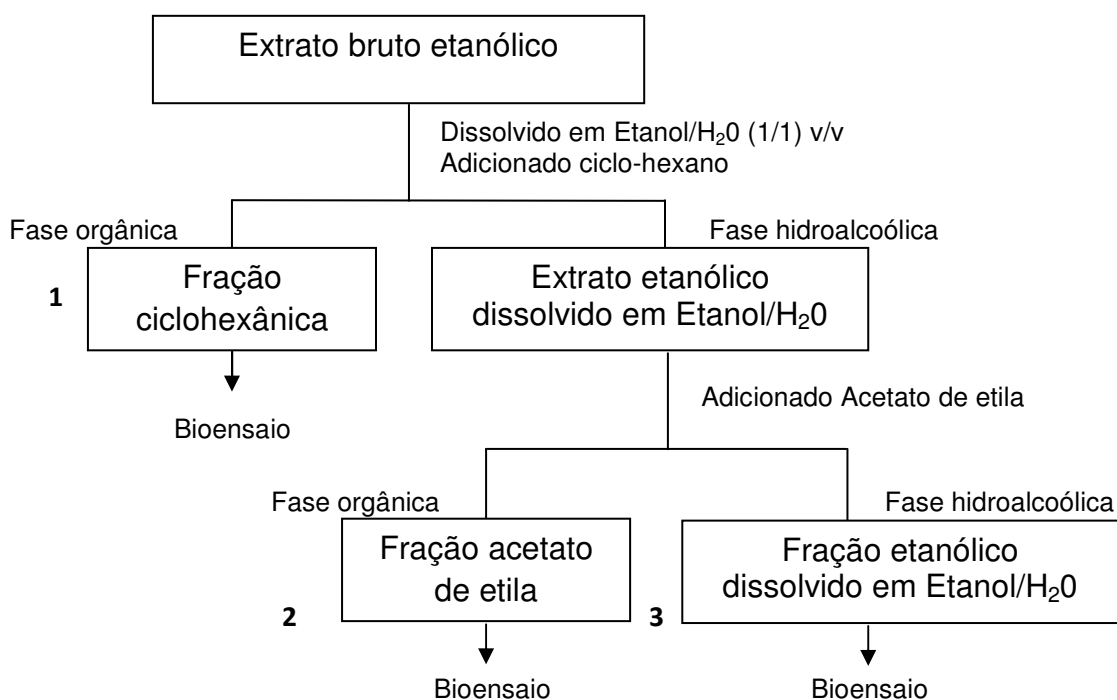


Figura 4.2 - Protocolo panorâmico de obtenção das frações ciclohexânica e acetato de etila.

4.2.2 Abordagem Fitoquímica da Casca do Caule

Foi realizada análise qualitativa das principais classes de compostos presentes na casca do caule de *A. colubrina*. Os ensaios foram realizados seguindo as metodologias descritas por Costa (1982), Schneider (1990) e Domínguez (1973), para identificar as principais classes de metabólitos secundários (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Testes de identificação das principais classes de compostos fitoquímicos.

Classes de Compostos	Testes
Saponina	Espuma (COSTA, 1982)
Taninos	Cloreto Férrico (SCHNEIDER, 1990)
Alcaloides	Dragendorff, Meyer (DOMINGUEZ, 1973)
Flavonoides	Shinoda, oxalo-bórica (DOMINGUEZ, 1973)
Terpenos e Esteroides	Liebermann-Buchard (COSTA, 1982)

4.2.3 Ensaio quantitativo específico

4.2.3.1 Determinação de Fenois totais

A determinação do teor de fenois totais presente nas frações hidroalcóolica e acetato de etila obtidas da casca da espécie em estudo foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu descrito por Folin e MacCallum (1912).

Para este ensaio foi pesado 11,40 mg da fração hidroalcóolica e 235,5 mg da fração acetato de etila, ambos obtidos de 1g da casca do caule e adicionados a 30 mL de um sistema composto por metanol/água (8:2 v/v). Estas preparações tiveram seus volumes reduzidos em evaporador rotativo até a eliminação do metanol. Em seguida, uma alíquota de 50 µL de cada fração foi coletada e diluída em 25 mL de água destilada. Logo após, dessas novas soluções, foram retiradas alíquotas de 500 µL para os tubos de ensaio e a estes tubos foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio 7,5%.

A solução de referência (controle) foi composta por uma mistura do reagente de Folin-Ciocalteu 10% (2,5 mL) com Na₂CO₃ a 7,5% (2,0 mL) e 500 µL de água destilada.

Todas as preparações foram aquecidas banho-maria a 50°C por 5 minutos e em seguida analisadas em um espectrofotômetro UV/visível Hewlett Packard - HP-8453E em comprimento de onda de 760 nm. Este ensaio foi realizado em triplicata.

A concentração de fenois totais foi determinada por interpolação da absorbância da amostra tendo como base a curva de calibração construída com padrões de Ácido Gálico monohidratado (MERK, Darmstadt – Alemanha. Grau de pureza 98%), nas concentrações de 0,78; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL. O resultado foi expresso como mg de EAG (equivalente de Ácido Gálico) por g da fração. A concentração de fenois totais na amostra foi determinada através da equação da reta, obtida da curva padrão do Ácido Gálico.

4.2.3.2 Determinação de flavonoides

A determinação da concentração de flavonoides foi realizada de acordo com a metodologia de Woisky (1996) modificada, utilizando a rotina (MERK, Darmstadt – Alemanha. Grau de pureza 100%) como padrão, em solução de cloreto de alumínio (VETEC). Foram diluídos 22,8 mg da fração hidroalcóolica e 471 mg da fração acetato

de etila, ambos obtidos de 2g do pó da casca de *A. colubrina* em 150 mL de metanol (MeOH) 70 %. Em seguida estas frações foram filtradas e os volumes completados para 250 mL com metanol. Uma alíquota de 15 mL de cada fração foi transferida para um balão volumétrico com capacidade para 50 mL e a cada uma delas adicionado 1 mL de uma solução de cloreto de alumínio (5 g de cloreto de alumínio em 100 mL de metanol) (MARKHAM, 1982) e em seguida os volumes foram completados com metanol. Após repouso de 30 minutos, foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV/visível Hewlett Packard (HP – 8453E) em comprimento de onda de 425 nm. Este ensaio foi realizado em triplicata.

Os resultados obtidos com a leitura da absorbância das amostras foram comparados com uma curva padrão construída a partir de soluções com concentrações crescentes de rutina, para isso uma solução padronizada de Rutina a 100 µg/mL foi preparada em MeOH a 70%. A partir desta solução foram obtidas soluções de concentração equivalentes 11; 12; 13; 14 e 15 µg/mL que foram acrescidas de 1 mL de cloreto de alumínio e completadas para 50 mL com MeOH 70% para preparação da curva-padrão.

4.3 Atividade Antimicrobiana

O estudo da atividade antimicrobiana foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE, sob a supervisão da Prof^a. Dr. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.

4.3.1 Preparações e padronização das frações

As frações hidroalcóolica, cicohexânica e acetato de etila foram analiticamente pesadas (10 mg) e solubilizados em um sistema composto por DMSO (dimetil sulfóxido 10%)/Tween80/água (1:1:8), a fim de obter soluções padronizadas de concentração igual a 1000 ug/ml. Em seguida foram esterilizados por filtração utilizando membrana millipore de porosidade 0,45µm de diâmetro.

4.2.1 Micro-organismos

Neste experimento foram utilizados 40 microrganismos alguns deles obtidos a partir de espécimes de pacientes acometidos por infecções e com um fenótipo de

resistência para diversos agentes antimicrobianos: *Staphylococcus aureus* IQ 13, IQ 14, IQ 15, IQ 16, IQ 17, IC 27, IC 138, IC 311, IC 404; *Pseudomonas aeruginosa* IC 01, IC 02, IC 03, IC 04, IC 05, IC 06, IC 10, IC 12, IC 13; *Candida albicans* IC SIBELE, IC AM 1, IC AM 2, IC AM 3, IC AM 4, IC AM 5, IC AM 7, IC 03, IC 25; *Shigella sonnei* IC 01, IC 02, IC 03, IC 04; IC 05; *Salmonella enterica* IC 391, IC 3373 e 5 microrganismos pertencentes à coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e do American Type Culture Collection (ATCC), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028, *Salmonella enterica* UFPEDA 415, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (Tabela 2).

4.3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) das frações de *A. colubrina*

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de "U". Um volume de 200 µL das frações vegetais foram depositados nas colunas de 1 a 10 da linha A. Os demais orifícios foram preenchidos com 100 µL de caldo Mueller-Hinton (Merk, Darmstadt, Germany) para as bactérias e o meio RPMI 1640 para leveduras. Em seguida, uma diluição dos extratos foi realizada pela transferência de uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada orifício da linha A para os orifícios da linha B, e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para a linha C, e assim sucessivamente, até a linha H, e desprezando-se após homogeneização o excesso da diluição. Assim foram obtidas soluções com concentrações decrescentes das frações equivalente à 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,625 µg/mL e 7,81 µg/mL. Os inóculos microbianos foram padronizados (10^8 UFC/mL) utilizando um tubo 0,5 de McFarland diluídos 1/10 em água destilada. Em seguida um volume de 5 µL (10^4 UFC/mL) dos inóculos foram depositadas em todos os orifícios das linhas A-H. Os orifícios da coluna 11 e 12 foi destinado para o testes de controle do experimento. A coluna 11 serviu como controle negativo da atividade inibitória dos diluentes (DMSO/tween 80/água), utilizado na diluição das frações. Os orifícios da coluna 12 receberam apenas o caldo Mueller-Hinton e o inóculo microbiano, possibilitando o controle positivo da viabilidade microbiana. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas. A revelação do crescimento bacteriano ou da inibição foi observada pela adição

de uma solução aquosa a 0,5% de cloridrato de 2,3,5 trifenil tetrazólio (TTC) (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil). As enzimas oxidativas presentes nas membranas celulares dos micro-organismos vivos reagem com o TTC oxidando-o, e provocando a mudança de coloração de incolor (forma reduzida) para vermelho de formazan (forma oxidada). As microplacas foram novamente incubadas por mais três horas a 35°C. Após esse intervalo de tempo, a leitura da placa foi realizada: a presença de uma coloração vermelha nos orifícios foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório do extrato, ou seja, houve crescimento bacteriano; enquanto que a ausência de cor foi considerada prova positiva da ação antimicrobiana dos extratos.

A CIM foi definida como a menor concentração das frações em mg/mL capaz de impedir o crescimento microbiano (ou seja, o aparecimento da coloração vermelha) (Figura 4.3) (COURVALIN et al, 1985; LORIAN, 1996; MOURA, 2006).

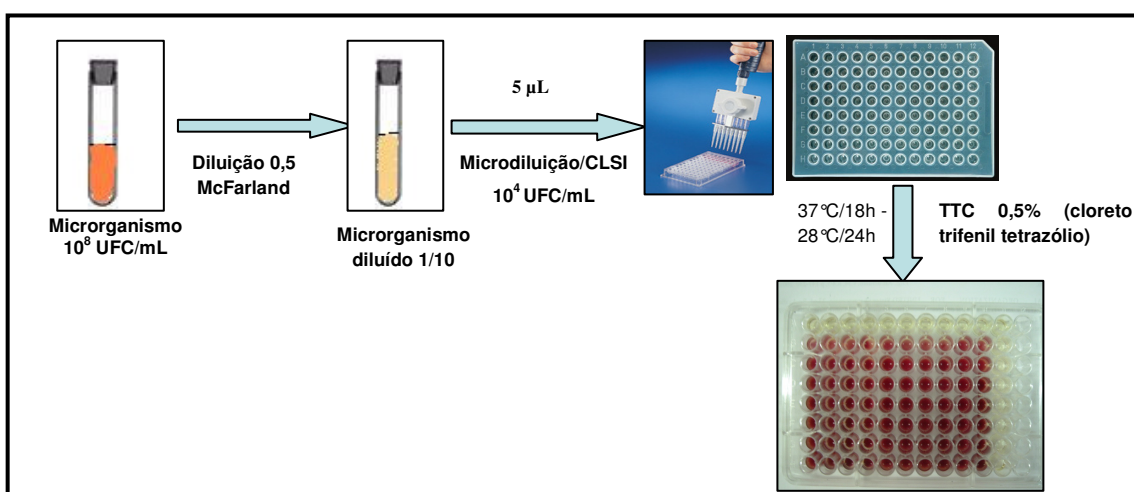


Figura 4.3 – Esquema de determinação do CIM das frações de *A. colubrina*.

Segundo critérios utilizados por Holetz et al (2002) e Tanaka et al (2005), os valores da CIM compreendidos entre 10 e 100 µg/mL são considerados boa atividade de frações, entre 500 e 1000 como atividade fraca e >1000 µg/mL, sem atividade.

Tabela 4.2 – Origem e perfil de susceptibilidade dos micro-organismos utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima.

Microrganismos	Origem	Resistência	Sensibilidade
<i>S. aureus</i> IC 404	Secreção da orofaringe	GEN; AMI; CFO; CTX; CLO; ERI; TET	CIP
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	ATCC	ND	NIT; LMX; VAN; NET; RIF; AZI; SUT; OFX
<i>S. aureus</i> IC 14	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i> IC 15	ND	AMP; CFO; ERI; AMOX	IMP; SZT
<i>S. aureus</i> IC 27	ND	AMP; CFO; ERI; AMOX	IMP; SZT
<i>S. aureus</i> IC 138	Secreção vaginal	AMI; GEN	CTX; ERI; CLO
<i>S. aureus</i> IC 247	ND	AMP; CFO; ERI; AMOX	IMP; SZT
<i>S. aureus</i> IC 311	Ferida do dedo	GEN; AMI; CFO; CTX; CLO; SZT; ERI; TET; PEN	CIP
<i>P. aeruginosa</i> IC 01	Hemocultura	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER	ATM
<i>P. aeruginosa</i> IC 02	Secreção hepática	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER; SZT	ATM
<i>P. aeruginosa</i> IC 03	Secreção traqueal	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER	ATM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IC 05	Hemocultura	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; ATM; MER; SZT; AMP+SUB	ND
<i>P. aeruginosa</i> IC 06	Secreção traqueal	CIP; GAT; GEN; CFL; CFO; CTX; COM; CLO; ATM; MER; SZT; AMP+SUB	ND
<i>P. aeruginosa</i> IC 10	Secreção abdominal	MAI; CFL; CFO; CTX; CPM; CIP; GEN; TOB; ATM; IMP; MER; SZT	ND
<i>P. aeruginosa</i> IC 12	Urina	AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CIP; GENT; TOB; ATM; IMP; MER; SZT; NIT; NAL; CLO; TET	ND
<i>P. aeruginosa</i> IC 13	Urina	CFL; CFO; CTX; CIP; GEN; TOB; SZT; NIT; NAL; CLO; TET; NOR	MER
<i>P. aeruginosa</i> IC 16	Hemocultura	GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER; SZT; AMP+SUB; ATM	ND
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	ATCC	ND	ND
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 14028	ATCC	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> UFPEDA 415	Coleção de micro-organismos do UFPEDA	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> Rubislaw 3373	IC	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> Saintpaul 391	IC	ND	ND
<i>Salmonella</i> entérica P-58	IC	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> 873	Isolado do molusco (<i>Biomphalaria glabrata</i>)	ND	ND
<i>C.albicans</i> IC 01	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 07	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 09	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 11	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 12	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 16	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 17	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 19	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 25	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 26	Cavidade oral	ND	Miconazol

AMI: Amicacina 30 µg; AMOX: Amoxicilina 10 µg; AMP: Ampicilina 10 µg; AMP+SUB: Ampicilina/Subctam 10 µg /10 µg; ATM: Aztreonam 30 µg; AZI: Azitromicina 15 µg; CFL: Cefalotina 30 µg; CFO: Cefoxitina 30 µg; CIP: Ciprofloxacina 5 µg; CLO: Clorafenicol 30 µg; CPM: Cefepime 30 µg; CTX: Cefotaxima 30 µg; ERI: Eritromicina 15 µg; GAT: Gatifloxacina 10 µg; GEN: Gentamicina 10 µg; NAL: Ácido nalidíxico 30 µg; NIT: Nitrofurantoina 30 µg; NOR: Norfloxacina 10 µg; IPM: Imipenem 10 µg; MER: Meropenem 10 µg; TEIC: Teicoplanina 30 µg; TET: Tetraciclina 30 µg; TOB: Tobramicina 10 µg; SZT: Sulfazotrim 25 µg; VAN: Vancomicina 30 µg. ATCC: American Type Culture Collection.IC: Isolado clínico ND: Não determinado

4.4 Ensaio de Citotoxicidade *in vitro*

4.4.1 Células neoplásicas utilizadas nos testes

Os testes de citotoxicidade foram realizados frente a duas linhagens de células: células NCI-H292 e HEp-2 obtidas do Laboratório de Cultura de Células, do Departamento de Antibióticos da UFPE.

As células NCI-H292 correspondem a uma linhagem contínua de células mucoepidermoides, obtida a partir de carcinoma de pulmão humano. As células HEp-2 (Human Epidermoide Câncer Cells) são derivadas de tumor primário de laringe humana.

4.4.2 Atividade citotóxica

Para determinação da citotoxicidade, foi realizado o ensaio de proliferação celular através do teste colorimétrico do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (Invitrogen, Carlsbad – EUA) (JADA et al., 2002; CULIOL et al., 2004). O princípio desse método consiste na absorção do sal MTT pelas células sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto chamado formazan.

As células foram mantidas em DMEM - Minimum Essencial Medium Eagle modificado Dulbecco's (Sigma, St. Louis - EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis - EUA), 1% de solução de antibiótico [penicilina 1000 UI/mL (Sigma-Aldrich St. Louis – EUA) + estreptomicina 250 mg/mL (Sigma-Aldrich St. Louis – EUA)] e 1% de L-glutamina 200mM (Sigma-Aldrich St. Louis – EUA) (EAGLE,1995).

Uma suspensão celular de 10^5 células/mL foi preparada em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200mM. A suspensão foi distribuída em placas de cultura com 96 poços (220µL em cada poço). As placas foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera úmida enriquecida com CO₂ a 5%. Após 24h as frações foram adicionadas (22 µL/poço) nas concentrações finais de 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL e as placas novamente reincubadas.

Após 72 h de contato das células com o produto teste, foi adicionado 25 µL de MTT (brometo (3-[5,4-dimetiltiazol-2- il]-2,5-difeniltetrazólio) na concentração

de 5 mg/mL em PBS (p/v) em cada poço e as placas foram deixadas por duas horas em estufa 37 °C. Ao final desse período, o meio de cultura, juntamente com o excesso de MTT foram aspirados e em seguida, 100µL de DMSO foi adicionado a cada poço para dissolução dos cristais de Formazan (cor púrpura)(MOSMANN,1983).

A leitura óptica foi feita em leitor automático de microplacas do tipo Termo Plate (450 nm) e a densidade óptica (DO) média dos poços foi comparada com a DO média dos poços controles.

A CI_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle) foi determinada a partir de uma regressão não linear utilizando o programa Prisma 4.0 (GraphPad software) , onde se relacionou o percentual de inibição em função do logaritmo das concentrações testadas admitindo-se um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,01$).

4.5 Análise Estatística

Para análise dos resultados microbiológicos, os dados obtidos foram agrupados em médias geométricas, uma vez que o ensaio utilizou o método de diluições seriadas. Para o ensaio de citotoxicidade em células tumorais, a determinação do IC_{50} foi realizada através da construção de um gráfico dose-resposta, usando a curva sigmoide. Todos os dados foram processados pelo Excel® produzido pela Microsoft, pelo Bioestat® 5.0 de distribuição gratuita e OriginPro8SRO® produzido pela OriginLab Corporation.

5 Resultados

***Artigo Original:* ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE EXTRATOS DA CASCA DO CAULE DE ANADENANTHERA COLUBRINA.**

Artigo Original:

LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY

Qualis – B1 Medicina II

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DE FRAÇÕES DA CASCA DO
CAULE DE *ANADENANTHERA COLUBRINA*.**

C.R. Weber¹, C. M. L. Soares¹, L. S. de Oliveira²; A. B. D. Lopes²; T.S. Silva³; M.S. Nascimento³; E.C.P.A. Ximenes³.

Departamento de Antibióticos – Centro de Ciências Biológicas – UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

¹ Alunos do Programa de Pós-graduação em Patologia – UFPE

² Alunos do Programa de Pós-graduação Química – UFPE

³ Docentes do Departamento de Antibióticos – UFPE

Autor de correspondência:

Carlos Roberto Weber Sobrinho

Av. Prof. Moraes Rego - S/N - Cidade Universitária - HC - Bolco A – Térreo

CEP:50740-900, Recife/ PE– Brasil. E-mail: carlosrws@gmail.com

Fone/ Fax: 55 (81) 2126-8527

RESUMO

Objetivos: A resistência de micro-organismos e células tumorais aos fármacos de uso contínuo é um problema mundial de saúde. Este estudo visou determinar IC₅₀ e CMI de extratos do caule de *Anadenanthera colubrina* frente às linhagens de células tumorais humanas, bactérias e fungos multi-drogarresistentes.

Métodos e Resultados: Foi realizada preparação das frações com etanol-água (70%), ciclohexano e acetato de etila. Foi realizada análise fitoquímica qualitativa e dosados compostos fenólicos totais e flavonóides. Para a determinação da CIM foi utilizada a técnica de microdiluição revelada com TTC e para a citotoxicidade foi utilizada a técnica do MTT.

Conclusões: A avaliação fitoquímica demonstrou presença de taninos hidrolisáveis, flavonoides e terpenos. A quantidade de fenóis e flavonóides na fração hidroalcoólica foi de 177,85mgEAG/g e 13,48mgER/g respectivamente, na fração acetato de etila de 171,26 mgEAG/g e 34,16 mgER/g, respectivamente. Das três frações obtidas, a hidroalcoólica apresentou maior atividade antimicrobiana frente às espécies de bactéria e levedura estudadas e a ciclo-hexânica foi a única a apresentar atividade citotóxica frente às células tumorais HEP-2 e NCI-H292.

Significado e impacto do estudo: Os resultados abrem perspectivas futuras para isolamento de substâncias de *A. colubrina* e sua utilização no tratamento do câncer e infecções por micro-organismos multirresistentes.

INTRODUÇÃO

As plantas sintetizam uma grande variedade de metabólitos secundários, cuja função está relacionada à manutenção da integridade e sobrevivência da planta, e apresentam ação terapêutica importantes com atividade antimicrobiana e antitumoral (Hartmann 2007). Na última metade do século XX, a utilização destes compostos obteve mais aceitação pela comunidade científica, sendo crescente o número e a natureza das abordagens sobre o tema (Ríos e Recio 2005). Muitos estudos da atividade antimicrobiana de frações vegetais foram encorajados pela crescente resistência dos micro-organismos às diversas classes de antibióticos utilizados na rotina (Al-Bakri e Afifi 2006; Schweizer 2009; More et al. 2008; Zampini et al. 2009), assim como o estímulo a pesquisa da atividade antitumoral de plantas sofreu impacto da busca por menores agressões a células saudáveis (Nogueira et al. 2008; Gurgel et al. 2009).

Anadenanthera colubrina é uma leguminosa nativa da América do Sul e ocorre desde o norte da Colômbia até o sul do Brasil. Informações farmacológicas sobre esta espécie podem ser encontradas na literatura, onde é conhecida por sua atividade anti-inflamatória e sua ação sobre o sistema respiratório (Monteiro et al. 2005). A sua atividade antitumoral carece de uma investigação mais aprofundada, uma vez que tal propriedade já foi identificada em estudos prévios (Moretão et al. 2003; Moretão et al. 2004). Em paralelo, sabendo-se que a planta é rica em compostos que possuem atividade antimicrobiana, por exemplo, alcaloides, terpenos e compostos fenólicos (Albuquerque et al. 2007), sendo necessário conhecer e divulgar os potenciais antimicrobianos, bem como discutir os mecanismos envolvidos neste fenômeno. Assim, o presente estudo teve por objetivo realizar uma análise fitoquímica das frações da casca do caule de *A. colubrina* e avaliar sua atividade antimicrobiana frente a linhagens de micro-organismos multirresistentes e sua atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais humanas HEP-2 e NCI-H292.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Botânico

Foi utilizada casca do caule de *A. colubrina* coletada no Município de Serra Talhada, Pernambuco, Brasil (07°59'31"S- 38°17'54"W). A espécie identificada no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal Rural de Pernambuco com exsicata tombada sob n° PE UFR-49643. As cascas do caule foram desidratadas em temperatura ambiente e pulverizadas.

Caracterização fitoquímica

Obtenção das frações da casca do caule de A.colubrina

Foram preparadas três frações utilizando solução hidroalcoólica, solvente ciclohexano e acetato de etila. Em 265,3g da casca do caule de *A. colubrina* foram adicionados 2 L de etanol-água (70%) para obtenção do extrato bruto. A mistura foi filtrada com papel de filtro Whatman n ° 4 e concentrado sob pressão reduzida a 40°C. Em seguida, o extrato bruto foi particionado adicionando os demais solventes de diferentes polaridades, sendo o último o acetato de etila.

Ensaios fitoquímicos qualitativos e quantitativos

Foi determinada a presença de saponinas, taninos, alcaloides, flavonoides, terpenos e esteroides, através dos métodos da espuma, cloreto férrico, Dragendorff-Meyer, Shinoda e Liebermann-Buchard, respectivamente, como descrito por Costa (1982).

A determinação de flavonoides foi feita de acordo com .A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu (Folin, 1912. Os dados de absorbância foram comparados a curva padrão construída a partir de soluções com concentrações crescentes de rutina (MERK, Darmstadt – Alemanha. Grau de pureza 100%) e ácido gálico (MERK, Darmstadt – Alemanha. Grau de pureza 98%). A concentração de fenóis totais e de flavonoides foi calculada como equivalentes de ácido gálico (GAE) e equivalente de rutina (ER) por g de extrato bruto. As análises foi feitas em triplicata.

Ensaios de atividade Antimicrobiana

Foram selecionadas um total de 40 linhagens de *Staphylococcus aureus* (n=10), *Pseudomonas aeruginosa* (n=10), *Candida albicans* (n=10) , *Shigella sonnei* (n=5), *Salmonella entérica* (n=4) e *E. coli* (n=1) multidrogarresistente. Esses agentes foram isolados a partir de amostras de sangue, urina e secreções e lavados bronco-alveolares, apresentando o perfil de sensibilidade e resistência demonstrado na Tabela 1. Para fins comparativos, micro-organismos ATCC foram incluídos neste trabalho. Os isolados bacterianos foram mantidos em Agar Müeller-Hinton (Merk, Darmstadt, Alemanha) e os isolados fúngicos mantidos em Ágar Sabouraud (Merk, Darmstadt, Alemanha) à 4°C.

A determinação da CIM foi realizada em microplacas estrereis (TRP-92096) de 96 orifícios e para cada micro-organismo foi realizado ensaio em duplicata. Um volume de 200 µL das diversas frações, preparados na concentração de 1000 µg/mL tendo como base o sistema composto por água aquecida a 60°C e Tween 80 e DMSO 10% (8:1:1). Todas as frações foram esterilizadas em filtro millipore 0,45µm. Diluições seriadas foram realizadas

para a obtenção de concentrações que variaram de 1000 µg/mL a 7,81 µg/mL. Os inóculos foram obtidos a partir das culturas de 18h de incubação à 37°C em caldo Mueller-Hinton / Sabouraud. A suspensão dos isolados foi confeccionada utilizando água destilada estéril, ajustando a concentração 10⁸ UFC/mL (0,5 da escala de MacFarland) e diluída a 1/10. Cada cavidade recebeu 5 µL de inóculo. As placas foram incubadas em 37°C por 24h, e posteriormente reveladas para detecção de atividade antimicrobiana após re-incubação por 2 horas com 20 µL de cloreto de trifênil tetrazolol (TTC; VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) a 0,5%. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato que inibiu completamente o crescimento microbiano.

Tabela 1 – Origem e perfil de susceptibilidade dos microrganismos utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima.

Microrganismos	Origem	Resistência	Sensibilidade
<i>S. aureus</i> IC 404	Secreção da orofaringe	GEN; AMI; CFO; CTX; CLO; ERI; TET	CIP
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	ATCC	ND	NIT; LMX; VAN; NET; RIF; AZI; SUT; OFX
<i>S. aureus</i> IC 15	ND	AMP; CFO; ERI; AMOX	IMP; SZT
<i>S. aureus</i> IC 27	ND	AMP; CFO; ERI; AMOX	IMP; SZT
<i>S. aureus</i> IC 138	Secreção vaginal	AMI; GEN	CTX; ERI; CLO
<i>S. aureus</i> IC 247	ND	AMP; CFO; ERI; AMOX	IMP; SZT
<i>S. aureus</i> IC 311	Ferida do dedo	GEN; AMI; CFO; CTX; CLO; SZT; ERI; TET; PEN	CIP
<i>P. aeruginosa</i> IC 01	Hemocultura	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER	ATM
<i>P. aeruginosa</i> IC 02	Secreção hepática	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER; SZT	ATM
<i>P. aeruginosa</i> IC 03	Secreção traqueal	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER	ATM
<i>P. aeruginosa</i> IC 05	Hemocultura	CIP; GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; ATM; MER; SZT; AMP+SUB	ND
<i>P. aeruginosa</i> IC 06	Secreção traqueal	CIP; GAT; GEN; CFL; CFO; CTX; COM; CLO; ATM; MER; SZT; AMP+SUB	ND
<i>P. aeruginosa</i> IC 10	Secreção abdominal	MAI; CFL; CFO; CTX; CPM; CIP; GEN; TOB; ATM; IMP; MER; SZT	ND
<i>P. aeruginosa</i> IC 12	Urina	AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CIP; GENT; TOB; ATM; IMP; MER; SZT; NIT; NAL; CLO; TET	ND
<i>P. aeruginosa</i> IC 13	Urina	CFL; CFO; CTX; CIP; GEN; TOB; SZT; NIT; NAL; CLO; TET; NOR	MER
<i>P. aeruginosa</i> IC 16	Hemocultura	GAT; GEN; AMI; CFL; CFO; CTX; CPM; CLO; IMP; MER; SZT; AMP+SUB; ATM	ND
<i>C.albicans</i> IC 01	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 07	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 09	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 11	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 12	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 16	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 17	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 19	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 25	Cavidade oral	ND	Miconazol
<i>C.albicans</i> IC 26	Cavidade oral	ND	Miconazol

AMI: Amicacina 30 µg; AMOX: Amoxicilina 10 µg; AMP: Ampicilina 10 µg; AMP+SUB: Ampicilina/Subctam 10 µg /10 µg; ATM: Aztreonam 30 µg; AZI: Azitromicina 15 µg; CFL: Cefalotina 30 µg; CFO: Cefoxitina 30 µg; CIP: Ciprofloxacina 5 µg; CLO: Clorafenicol 30 µg; CPM: Cefepime 30 µg; CTX: Cefotaxima 30 µg; ERI: Eritromicina 15 µg; GAT: Gatifloxacina 10 µg; GEN: Gentamicina 10 µg; NAL: Ácido nalidíxico 30 µg; NIT: Nitrofurantoina 30 µg; NOR: Norfloxacina 10 µg; IPM: Imipenem 10 µg; MER: Meropenem 10 µg; TEIC: Teicoplanina 30 µg; TET: Tetraciclina 30 µg; TOB: Tobramicina 10 µg; SZT: Sulfazotrim 25 µg; VAN: Vancomicina 30 µg. ATCC: American Type Culture Collection. IC: Isolado clínico. ND: Não determinado

Avaliação da atividade citotóxica

Foram utilizadas linhagens de células HEP-2 (carcinoma epidermoide de laringe) e NCI-H292 (carcinoma humano de pulmão), mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Sigma, St. Louis, USA), suplementado com soro fetal bovino 10% (Sigma, St. Louis, USA), solução 1% de penicilina-G (Sigma, St. Louis, USA) e L-glutamina 1%. A citotoxicidade de extratos em diferentes concentrações (50-6,25 µg ml⁻¹) foi avaliada através do 3 - (4, 5 dimetiltiazol--2-il) -2, 5-difenil brometo de tetrazolium (MTT) (Sigma, St. Louis, USA), conforme descrito por Mosmann, 1983. Placas de ensaio foram lidas utilizando um espectrofotômetro a 425 nm. Os dados gerados foram utilizados para traçar uma curva dose-resposta para saber qual concentração das frações seria necessária para matar 50% da população celular (IC 50). Etoposídeo, quimioterápico usualmente utilizado, foi empregado para comparação.

RESULTADOS

Ensaio Fitoquímico

A extração das frações foi realizada a partir de 265,3g da casca de *A. colubrina*. Foram obtidos 3,0375g (1,14%) da fração hidroalcoólica, 6,2735g (1,71%) da fração ciclo-hexânica e 62,4954g (23,55%) da fração acetato de etila. O processo de extração apresentou um rendimento de 26,4%. O screening fitoquímico do extrato bruto revelou presença de taninos hidrolisáveis, flavonoides e esteroides, e discreta presença de saponina.

Determinação de Fenois Totais e Flavonoides Totais

A quantificação de fenois totais foi determinada usando-se a equação da reta ($Y = 0,0047X + 0,00558$) obtida da curva padrão do ácido gálico e expressa em µg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de fração, sendo o coeficiente de correlação para a curva obtida de $r^2 = 0,99768$. Para a quantificação de flavonoides totais utilizou-se a equação da reta ($Y = 0,0318X + 0,0176$) obtida através da curva padrão de rutina, sendo expresso em equivalente de rutina (ER)/g de extrato, com coeficiente de correlação da curva $r^2 = 0,98057$. Os valores de fenois totais e flavonoides totais estão apresentados na Tabela 2. As absorbâncias das amostras são representadas pelo Y e as concentrações de fenois totais e flavonoides pelo X (µg/mL).

Tabela 2 - Quantificação de Fenois totais (equivalente de ácido gálico - EAG) e Flavonoides (equivalente de rutina - ER) nas frações hidroalcoólica e acetato de etila.

Amostra	Fenois totais (mgEAG/g)	Flavonoides Totais (mgER/g)
Fração Hidroalcoólica	177,85 ± 0,45	13,48 ± 0,07
Fração Acetato de etila	171,26 ± 0,02	34,16 ± 0,12

Microbiológica

Das três frações produzidas com a casca do caule de *A. colubrina*, a fração hidroalcoólica mostrou-se com maior atividade antimicrobiana frente a todas as espécies de bactérias e levedura estudadas, com exceção das linhagens de *P.aeruginosa*, inibidas com CIM médio de 216 µg/mL pela fração ciclo-hexânica. O efeito antibacteriano de todas as frações mostrou que as linhagens de *P. aeruginosa* foram inibidas em uma concentração menor ou igual a 250 µg/mL.

As frações hidroalcoólica e de acetato de etila apresentaram CIM médio de 62,5 µg/mL frente à bactéria Gram-positiva *S. aureus*, sendo inibidos em uma concentração de 125µg/mL pela fração ciclo-hexânica. No entanto, o intervalo de CIM encontrados foi maior na fração hidroalcoólica se comparada com a de acetato de etila. A fração hidroalcoólica apresentou CIM mínima de 15,62 µg/mL e máxima de 250 enquanto a fração de acetato de etila apresentou CIM mínima de 31,25 e máxima de 125. Das bactérias utilizadas para a atividade antibacteriana, as linhagens de *S. aureus* multidroga-resistente foram as mais sensíveis as frações do caule de *A. colubrina*.

Entre o grupo dos enteropatógenos, as linhagens de *Shigella sonnei* foram inibidas pelas frações hidroalcoólica (143,587µg/mL), ciclo-hexânica (198,465µg/mL) e acetato de etila (250µg/mL). Em todas as linhagens de *Salmonella enterica*, as frações hidroalcoólica e ciclo-hexânica apresentaram CIM de 125 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente. A CMI da fração de acetato de etila variou entre 250 µg/mL e 500 µg/mL para o mesmo micro-organismo, tendo média de 297,302 µg/mL.

A análise de suscetibilidade *in vitro* em relação às três frações frente a levedura *C. albicans* mostrou que a melhor atividade foi da fração hidroalcoólica, com CIM variando entre 125 - 500µg/mL, obtendo média de 192,776 µg/mL. Os resultados de CIM das frações ciclo-hexânica e acetato de etila estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 – Atividade antimicrobiana (CIM em µg/mL) das frações do caule de *A. colubrina* frente aos micro-organismos multirresistentes.

	Fração hidroalcoólica			Fração ciclo-hexânica			Fração Acetato de Etila		
	Intervalo	CIM ₁₀₀	MG	Intervalo	CIM ₁₀₀	MG	Intervalo	CIM ₁₀₀	MG
<i>S. aureus</i> (n=10)	15,62-250	250	62,5	31,25-125	125	125	31,25-125	125	62,5
<i>P. aeruginosa</i> (n=10)	250	250	250	125-250	250	216	250	250	250
<i>Shigella sonnei</i> (n=5)	125-250	250	143,5	125-250	250	189,4	250	250	250
<i>S. entérica</i> (n=4)	125	125	125	250	250	250	250-500	500	297,3
<i>E.coli</i> (n=1)	62,5	IND	62,5	250	IND	250	250	IND	250
<i>C. albicans</i> (n=10)	125-250	250	192,7	125-500	500	297,3	62,5-500	500	198,42

MIC, concentração inibitória mínima (µg/mL); MIC₁₀₀, concentração mínima capaz de inibir 100% das linhagens de micro-organismos (µg/mL); GM, as médias geométricas das concentrações inibitórias mínimas de todas as amostras para cada espécie (µg/mL); IND, indeterminado.

Citotoxicidade

Os resultados da citotoxicidade dos extratos do caule de *A. colubrina* frente a duas linhagens de células humanas tumorais (HEp-2 e NCI-H292) são apresentados na Tabela 4. As frações hidroalcoólicas e acetato de etila apresentaram IC₅₀ maior que 50 µg/mL, indicando uma ausência de atividade citotóxica. A fração ciclo-hexânica apresentou atividade antiproliferativa com boa potência frente às duas linhagens de células, sendo a melhor atividade observada frente à linhagem HEp-2. Quando é comparada a fração ciclo-hexânica ao fármaco padrão etoposídeo, amplamente utilizado na clínica, é possível observar que a fração apresenta IC₅₀ bem próxima a do fármaco, no entanto, é necessário levar em consideração que é uma fração e apresenta outras substância além da responsável por esta atividade biológica.

Tabela 4 - Citotoxicidade das frações de *A. colubrina* frente às humanas tumorais.

Linhagens de células	IC ₅₀ (µg/mL)			
	Etoposídeo (epósido)	H-EtOH	AcOEt	C-Hx
HEp-2	4,8	> 50	> 50	8,45
NCI-H292	5,2	> 50	> 50	12,87

DISCUSSÃO

A atividade biológica das frações botânicas é atribuída aos compostos do metabolismo secundário das plantas, principalmente taninos e flavonoides, os quais estão entre os maiores constituintes ativos relatados na maioria das espécies vegetais superiores, justificando o uso tradicional dessas plantas, especialmente no tratamento de doenças

infecciosas (Ahmad e Aquil, 2007). O perfil fitoquímico da casca do caule de *A. colubrina* revelou presença de compostos fenólicos, terpenos e esteóides, que apresentam atividade antimicrobiana comprovada (Braga et al, 2007)

A tabela 2 mostra a concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides encontrados na casca do caule de *A. colubrina*. Estudos demonstraram que a quantidade destes compostos poderia variar de 3,21 a 11,07% em relação ao peso total (Nozella, 2001; Monteiro et al. 2005). O teor de compostos fenólicos, no presente estudo, está acima dos valores referenciados pela literatura, justificando o fato da produção destes compostos ter relação com índices pluviométricos e fatores edáficos, e relação direta com as características biométricas da espécie botânica (Monteiro et al. 2005). Segundo Freitas et al. (2004), a produção de metabólito secundário ocorre como uma função da interação planta-ambiente, em resposta a fatores biológicos e químicos.

O discreto aumento no teor de compostos fenólicos totais e de flavonoides justifica a boa atividade antimicrobiana das frações hidroalcoólica e de acetato de etila de *A. colubrina*. Alguns estudos afirmam que os taninos, composto fenólico, possui atividade antimicrobiana devido a característica de precipitar proteínas (Monteiro et al, 2005), propiciando a inativação de adesinas, enzimas ou o transporte de proteínas no envelope celular, interferindo no transporte de soluto, ou ainda diminuindo a disponibilidade de íons metálicos essenciais ao metabolismo dos micro-organismos (Loquercio et al, 2005; Samy; Gopalakrishnakone, 2008)

Alguns relatos indicam atividade antimicrobiana das frações hidroalcoólica da casca do caule de *A. colubrina* (Olukoya et al, 1993; Mors et al, 2000), no entanto, alguns estudos questionam esta atividade biológica. Um exemplo é o trabalho de Gonçalves, Alves Filho e Menezes (2005) que aponta para a inexistência de atividade antimicrobiana frações desta espécie, e expõe como causa para tal fato a resistência das linhagens de microrganismos a antibióticos comerciais e sugere que essa resistência se estende a fração hidroalcoólica do extrato bruto natural. No presente estudo, é possível verificar uma conclusão contrária a esta. Em grande parte dos dados da literatura, não houve a determinação do perfil de resistência das linhagens utilizadas; além disso, nos diversos ensaios descritos, não existiu a preocupação de dosar teores de fenóis e flavonoides totais, fato que dificulta a comparação mais acurada quando os resultados são discrepantes. Uma vez que o objetivo do estudo da ação biológica de compostos fitoquímicos é a busca por tratamentos alternativos para o combate de patógenos resistentes a antibióticos, tais parâmetros devem ser primordiais nas pesquisas atuais (Olukoya et al, 1993).

Comparando diferentes dados relatados na literatura, é possível perceber outras incoerências nos resultados. Samy (2005) e Ahmad e Aqil (2007) utilizaram frações etanólicas e metanólicas de gengibre e de alho que não apresentaram efeito antimicrobiano contra *S. aureus*, *E. coli* e *Shigella* sp. No entanto, Indu et al. (2006) e Vuddhakul et al (2007) usando um método diferente de preparação das frações, verificou uma ação inibitória contra *E. coli*, além de uma alta atividade antimicrobiana frente a *Salmonella* sp e *S. aureus*. Comparações com dados relevantes da literatura indicam que, de acordo com a metodologia adotada no estudo fitoquímico e na atividade antimicrobiana, os resultados mais diversos podem ser obtidas. As frações de plantas têm mostrado efeito inibitório no crescimento das bactérias estudadas, embora de formas distintas (Adonizio et al, 2006).

Os resultados do presente estudo indicaram que a frações hidroalcoólica e de acetato de etila apresentaram atividade antibacteriana ativa boa frente a *S. aureus* (inclusive MRSA). De acordo com Takana et al (2005) e Holetz et al (2002) a atividade antimicrobiana pode ser classificada de acordo com a CIM em: Inativa ($CMI > 1000 \mu\text{g/mL}$); atividade fraca ($500 < CMI < 1000 \mu\text{g/mL}$); atividade moderada ($100 < CMI < 500 \mu\text{g/mL}$) e ativa boa ($CMI < 100 \mu\text{g/mL}$). Estes resultados são consistentes quando comparados aos relatos anteriores sobre plantas com atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (Cowan, 1999). Contudo, ao observar bactérias Gram-negativas (principalmente *P. aeruginosa*), sua maior resistência aos extratos de plantas foi encontrada em outros estudos, justificado pelo fato desta espécie bacteriana ser que as bactérias Gram-positivas. A menor atividade das frações contra bactérias Gram-negativas pode ser atribuída à presença de uma outra membrana externamente a sua parede celular, agindo como uma barreira para substâncias, incluindo antibióticos (Nikaido e Vaara, 1985), ou devido à barreira de permeabilidade proporcionada pela parede celular ou ainda devido ao mecanismo de acumulação de enzimas no espaço periplasmático dessas bactérias (Adwan,1998). As infecções causadas por *P. aeruginosa*, especialmente aqueles com multirresistência às drogas, estão entre as mais difíceis de tratar com antibióticos convencionais (Cdc Nnis System, 1999). Em nosso estudo, o crescimento de *P. aeruginosa*, ainda que com maior CIM em relação aos outros micro-organismos testados, foi inibida pela fração ciclo-hexânica ($MIC 216,59 \mu\text{g/mL}$), tendo atividade antimicrobiana considerada moderada. Alguns dos principais trabalhos na área demonstram atividade antimicrobiana frações hidroalcoólicas botânicos sobre *P. aeruginosa* multirresistente a partir da CMI $781 \mu\text{g/mL}$, sendo pela classificação de Tanaka et al (2005) considerada fraca (Abu-Shanab et al, 2004).

Salmonella sp., *Shigella* sp. e *E. coli* são cada vez mais isoladas de diarreias agudas grave recorrentes e constituem um problema médico sério para muitos pacientes (Orlandi et al, 2000). O aumento da frequência de *Salmonella* sp. multidrograrresistente é provavelmente devido ao uso de concentrações subterapêuticas de agentes antimicrobianos na alimentação animal, bem como o uso excessivo de antibióticos nos seres humanos (Gomez e Cleary, 1996). Nossos resultados demonstram que o extrato de *A. colubrina* exibiu atividade antimicrobiana moderada contra os enteropatógenos testados (principalmente a fração hidroalcoólica). A planta pode ser promissora no tratamento de infecções causadas por estes micro-organismos.

O presente estudo também demonstrou a atividade antifúngica das frações de *A. colubrina* contra *C. albicans*. Na década de 1990, houve um aumento dramático na prevalência de infecções fúngicas, resultado de alterações no perfil imunológico da população. Drogas ineficazes no combate a Candidíase orofaríngea é um grande problema para os doentes infectados com o HIV (Samaranayake et al, 2002). Assim, a resistência aos medicamentos tornou-se uma questão importante para uma variedade de infecções fúngicas, tendo efeitos profundos sobre a saúde humana.

Os resultados mostraram que a fração hidroalcoólica apresentou uma melhor atividade antifúngica contra *Candida albicans*, no entanto, com CIM muito próximo a do extrato de acetato de etila. O grande volume de estudos referentes à atividade antifúngica dos compostos fitoterápicos utiliza a metodologia da difusão em disco, o que dificulta uma maior comparação entre os resultados, no entanto, é possível observar que a maioria dos extratos fototerápicos com atividade antibacteriana apresenta semelhante potencial antifúngico, mesmo existindo diferenças marcantes entre as células fúngica e bacteriana (Kaomongkolgit, Jamdee e Chaisomboon, 2009)

Na terapia anti-neoplásica, cerca de 60% dos medicamentos que são usados atualmente são derivados de fontes naturais, incluindo plantas, organismos marinhos e micro-organismos . Além disso, compostos derivados de plantas e análogos semi-sintéticos têm sido usados em combinação com outros quimioterápicos para o tratamento de uma variedade de cânceres, incluindo leucemias, linfomas, câncer de testículo avançado, de mama e câncer de pulmão, e o sarcoma de Kaposi (Cragg, Kingston e Newman 2005). A busca de novas drogas capazes de superar os mecanismos de resistência é de grande interesse para a terapia do câncer (Fernandes et al, 2007).

A pesquisa verificou além de uma atividade citotóxica para microrganismos, a fração ciclo-hexânica da casca de *A. colubrina* inibiu crescimento de células tumorais das

linhagens HEP-2 e NCI-H292. Quando comparado com uma droga controle (Etoposídeo - Epósido), mesmo existindo diferenças entre elas, por se tratar de uma substancia pura e uma fração onde o principio ativo está diluído, a proximidade entre os valores IC_{50} são bastante animadores., principalmente na linhagem HEP-2. O ensaio citotóxico do extrato ciclo-hexânico revelou uma atividade citotóxica frente a HEP-2 ($IC_{50} = 8,45 \mu\text{g/mL}$) bem próxima a atividade do padrão quimioterápico ($IC_{50} = 4,8 \mu\text{g/mL}$). Segundo protocolo do National Cancer Institute (NCI) (Alley 1988), valores de $CI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ devem ser considerados significativos para extratos brutos de origem vegetal. Para substancias puras, este valor deve ser inferior a $4 \mu\text{g/mL}$ (Boik 2001). Esta atividade citotóxica pode ser atribuída aos terpenos presentes na fração ciclo-hexânica (Tanaka et al, 2005), talvez devido à afinidade dos componentes potencialmente ativos desta fração a membrana celular (lipofílico) (Lee, CC and Houghton, P 2005) na entrada para o citoplasma, ou seja na ativação de proteínas na membrana, na efetivação da apoptose. O potencial de inibição da proliferação de células tumorais pelo extrato de *A. colubrina* observado no presente estudo abre perspectivas para a sua utilização como medicamento alternativo no tratamento e controle de neoplasias.

O presente estudo revela, portanto, que as frações obtidas da *A. colubrina* podem inibir as bactérias, de modo mais eficiente frente a Gram-positivas, tendo um grande potencial terapêutico na pesquisa de novos fitoterápicos, como um agente antibacteriano frente a linhagens multidrogarresistentes. Além disso, apresenta ação fungicida moderada sobre leveduras, bem como uma promissora atividade antitumoral, tendo cada fração, sua atividade biológica direcionada modo particular. Vale salientar que sendo frações, o principio ativo com tais propriedades biológicas apresenta-se misturado a mais substancias, de modo a apresentar-se diluído. Assim, faz-se necessário a complementação do presente estudo com isolamento do principio ativo, bem como a realização de testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- Abu-Shanab, B, Adwan, G, Abu-Safiya, D, Jarrar, N and Adwan, K. (2004) Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Utilized in Popular Medicine in Palestine. *Turk J Biol* **28**, 99-102.
- Adonizio, AL, Downum, K, Bennett, BC and Mathee, K (2006). Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *J Ethnopharmacol* **105**, 427-435.
- Adwan, K and Abu-Hasan, N (1998) Gentamicin resistance in clinical strains of *Enterobacteriaceae* associated with reduced gentamicin uptake. *Folia Microbiol* **43**, 438-440.

- Ahmad, I and Aqil, F (2007) In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ES β L-producing multidrug-resistant enteric bacteria. *Microbiol Res* **162**, 264-275.
- Al-Bakri, AG and Afifi, FU (2006) Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetric and bacterial enumeration. *J Microbiol Methods* **68**, 19-25.
- Albuquerque, UP, Medeiros, PM, Almeida, AL, Monteiro, JM, Lins Neto, EMF, Melo, JG and Santos, JP (2007) Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of ne Brazil: a quantitative approach. *J Ethnopharmacol* **114**, 325–354.
- Albuquerque, UP and Oliveira, RF (2007) Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? *J Ethnopharmacol* **113**, 156–170.
- Boik, J (2001) *Natural Compounds in Cancer Therapy*, Oregon Medical Press, Minnesota, USA .p. 25.
- Braga, FG, Bouzada, MLM, Fabri, RL, Matos, MO, Moreira, FO, Scio, E and Coimbra, ES (2007) Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol* **111**, 396-402.
- Costa, AF (1982) *Farmacognosia*. 2^a. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Cowan, MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **12**, 564-582.
- Cragg, GM, Kingston, DGI and Newman, DJ (2005). *Anticancer agents from natural products*. 1st ed. Boca Raton: Brunner-Routledge Psychology Press
- Fernandes, J, Weinlich, R, Castilho, RO, Amarante-Mendes, GP and Gattass, CR (2007) Pomolic acid may overcome multidrug resistance mediated by overex-pression of anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *Cancer Lett* **245**, 315-320.
- Folin, O and Macallum, AB (1912) Determination of phenolic compounds. *J Biol Chem* **13**, 212-223.
- Freitas, MSM, Martins, MA, Carvalho, AJC and Carneiro, RFV (2004) Crescimento e produção de fenois totais em carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) D.C.] em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, na presença e na ausência de adubação mineral. *Rev Bras Pl Med* **6**, 30-34.
- Gomez, HF and Cleary, TG (1996) Drug-Resistant *Salmonella*, *Shigella*, and Diarrhea-Associated *Escherichia Coli*. *Semin Pediatr Infect Dis* **7**,212-222.
- Gonçalves, AL, Alves Filho, A and Menezes, H (2005) Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq Inst Biol* **72**,353-358.

- Gurgel, APAD, Da Silva, JG, Grangeiro, ARS, Oliveira, DC, Lima, CMP, Da Silva, ACP, Oliveira, RAG and Souza, IA (2009) *In vivo* study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol* **125**, 361-363.
- Hartmann, T (2007) From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **68**, 2831-2846.
- Holetz, FB, Pessini, GL, Sanches, NR, Cortez, DAG, Nakamura, CV and Dias Filho, BP (2002) Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **97**, 1027-1031.
- Indu, MN, Hatha, AAM, Abriosh, C, Harsha, U and Vivekanandan, G (2006) Antimicrobial activity of some of the south-Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Braz. J. Microbiol* **37**, 153-158.
- Kaomongkolgit, R, Jamdee, K and Chaisomboon, N (2009) Antifungal activity of alpha-mangostin against *Candida albicans*. *J Oral Sci* **51**, 401-406.
- Lee, CC and Houghton, P (2005) Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat câncer. *J Ethnopharmacol* **100**, 237-243.
- Loquercio, AP, Battistin, A, Vargas, AC, Henzel, A and Witt, NM (2005) Antibacterial activity of hydro-alcoholic extract leaves of jambolan (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência Rural* **35**, 371-376.
- Monteiro, JM, Lins Neto, EMF, Amorim, ELC, Strattmann, RR, Araujo, EL and Albuquerque, UP (2005) Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpáticas da caatinga. *Revista Árvore* **29**, 999-1005.
- More, G, Tshikalange, TE, Lall, N, Botha, F and Meyer, JJM (2008) Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. *J Ethnopharmacol* **119**, 473-477.
- Moretão, MP, Buchi, DF, Gorin, PAJ, Iacomini, M and Oliveira, MBM (2003) Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (angico-branco) on peritoneal macrophage functions. *Immunol Lett* **89**, 175-185.
- Moretão, MP, Zampronio, AR, Gorin, PAJ, Iacomini, M and Oliveira, MBM (2004) Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (angico-branco). *Immunol Lett* **93**, 189-197.
- Mors, WB, Rizzini, CT and Pereira, NA (2000) *Medicinal Plants of Brazil*. 1ª ed. Michigan: Reference Publications, 501 p.

- Mosmann ,F (1983) Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Nikaido, H and Vaara, M (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* **49**, 1–32.
- NNIS - National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1990-May 1999 (1999)*Am J Infect Control* **27**, 520-32.
- Nogueira, IAL, Leão, ABB, Vieira, MS, Benfica, PL, Da Cunha, LC and Valadares, MC (2008) Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. *J Ethnopharmacol* **120**, 474-478.
- Nozella, EF (2001). *Determinação de tanino em plantas com potencial forrageiro para ruminantes*. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- Olukoya, DK, Tdika, N and Odugbemi, A (1993) Antibacterial activities of some plants in Nigeria. *J Ethonopharmacol* **39**, 15–22.
- Orlandi, PP, Magalhães, GF, Matos, NB, Silva, T, Penatti, M, Nogueira, PA and Silva, LH (2006) Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). *Braz J Med Biol Res* **39**, 507-517.
- Ríos, JL and Recio, MC (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* **100**, 80-84.
- Samaranayake, LP, Fidal, PL, Naglik, JR, Sweet, SP, Teanpaisan, R and Coogan, MM (2002) Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis* **8**, 151-160.
- Samy, RP (2005) A atividade antimicrobiana de algumas plantas medicinais da Índia. *Fitoterapia* **76**, 697-699.
- Samy, RP and Gopalakrishnakone (2008) Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery. *eCAM Advance Access published*, 1-12.
- Schweizer, F (2009) Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. *Eur J Pharmacol* **625**, 190-194, 2009.
- Tanaka, JCA, Da Silva, CC, Dias Filho, BP, Nakamura, CV, De Carvalho, JE and Foglio, MA (2005) Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (*Tiliaceae*). *Quím Nova* **28**, 834-837.
- Vennat, B, Gross, D, Pourrat, H (1992) Hamamelis virginiana: identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. *Pharmaceutica Acta Helveticae* **67**, 11-14.

- Vuddhakul, V, Bhooonga, P, Hayeebilana, F and Subhadhirasakulb, S (2007) Inhibitory activity of Thai condiments on pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Microbiol* **24**, 413-418.
- Singleton, VL. and Rossi, JA (1965) A colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* **16**, 144–158.
- Zampini, IA, Cuello, S, Alberto, MR, Ordoñez, RM, D'almeida, R, Solorzano, E and Isla, MI (2009) Antimicrobial activity of selected plant species from “the Argentine Puna” against sensitive and multi-resistant bacteria. *J Ethnopharmacol* **124**, 499-505.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Perceber a biodiversidade com potencial de exploração farmacológica é essencial para as pesquisas no campo da inovação terapêutica. As frações de vegetais ainda são a solução de grande vantagem para o tratamento das neoplasias e doenças infecciosas. O presente estudo revela que as frações obtidas da *A. colubrina* podem inibir as bactérias, de modo mais eficiente frente a Gram-positivas, tendo um grande potencial terapêutico na pesquisa de novos fitoterápicos, como um agente antibacteriano frente a linhagens multidroga-resistentes. Além disso, apresenta ação fungicida moderada sobre leveduras, bem como uma promissora atividade antitumoral, tendo cada fração, sua atividade biológica direcionada modo particular. Os resultados demonstram que o potencial de inibição da proliferação de células tumorais pela fração ciclo-hexânico de *A. colubrina* observado, abre perspectivas para a sua utilização como medicamento alternativo no tratamento e controle de neoplasias.

Vale salientar que sendo frações, o princípio ativo com tais propriedades biológicas apresenta-se misturado a mais substâncias, de modo a apresentar-se diluído. Assim, faz-se necessário a complementação do presente estudo com isolamento do princípio ativo, bem como a realização de testes *in vivo*. Assim, é irrefutável concluir que apesar do sucesso dos ensaios, ainda é o primeiro passo em relação ao promissor potencial terapêutico do Angico (*A. colubrina*), que é uma espécie botânica conhecida popularmente por suas propriedades medicinais de cicatrização, no entanto, ainda pouco explorada em relação as suas diversas outras propriedades farmacológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGUILAR-SANTAMARÍA, L.; RAMIREZ, G.; HERRERA-ARELLANO, A.; ZAMILPA, A.; JIMENEZ, J. E.; ALONSO-CORTES, D.; CORTES-GUTIERREZ, E. I.; LEDESMA, N.; TORTORIELLO, J.; Toxicological and cytotoxic evaluation of standardized extracts of *Galphimia glauca*. *J Ethnopharmacol*, Lausanne, v. 109, n. 1, p. 35–40, 2007.
2. AHMAD, I; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J Ethnopharmacol*, Amsterdam, v. 74, n. 2, p.113–123, 2001.
3. ALTSCHUL, S. VON R. A taxonomic study of the genus *Anadenanthera*. Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University. 1964, 115p.
4. ALVES, A. P. N. N.; GUEDES, R. C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Modelo experimental de tumor na cavidade oral de ratos com carcinossarcoma de Walker. *Acta Cir Bras*. São Paulo, v. 19, n. 4, p. 251-258, 2004.
5. ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos Temáticos da Química Nova na Escola*. São Paulo, v. 3, n. 5, p. 10-15, 2001.
6. AMOROZO, M. C. M. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. (Org.). Plantas medicinais: Arte e Ciência, um guia de estudo interdisciplinar, 1ª Ed, São Paulo: EDUSP, 1996. p.47-68.
7. AMOROZO, M. C. M.; MING, L. C.; SILVA, S. M. P. (Org.). Métodos de coleta e análise de dados em etnobiologia, etnoecologia e disciplinas correlatas. 1ª Ed, Rio Claro: UNESP/CNPq, 2002.
8. ASSIS, M. F. L.; SANTOS, E. C. O.; DE JESUS, I. M.; DE JESUS, M. I.; PINTO, W. V. M.; MEDEIROS, R. L. F.; DA SILVA, D. F. L. Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em medicina e biologia. *CAD Saúde Colet*, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, p. 425-432, 2007.
9. BEARD, J. W. Oncolytic properties of viruses. *Tex Rep Biol Med*, Galveston, v. 16, p. 527-588, 1957.
10. BELLAMY, W. T. Prediction of response to drug therapy of cancer drug. A review of in vitro assays. *Drugs*, New York, v. 44, n. 5, p. 690-708, 1992.
11. BJELDANES, L. F; CHANG, G. W. Mutagenic activity of quercetin and related compound. *Science*, Washington, v.197, n. 4303, p. 547-548, 1977.
12. BLACK, F. L.; MELNICK, J. L.; REISSIG, M. Propagation of measles virus in a strain of human epidermoid cells (Hep-2). *Proc Soc Exp Biol Med*, Malden, v. 93, n. 1, p. 107-108, 1956.
13. BLACK, J. G. Microbiologia: fundamentos e perspectivas, 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002.
14. BOFFETTA, P.; FREDRICK, N. Contribution of environmental factors to cancer risk. *Br Med Bull*, London, v. 68, n. 1, p. 71-94, 2003.
15. BOMBARDELLI, E.; BOMBARDELLI, V. Twenty years' experience in the botanical health food market. *Fitoterapia*, Amsterdam, v. 76, n. 6, p. 495-507, 2005.

16. BOUSTIE, J.; STIGLIANI, J. L.; MONTANHA, J.; AMOROS, M.; PAYARD, M.; GIRRE, L. Antipoliavirus structure-activity relationships of some aporphine alkaloids. *J Nat Prod*, Cincinnati, v. 61, n. 4, p. 480–484, 1998.
17. BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. de O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol*. Lausanne, v.111, n. 2, p. 296-402, 2007.
18. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, 18 mar. 2004.
19. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 2ª. ed. Brasília: MS, 2002.
20. BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLO, V. R.; RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Braz J Pharm Sci*, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 195-202, 2006
21. BREIMAN, R. F.; BUTLER, J. C.; TENOVER, F. C.; ELLIOT, J. A.; FACKLAM, R. R. Emergence of drug-resistant pneumococcal infections in the United States. *JAMA*, Chicago, v. 271, n. 3, p. 1831-1835, 1994.
22. BRINGMANN, G.; RÜDENAUER, S.; IRMER, A.; BRUHN, T.; BRUN, R.; HEIMBERGER, T.; STÜHMER, T.; BARGOU, R.; CHATTERJEE, M. Antitumoral and antileishmanial dioncoquinones and ancistroquinones from cell cultures of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae) and *Ancistrocladus abbreviatus* (Ancistrocladaceae). *Phytochemistry*, Oxford, v. 69, n. 13, p. 2501-2509, 2008.
23. BURKJE, J. P. Infection control - a problem for patient safety. *N Engl J Med*, Boston, v. 348, p. 651-656, 2003.
24. CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). *Braz J Med Biol Res*, Ribeirão Preto, v. 33, n. 2, p. 79-89, 2000. CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. 1ª. Ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978, p. 125-126.
25. CARLINI, E. A. Pesquisas com plantas medicinais usadas em medicina popular. *Rev Ass Med Bras*. São Paulo, v. 29, n. 4, p.109-110, 1983.
26. CARREL, A.; BURROWS, M. T. Cultivation of tissues in vitro and its technique. *J Exp Med*, New York, v. 13, n. 3, p. 387-396, 1911.
27. CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. 1ª Ed, Ribeirão Preto: Tecmed, 2004.
28. CARVALHO, T. U. Cultura de células animais. In: ATTIAS, M.; CUNHA, N. L.; SILVA, T. U. (Eds.). Métodos de estudo da célula. Rio de Janeiro: Editoração Eletrônica Fenorte/Uenf, p. 47-58, 1996.
29. CASSADY, J. M.; DOUROS, J. D. (Eds.). Anticancer agents based on natural product models. New York: Academic Press, 1980.
30. CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat Prod Rep*, London, v. 18, n. 6, p. 674–688, 2001.

31. CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. *J Ethnopharmacol*: Lausanne, v. 91, n. 1, p. 105-108, 2004.
32. CHARKRABORTY, A.; BRANTNER, A.; MUKAINAKA, T.; NOBUKUNI, Y.; KUCHIDE, M.; KONOSHIMA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. Cancer chemopreventive activity of *Achyranthes aspera* leaves on Epstein–Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett*, Amsterdam, v. 177, n. 1, p. 1-5, 2002.
33. CHENG, B.; YANG, X.; AN, L.; GAO, B.; LIU, X. Arsenic trioxide-induced apoptosis of Hep-2 cell line through modulating intracellular glutathione (GSH) level. *Auris Nasus Larynx*, Tokyo, v. 37, n. 1, p. 89-94, 2010.
34. CHU, I. Alternative methods to animal testing: a Canadian health protection branch perspective. *ATLA*. London, v. 23, p. 257-261, 1995.
35. COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science*, Washington, v. 257, n. 11, p. 1050-1055, 1992.
36. COSTA, A. F. *Farmacognosia*. 2ª. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. III, 1982.
37. COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.
38. COURVALIN, P.; GOLDSTEIN, F.; PHILIPPON, A.; SIROT, J. L'antibiogramme, 1st. ed, Paris: MPC/Vigot, 1985.
39. COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.
40. COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, Washington, v.12, n.4, p.564-582, 1999.
41. CRAGG, M. G.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol*, Lausanne, v.100, n. 1-2, p.72-79, 2005.
42. CRISAN, I.; ZAHARIA, C. N.; POPOVICI, F.; JUCU, V.; BELU, O.; DASCĂLU, C.; MUTIU, A.; PETRESCU, A. Natural propolis extract NIVCRISOL, in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. *Rom J Virol*, Bucureste, v. 46. n. 3-4, p. 115-133, 1995.
43. CRUZ, G. L. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. 5ª. ed., Rio de Janeiro: Bertrand do Brasil, 1995.
44. CULIOL, G., ORTALO-MAGNÉ, A., DAOUDI, M., THOMAS, GUYON, H., VALLS, R., PIOVETTI, L. Trihidroxilated linear diterpenes from the brown alga *Bifurcaria bifurcata*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 65, n. 14, p. 2063-2069, 2004.
45. DA SILVA, D. B.; TULLI, E. C. O.; MILITÃO, G. C. G.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; ALBUQUERQUE, S.; DE SIQUEIRA, J. M. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. *Phytomedicine*, Stuttgart, v. 16, n. 11, p. 1059-1063, 2009.
46. DA SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na 6-metil-lapachona e derivados. *Química Nova*, v.26, n.3, p.407-416, 2003.

47. DAVID, J.P.L.; NASCIMENTO, S.D. Atividade citotóxica de *Plectranthus barbatus* Andr. (*Lamiaceae*). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v.22, n.2, p.155-158, 2003.
48. DE ALMEIDA, L.; CINTRA, A. C. O.; VERONESE, E. L. G.; NOMIZO, A.; FRANCO, J.; ARANTES, E. C.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO, S. V. Anticrotalic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (*Apocynaceae*) *Comp Biochem Physiol C. Toxicol Pharmacol*, Oxford, v. 137, n. 1, p. 19-27, 2004.
49. DE ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o dna: uma introdução. *Quím Nova*, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
50. DE LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SOUZA Jr, P. T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. *Phytother Res*. London, v. 12, n. 3, p. 218-220, 1998.
51. DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol Methods*. Amsterdam, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.
52. DESMARCHELIER, C.; ROMÃO, R. L.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the "caatinga" region of northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol*, Lausanne, 67, n. 1, p. 69-77, 1999.
53. DI STASI, L. C.; HIRUMA, C.; GUIMARÃES, E.; SANTOS, C. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. *Fitoterapia*, Milão, v. 65, p. 529-540, 1994.
54. DJIPA, C. D.; DELMÉE, M.; LECLERCQ, J. Q. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (*Myrtaceae*). *J Ethnopharmacol*, Lausanne, v. 71, n. 1-2, p. 307-313, 2000.
55. DOMINGUÉZ, X. Metodos de investigacion fitoquímica. Ciudad de Mexico: Limusa, 1973, 281p.
56. DORMAN, H. J.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.
57. DOS SANTOS, R. L.; PITHON, M. M.; MARTINS, F. O.; ROMANOS, M. T. V.; DE OLIVEIRA, RUELLAS, A. C. Evaluation of the cytotoxicity of latex and non-latex orthodontic separating elastics. *Orthod Craniofac Res*, Oxford, v. 13, n. 1, p. 28-33, 2010.
58. DREWES, S. E.; GEORGE, J.; KHAN, F. Recent findings on natural products with erectile-dysfunction activity. *Phytochemistry*. New York, v. 62, n. 7, p. 1019-1025, 2003.
59. DUGUE, B.; AUCLAIR, C.; MEUNIER, B. Covalent binding of elliptinium acetate (NSC 264137) to nucleic acids of L1210 cells in culture. *Cancer Res*, Chicago, v. 46, n. 8, p. 3828-3833, 1986.
60. EAGLE, H. Propagation in a fluid medium a human epidermoid carcinoma strain KB. *Proc Soc Exper Biol Med*. Malden, v. 89, n. 3, p. 362-364, 1995.
61. EAGLE, H. The specific amino acid requirements of a human carcinoma cell (strain HeLa) in tissue culture. *J Exp Med*, New York, v. 102, n. 1, p. 37-48, 1955.

62. EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.-C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol.* Oxford, v.40, n. 2-3, p. 193-236, 2002.
63. EVANS, D. L.; CARLSON, R. L.; GRAVES, S. S.; HOGAN, K. T. Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*]. IV Target cell binding and recycling capacity. *Dev Comp Immunol*, Elmsford, v. 8, n. 4, p. 823-833, 1984.
64. FAHMY, B.; DING, L.; YOU, D.; LOMNICKI, S.; DELLINGER, B.; CORMIER, S. A. In vitro and in vivo assessment of pulmonary risk associated with exposure to combustion generated fine particles. *Environ Toxicol Pharmacol.* In Press. 2010.
65. FÁVARO, O. C. N.; OLIVEIRA, M. M.; ROSSINI, A.; KAMARA, C. R.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. Seleção por meio de Células KB de Substâncias e Extratos potencialmente Ativos em Quimioterapia do Câncer. *Anais Acad Bras Ciências*, Rio de Janeiro, v. 62, n. 3, p. 217-224, 1990.
66. FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov Today*, Kidlington, v. 7, n. 22, p. 1128-1137, 2002.
67. FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res.* Amsterdam, v. 475, n. 1-2, p. 89-111, 2001.
68. FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. *Rev Bras Cancerol*, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 375-382, 2002.
69. FERREIRA, A. Controle de qualidade: da matéria-prima ao fitoterápico. *Rev Racine*, ano 13, p. 68-78, jan./fev. 2003.
70. FISCH, M. S.; JOHNSON, N. M.; HORNING, E. C. *Piptadenia* alkaloids. Indole base of *P. peregrina* (L.) Benth. and related species. *J Am Chem Soc*, Washington, v. 77, n. 22, p. 5892-5895, 1955.
71. FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Bri J Exp Pathol*, Oxford, v. 10, p. 226-236, 1929.
72. FOLIN, O.; MacALLUM, A. B. Determination of phenolic compounds. *J Biol Chem*, Baltimore, v. 13, p. 212-223, 1912.
73. FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells, a manual of basic technique. 5th. Ed., New York: John Wiley & sons, 2005. 696p.
74. FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4th. Ed. Washington: Willey – Liss, 2000, 577 p.
75. GARCIA, E. S.; SILVA, A. C. P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C. B.; CAVALHEIRO, M. V. S.; SANTOS, R. R.; TOMASSINI, T. Fitoterápicos: biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas. Base de Dados Tropical 1996. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10>>. Acesso em: 17 ago 2009.
76. GERMONPREZ, N.; MAES, L.; PUYVELDE, L.V.; TRI, M.V.; TUAN, D.A.; DE KIMPE, N. In Vitro and in Vivo anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from *Maesa balansae* and some chemical derivatives. *J Med Chem*, Easton, v. 48, n. 1, p. 32-37, 2005.

77. GIULIANI, F.; MARCO, A. D.; CASSAZZA, A. M.; SAVI, G. Combination chemotherapy and surgical adjuvant chemotherapy on MS-2 sarcoma and lung metastases in mice. *Eur J Cancer*, Oxford, 15, n. 5, p. 715-721, 1979.
78. GLAUBERT, A. M.; DINGLE, J. T.; LUCY, J. A. Action of saponin on biological cell membranes. *Nature*, London, v. 196, p. 952-955, 1962.
79. GOLDIN, A.; SCHEPARTZ, S. A.; VENDITTI, J. M.; DEVITA, V. T. Historical Development and Current Strategy of the National Cancer Institute Drug Development Program. In: BUSCH, H. Methods in cancer research (ed), New Yor: Academic Press, cap. 5, p. 165-229, 1979.
80. GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. de M. B.; BOSISIO, B. M. Trends of plant use by humans and nonhuman primates in Amazonia. *Am J Primatol*. New York, v. 40, n. 2, p. 189-195, 1999.
81. GUERRA, M. R. GALLO, C. V. M. AZEVEDO, G. MENDONÇA, S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Rev Bras Cancer* , v. 51, n.3, p.227-234, 2005.
82. GUTIERREZ-LUGO, M. T.; DESCHAMPS, J. D.; HOLMAN, T. R.; SUAREZ, E.; TIMMER-MANN, B. N. Lipoxigenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. *Planta Med*, Stuttgart, v. 70, n. 2, p. 263–265, 2003.
83. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, Cambridge, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
84. HAO, Y. Y.; BRACKETT, R. E.; DOYLE, M. P. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated, cooked poultry. *Food Microbiol*, Amsterdam, v. 15, n. 4, p. 367-378, 1998.
85. HARUNA, M.; TANAKA, M.; SUGIMOTO, T.; KOJIMA, R.; SUZUKI, Y.; KONOSHIMA, T.; KOZUKA, M.; ITO, K. Alteration of Na^+ permeability in human erythrocytes as studied by ^{23}Na -NMR and inhibition of the kidney Na^+, K^+ -ATPase activities with saponins: interaction of *Gleditsia* saponins with human erythrocyte membranes. *Bioorg Med Chem Lett*, Oxford, v. 5, n. 8, p. 827-830, 1995.
86. HOET, S.; STÉVIGNY, C.; BLOCK, S.; OPPERDOES, F.; COLSON, P.; BALDEYROU, B.; LANSIAUX, A.; BAILLY, C.; QUENTIN-LECLERCQ, J. Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxic and interaction with DNA and topoisomerases. *Planta Med*, Stuttgart, v. 70, n. 5, p. 407–413, 2004.
87. HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.
88. HUFFORD, C. D.; SHARMA, A. S.; OGUNTINEIN, B. O. Antibacterial and antifungal activity of liriodenine and related oxoaporphine alkaloids. *J Pharm Sci*, Easton, v. 69, n. 10, p. 1180–1183, 1980.
89. IACOBUCCI, G. A.; RÚVEDA, E. A. Bases derived from tryptamine in argentine Piptadenia species. *Phytochemistry*, Oxford, v. 3, n. 3, p. 465-467, 1964.
90. INCA. Instituto Nacional do Câncer. Incidência de Câncer no Brasil <www.inca.gov.br/estimativa/2009>. Acessado em 11 nov 2009.

91. ISHIDATE, M.; HARNOIS Jr, M. C.; SOFUNI, T. A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. *Mutat Res*, Amsterdam, v. 195, n. 2, p. 151-213, 1988.
92. JADA, S. R.; SUBUR, G. S.; MATTHEWS, C.; HAMZAH, A. S.; LAJIS, N. H.; SAAD, M. S.; STEVENS, M. F. G.; STANLAS, J. Semisynthesis and in vitro anticancer activities of andrographolide analogues. *Phytochemistry*, Oxford, v. 68, n. 6, p. 904-912, 2007.
93. JAGETIA, G. C.; BALIGA, M. S. Cystone, na ayurvedic herbal drug impacts protection to the mice against lethal effects of γ -irradiation: a preliminary study. *Nahrung*. Berlin, v. 46, n. 5, p. 332-336, 2002.
94. JANTAN, I.; RAWEH, S. M.; YASIN, Y. H. M. Antiplatelet activity of aporphine and phenanthrenoid alkaloids from *Aromadendron elegans* Blume. *Phytother Res*, London, v. 20, n. 6, p. 493-496, 2006.
95. KANTARJIAN, H. M.; TALPAZ, M.; SANTINI, V.; MURGO, A.; CHESON, B.; O'BRIEN, S. M. Homoharringtonine: history, current research, and future direction. *Cancer*, New York, v. 92, n. 6, p. 1591-1605, 2001.
96. KIDD, P. M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Alternat Med Rev*. Sandpoint, v. 5, n. 1, p. 4-27, 2000.
97. KIM, D.S.; OH, S.R.; LEE, I.S.; JUNG, K.Y.; PARK, J.D.; KIM, S.L.; LEE, H.K. Anticomplementary activity of ginseng saponins and their degradation products. *Phytochemistry*, New Yor, v. 47, n. 3, p. 397-399, 1998.
98. KINGSTON, D. G. I. In: KINGHORN, A. D.; BALANDRIN, M. F. (Eds). Human medicinal agents from plants. Washington: American Chemical Society, p. 138-148, 2000.
99. KRISHNA, G.; URDA, G.; THEISS, J. Principles and practices of integrating genotoxicity evaluation into routine toxicology studies: a pharmaceutical industry perspective. *Environ Mol Mutagen*, New York, v. 32, n. 2, p. 115-120, 1998.
100. KUMAR, G. P; YADAV, S. K.; THAWALE, P. R.; SINGH, S. K; JUWARKAR, A. A. Growth of *Jatropha curcas* on heavy metal contaminated soil amended with industrial wastes and *Azotobacter* - A greenhouse study. *Bioresour Technol*. Amsterdam, v. 99, n. 6, p. 2078-2082, 2008.
101. KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, C. Pathology basis of disease, 7th. ed. Benjing: WB Saunders, 2004, 1552 p.
102. LA CRUZ, M. G. O acesso aos fitoterápicos e plantas medicinais e a inclusão social – diagnóstico situacional da cadeia produtiva farmacêutica no estado do Mato Grosso. Cuiabá: SES/SETEC, 2005, 89p.
103. LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M. T. R. L.; GODINHO, R. O.; LIMA, T. C. M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2^a ed. Porto Alegre: Ed. Da UFSC, 2000. cap.11, p. 181-196.
104. LEHIR, A. Farmácia galenica. Manuales da Farmácia. São Paulo: Masson, 1985.
105. LI, J.; LI, F.; LU, Y-Y.; SU, X-J.; HUANG, C. P.; LU, X-W. A new dilactone from the seeds of *Gaultheria yunnanensis*. *Fitoterapia*, Milano, v. 81, n. 1, p. 35-37, 2010.

106. LI, Q. Y.; ZU, Y. G.; SHI, R. Z.; LI, P. Y. Review Camptothecin: Current Perspectives. *Curr Med Chem*, Schiphol, v. 13, n. 17, p. 2021-2039, 2006.
107. LIKHITWITAYAWUID, K.; AANGEROFER, C. K.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the tubers of *Stephania pierrei*. *J Nat Prod*, Cincinnati, v. 56, n. 9, p. 1468–1478, 1993.
108. LISBOA, T./ FARIAL, M.; HOHER, J. A.; NORGES, L. A. A.; GÓMEZ, J.; SCHIFELBAIN, L.; DIAS, F. S.; LISBOA, J.; FRIEDMAN, G. Prevalência de Infecção Nosocomial em Unidades de Terapia Intensiva do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, São Paulo, v. 19, n. 4, 2007.
109. LORENZI, H. Árvores brasileiras - manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. volume 2. São Paulo: Plantarum, 1998, p. 97.
110. LORIAN, J. Antibiotics in laboratory medicine. Baltimore: William & Wilkins, 1996.
111. LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; ORMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *J Ethnopharmacol*. Lausanne, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.
112. MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. *Bol. Cent. Biol. Reprod*, Juiz de Fora, v. 26, n. único, p. 37, 2008.
113. MALPEZZI, E. L. A.; MATSUI, D. H.; GROOTE, S. C. T. S.; FREITAS, J. C.; SANTELLI, G. M.; FERNANDES, J. B. Antitumoral activity in an organic extract of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Toxicon*, Oxford, v. 33, n. 3, p. 291, 1995.
114. MARKHAM, K. R. Techniques of flavonoid identification. London: Academic Press, 1982.
115. MARQUES, R. G.; MIRANDA, M. L. de; CAETANO, C. E. R.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P. Rumo à regulamentação da utilização de animais no ensino e na pesquisa científica no Brasil. *Acta Cir Bras*. São Paulo, v. 20, n. 3, p. 262-267, 2005.
116. McCLENDON, A. K.; OSHEROFF, N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat Res*, Amsterdam, v. 623, n. 1-2, p. 83-87, 2007.
117. MELO, P. S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Cytotoxicity of derivatives from dehydrocrotonin on V79 cells and *Escherichia coli*. *Toxicology*. Amsterdam, v. 159, n. 3, p. 135-141, 2001.
118. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 4ª. ed. AMPL: Brasília, 2004.
119. MIRANDA, M. A.; OKAMOTO, A. K.; FERREIRA, C. V.; SILVA, T. L.; GRANJEIRO, J. M.; AOYAMA, H. Differential effects of flavonoids on bovine kidney low molecular mass protein tyrosine phosphatase. *J Enzyme Inhib Med Chem*. London, v. 21, n. 4, p. 419-425, 2006.
120. MOLINA-TORRES, J.; GARCÍA-CHÁVEZ, A.; RAMÍREZ-CHÁVEZ, E. Antimicrobial properties of alkaloids present in flavouring plants traditionally used in mesoamerica: affinin and capsaicin. *J. Ethnopharmacol*. Lausanne, v. 64, n. 3, p. 241-248, 1999.

121. MONTANARI Jr., I. Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas. Disponível em <<http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/index.html>>. Acesso em 15 fev 2009.
122. MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS NETO, E. M. F.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. *J Ethnopharmacol*: Lausanne, v. 105, n. 1-2, p. 173-186, 2006.
123. MOO-PUC, R.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRÍN, Y. In vitro cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucatán, Mexico. *Cienc Mar*, Enseada B. C, v. 35, n. 4, p. 345-358, 2009.
124. MOORE, A. E.; SABACHEWSKY, L.; TOOLAN, H. W. Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res*, Chicago, v. 15, n. 9, p. 598-602, 1955.
125. MOREIRA, F. M. Avaliação morfofisiológica e bioquímica do porta-enxerto de videira 'Paulsen 1103' *in vitro*. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.
126. MOREIRA, R. R. D; SANTOS, L. E; VARELLA, S. D.; VARANDA, E. A; VILEGAS, W. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoidicos 7-metoxilados relacionados. *Rev Bras Farmacogn*, São Paulo, v. 12, n. 1, p.11-19, 2009.
127. MORETÃO, M. P.; BUCHI, D. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (angico-branco) on peritoneal macrophage functions. *Immunol Lett*, Amsterdam, v. 89, n. 2-3, p. 175-185, 2003.
128. MORIER, L.; PÉREZ, L.; CANCIO, R.; SAVÓN, C.; GONZÁLEZ, Z.; GOYENECHEA, A. Comparación de la línea NCI-H292 com otras líneas continuas para la multiplicación de virus respiratorios. *Rev Cubana Med Tropical*, Havana, v. 48, n. 3, p. 171-173, 1996.
129. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
130. MOURA, C. L. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos das espécies vegetais *Miconia rubiginosa* e *Pfaiffia glomerata* em microrganismos da cavidade bucal. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de Franca, Franca, 2006.
131. MUNDIN, G. J.; DEZENA, R. A.; OLIVEIRA, A. C. S. de; SILVA, P. R. da; CARDOSO, M.; PEREIRA, G. de A.; MORAIS, C. A. de; TERRA, A. P. S. Avaliação da presença de *Staphylococcus aureus* nos leitos do Centro de Terapia Intensiva do Hospital Escola da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, em relação à posição no colchão antes e após a limpeza. *Rev Bras Med Trop*. Uberaba, v. 36, n. 6, p. 685-688, 2003.
132. MURUGANANDAN, S.; PANT, S.; SRINIVASAN, K.; CHANDRA, S.; TANDAN, S. K.; LAL, J.; PRAKASH, R. V. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* bark. *Fitoterapia*: Milão, v. 72, p. 369-375, 2001.

133. MUTHU, M.; AYYANAR, RAJA, N.; IGNACIMUTHU, S. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram district of Tamil Nadu, India. *J Ethnobiol Ethnomed*. London, v. 2, p. 43–53, 2006.
134. NASCIMENTO, G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Braz J Microbiol*, São Paulo, v. 31, p.247-256, 2000.
135. NASCIMENTO, S. C.; CHIAPPETA, A. A.; LIMA, R. M. O. Antimicrobial and cytotoxic activities in plants from Pernambuco, Brazil. *Fitoterapia*, Milão, v. 61, n. 4, p. 353-355, 1990.
136. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*, Cincinnati, v. 66, n. 7, p. 1022–1037, 2003.
137. NEWMAN, D. J.; CRAGG, M. G. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*, Cincinnati, v. 70, n. 3, p. 461- 477, 2007.
138. NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2ª ed. Porto Alegre: Ed da UFSC, 2000. cap. 1, p. 11-24.
139. NOGUEIRA, I. A. L.; LEÃO, A. B. B.; VIEIRA, M. S. V.; BENFICA, P. L.; DA CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. *J Ethnopharmacol*, Lausanne, v. 120, n. 3, p. 474-478, 2008.
140. NOVAIS, T. S.; COSTA J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, P. R. Atividade anti-bacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. *Rev Bras Farmacog*, São Paulo, v. 13, supl. 2, p. 5 -7, 2003.
141. OKUNADE, A.L.; ELVIN-LEWIS, P. F.; LEWIS, W. H. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry*. New York, v. 65, n. 8, p. 1017-1072, 2004.
142. OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Farmacognosia, 1ª. ed. São Paulo: Atheneu, p. 384-388, 1991.
143. OLIVEIRA, F.; LÚCIA, M.; GARCIA, L. O. Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de mentrasto – *Ageratum conyzoides* L. *Lecta-USF*, Bragança Paulista, v. 11, n. 1, p. 63-100, 1993.
144. PACHTER, I. J.; ZACHARIAS, D. E.; RIBEIRO, O. Indole alkaloids of *Acer saccharinum* (the silver maple), *Dictyoloma incanescens*, *Piptadenia columbrina*, and *Mimosa hostiles*. *J Org Chem*, Easton, v. 24, p. 1285, 1959.
145. PALERMO, E. F.; SOVADINOVA, I.; KURODA, K. Structural determinants of antimicrobial activity and biocompatibility in membrane-disrupting methacrylamide random copolymers. *Biomacromolecules*, Washington, v. 10, n. 11, p. 3098-3107. 2009.
146. PAULA, J. E. de. Estudo das estruturas internas das madeiras de dezesseis espécies da flora brasileira visando o aproveitamento econômico para a produção de álcool, carvão, coque e papel. *Brasil Florestal*: Brasília, v. 11, n. 47, p. 23-50, 1981.

147. PELZER, E. I., GUARDIA, T.; JUÁREZ, A. O.; GUERRERO, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Il Farmaco*. Paris, v. 53, n. 6, p.421-424, 1998.
148. PERES, L. E. P. Metabolismo Secundário. Disponível em <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp>>. Acesso em: 15 fev 2009.
149. PIACENTE, S.; BALDERRAMA, L.; DE TOMMASI, N.; MORALES, L.; VARGAS, L.; PIZZA, C. Anadanthoside: a flavanol-3-O- β -D-xylopyranoside from *Anadenanthera macrocarpa*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 51, n. 5, p. 709, 1999.
150. PIGNATTI M. G. Saúde e ambiente: as doenças emergentes no Brasil. *Ambiente Soc*, Campinas, v. 7, n. 1. p. 133-148, 2004.
151. PINHEIRO, M. C. N., XAVIER, M. B., CARDOSO, B. S., FERREIRA, M. M. R., ISHIKAWA, E. A., SILVEIRA, F. T. Ensaio clínico aberto comparando a mefloquina e o antimonio de meglumina no tratamento da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia. *Rev Para Med*, Belém, v. 16, n. 1, p. 19-24, 2002.
152. POMMIER, Y.; FESEN, M. R.; GOLDWASSER, F. In: CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. (Eds.) Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p. 435-461, 1996.
153. RANG, H. P. Farmacologia. 5a. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
154. RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Ann Rev Biomed Eng*. Palo Alto, v. 6, p. 41-75, 2004.
155. RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEINONEN M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJAL, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of finnish plant extrats containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol*: Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 3-12, 2000.
156. RENZI, D.; VALTOLINA, M.; FORSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. *ATLA*. London, v. 21, n. 1, p. 89-96, 1993.
157. RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS A. M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. *Rev Bras Farmacog*, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 65-70, 2005.
158. RIER, U. J.; FLEER, E. A. M.; BREISER, A.; UNGER, C.; STEKAR, J.; FENNEBERG, K.; EIBL, H. *In vitro* and *in vivo* antitumoral activity of alkylphosphonates. *Eur J Cancer*, Oxford, v. 29, n. 1, p. 96-101, 1993.
159. RISSATO, S. R.; ALMEIDA, M. V.; SILVA, L. Estudo do óleo essencial de *Eugenia uniflora* como subsídio para aplicação como fitofármaco. *Salusvita*. Bauru, v. 23, n. 2, p. 209-222, 2004.
160. ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Farmacognosia e farmacobiotechnologia, São Paulo: Premier, 1997, 372p.
161. RODRIGUES, E.; CARLINI, E. L. A. Levantamentos etnofarmacológicos. *Rev Racine*, ano 12, p. 30, set./out. 2002.
162. RODRIGUES, O. G. Estudo in vitro para avaliação das alterações morfológicas das células Hep2, NCIH-292 e TVT Canino produzidas por imunoparvum e in vivo para verificação dos seus efeitos terapêuticos, 2001. 127p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco – Recife, 2001.

163. ROGUET, R.; COTOVIO, J.; GAETANI, Q.; DOSSOU, K. G.; ROUGIER, A. Cytotoxicity of 28 MEIC chemicals to rat hepatocytes using two viability endpoints: correlation with acute toxicity data in rat and man. *ATLA*. London, v. 21, p. 216-224, 1993.
164. ROWINSKY, E. K.; DONEHOWER, R. C. Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med*, Boston, v. 332, p. 1004–1014, 1995.
165. ROWINSKY, E. K.; McGUIRE, W.; DONEHOWER, R. C. The current status of taxol: principles practice. *Gynecol Oncol*, New York, v. 1, n. 1, p. 1-16, 1993.
166. SÁ, E. V.; SOUZA, S. M. A; DINIZ, A. V. S. Saúde e doenças tropicais: comunidades rurais, conflitos agrários e pobreza. 1ª. ed., Belém: NUMA, UFPA, 1992.
167. SALES JUNIOR, J. A. L.; DAVID, C. M.; HATUM, R.; SOUZA, P. C. S. P.; JAPIASSÚ, A.; PINHEIRO, C. T. S.; FRIEDMAN, G.; DA SILVA, O. B.; DIAS, M. D.; KOTERBA, E.; DIAS, F. S.; PIRAS, C.; GRUPO DE ESTUDO DE SEPSE FUNDO AMIB; LUIZ, R. R. Sepsis Brasil: Estudo epidemiológico da sepsis em unidades de terapia intensiva brasileiras. *Rev Bras Ter Intens*, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 9-17, 2006.
168. SALMONM, S. E. In: KATZUNG, B. G. (ed.) *Farmacologia Básica & Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1998, p. 629-655.
169. SAMPAIO FILHO, C.; BERTONI, V. D.; SAMPAIO, C.; PIMENTA, A.; BRANDÃO, M. A. Agentes antineoplásicos. In: PENILDON, S. (Org.) *Farmacologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 1055-1070.
170. SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tanins. *Phytochemistry*. New York, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.
171. SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, Chichester, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.
172. SCHICK, H. D.; AMTMANN, E.; BERDEL, W.E.; DANHAUSER-RIEDL, S.; REICHERT, A.; STEINHAUSER, G.; RASTETTER, J.; SAUER, G. Antitumoral activity of a xanthate compound I. Cytotoxicity studies with neoplastic cell lines in vitro. *Cancer Lett*, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 143-147, 1989.
173. SCHIRMER, R. H.; MÜLLER, J. C.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Disulfide-reductase inhibitors as chemotherapeutic agents: the design of drugs for trypanosomiasis and malaria. *Angew Chem Int Ed Engl*, Weinheim, v. 34, n. 2, p. 141–145, 2003.
174. SCHNEIDER, G. *Arzeneidrogen-mein Kompendium für Pharmazeuten, Biologen und Chemiker*. Mannheim: Wissenschaftsverlang, cap 24, p.174-180, 1990.
175. SHAFI, P. M.; ROSAMMA, M. K.; JAMIL, K.; REDDY, P. S. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travacoricum* leaf essential oil. *Fitoterapia*. Milão, v. 73, n. 5, p. 414-416, 2002.
176. SILVA, E.; PEDRO, M. A. SOGATAR, A. C. B.; MOHOVIC, T.; SILVA, C. L. O.; JANISZEWSKY, M.; CAL, R. G. R.; DE SOUSA, E. F.; ABE, T. P.; DE ANDRADE, J.; DE MATOS, J. D.; REZENDE, E.; ASSUNÇÃO, M.; AVEZUM, A. ROCHA, P. C. S.; DE MATOS, G. F. J.; BENTO, A. M.; CORRÊA, A. D.; VIEIRA, P. C. B.; KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care*, London, v. 8, n. 4, p. R251-R260, 2004.

177. SIMMS, E. B.; GAZDAR, A. F.; ABRAMS, P. A.; MINNA, J. D. Growth of human small cell (oat cell) carcinoma of the lung in serum-free growth factor-supplemented medium. *Cancer Res*, Chicago, v. 40, n. 12, p. 4356-4363, 1980.
178. SIMÕES C. M. O. (Org.) Farmacognosia, da Planta ao Medicamento. 6ª ed. São Paulo: McGraw-Hill, p. 2047, 2007.
179. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis/Porto Alegre: Ed. da UFSC, 1999.
180. SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRAULI, U. D. Studies on succinate-tetrazolio reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolio salts. *Biochim Biophys Acta*. Amsterdam, v. 77, p. 383-393, 1963.
181. SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. *Quím Nova*, São Paulo, v.27, n. 2, p. 308-312, 2004.
182. SOUZA, V. C; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.
183. STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUENTIN-LECLERC, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. *Curr Med Chem*, Schiphol, v. 5, n. 2, p. 173–182, 2005.
184. STRAUSBAUGH, L. J.; CROSSLEY, K. B.; NURSE, B. A.; THRUPP, L. D.; SHEA LONG-TERM-CARE COMMITTEE. Antimicrobial resistance in long-term-care facilities. *Infect Control Hosp Epidemiol*, Chicago, v. 17, n. 2, p. 129-140, 1996.
185. SUFFREDINI, I. B. A review of the physiological basis of cancer diseases and the search for new chemotherapeutics. The importance of the Brazilian biodiversity. *Rev Inst Cienc Saude*. São Paulo, v. 20, n. 2, p. 103-115, 2002.
186. TANAKA, J.C.A.; SILVA, C.C.; FILHO, B.P.D. NAKAMURA, C.V. CARVALHO, J.E. FOGLIO, M.A. Constituintes químicos de *Luechea divaricata* Mart. (*Tilaceae*). *Química Nova*, v.28, n.5, p.834-837, 2005.
187. TEIXEIRA, C. C.; FUCHS, F. D. The efficacy of herbal medicines in clinical models: the case of jambolam. *J Ethnopharmacol*. Lausanne, v. 108, n. 1-3, p. 16-19, 2006.
188. TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. Compêndio de fitoterapia. 3ª ed. Curitiba: Herbarium, 1997.
189. TIMBOLA, A. K.; SZPOGANICZ, B.; BRANCO, A.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G. A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. *Fitoterapia*, Milão, v. 72, p. 174-176, 2002.
190. TOLEDO, C. E. M. Estudos anatômicos, químicos e biológicos de casca e extratos obtidos de Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, *Leguminosae*]. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UNESP, Araraquara, 2002.
191. TOOLAN, H. W. Transplantable human neoplasms maintained in cortisone-treated laboratory animals: H.S. #1; H.Ep. #1; H.Ep. #2; H.Ep. #3; and H. Emb.Rh. #1. *Cancer Res*, Chicago, v. 14, n. 9, p. 660-674, 1954.

192. TOUFEN JUNIOR, C.; HOVNANIAN, A. L. D.; FRANCA, S. A.; CARVALHO, C. R. R. Prevalence rates of infection in intensive care units of a tertiary teaching hospital. *Rev Hosp Clin Fac Med Uni Sao Paulo*, São Paulo, v. 58, n. 5, p. 254-259, 2003.
193. VARAMINI, P.; JAVIDNIA, K.; SOLTANI, M.; MEHDIPOUR, A. R.; GHADERI, A. Cytotoxic activity and cell cycle analysis of quinoline alkaloids isolated from *Haplophyllum canaliculatum* Boiss. *Planta Medica*, Stuttgart, v. 75, n. 14, p. 1509-1516, 2009.
194. VEIGA Jr., V. F.; ZUZINO, L.; CALIXTO, J. B.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. *Phytoter Res*. London, v. 15, n. 6, p. 476-480, 2001.
195. VILLAS BOAS, P. J. F.; RUIZ, T. Ocorrência de infecção hospitalar em idosos internados em hospital universitário. *Rev Saúde Pública*, São Paulo, v.38; n.38, p. 372-378, 2004.
196. WAKSMAN, S. A.; LECHEVALIER, H. A. Neomycin a new antibiotic active against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms. *Science*, Washington, v. 109, p. 305, 1949
197. WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; McPHAIL, A. T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, Easton, v. 93, n. 9, p. 2325-2327, 1971.
198. WATERS, W. F. Globalization, socioeconomic restructuring, and community health. *J Community Health*. 2001 Apr; 26(2):79-92.
199. WHO - World Health Organization. Surveillance standards for antimicrobial resistance. Geneva: WHO, 2002.
200. WHO – World Health Organization. Basic document for the selection and characterization of medicaments plants – vegetable drugs. Geneva: WHO, 1978.
201. WHO - World Health Organization. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. *Rev Panam Salud Publica*. 2002 Nov;12(5):366-70.
202. WHO – World Health Organization. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Geneva: WHO, 2000.
203. WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Infectious diseases. Disponível em <http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/>. Acesado em 05 set 2008.
204. WHO. World Health Organization. The World Health Report 1998: life in the 21st Century a vision for all. Geneva: WHO, p. 61-111, 1998.
205. WHO. World Health Organization. Traditional medicine. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>>. Acessado em 30 dec 2009.
206. WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B. V.; RHODES, M. J. C. (Eds.). Secondary products from plants tissue culture. *Oxford*: Clarendon Press, 1990.
207. WINK, M.; SCHNEIDER, D. Fate of plant derived secondary metabolites in three moth species (*Syntomis mogadorensis*, *Syntomeida epilais*, and *Cretonotos transiens*). *J Comp Physiol B. Berlin*, v. 160, n. 4, p. 389-400, 1990.

208. WINN Jr., W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. Koneman, *Diagnóstico Microbiológico*. 6ªed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 1565p.
209. WOISKY, R. G. do RIO. Métodos de controle químico de amostras de própolis. *Dissertação (Mestrado em Fármacos de Medicamentos)*. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996, 74p.
210. WORLD CANCER RESEARCH FUND. Disponível em < <http://www.wcrf.org>>. Acessado em 30 nov 2009
211. WORLD CANCER RESEARCH FUND. Food, nutrition and prevention of cancer: a global perspective. Washington: *American Institute for Cancer Research*, p.35-71, 508-540, 1997.
212. YAMASATO, S.; KAWANISHI, K.; KATO, A.; HASHIMOTO, Y. Organic bases from Brazilian Piptadenia species. *Phytochemistry*, Oxford, v.11, n. 2, p. 737-739, 1972.
213. YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna. 1ª. ed., Chapecó: Argos, 2001.
214. ZHANG, A.; ZHANG, Y.; BRANFMAN, A. R.; BALDESSARINI, R. J.; NEUMEYER, J. L. Advances in development of dopaminergic aporphinoids. *J Med Chem*, Easton, v. 50, n. 2, p. 171–181, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1



XIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICOBACTÉRIAS
III SIMPÓSIO DE COLEÇÕES DE CULTURAS
II SIMPÓSIO DE ESCHERICHIA COLI "LUIZ RACHID TRABULSI"

Certificado

Certificamos que o trabalho "ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE ANADENANTHERA COLUBRINA FRENTE A MICRORGANISMOS MULTIDROGA RESISTENTES" com a autoria de: WEBER, C. R., LOPES, A. B. D., NASCIMENTO, M. S., XIMENES, E. C. P. A foi apresentado na forma de pôster durante o "25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA" em 10 de Novembro de 2009, em Porto de Galinhas-PE.

Porto de Galinhas, 12 de novembro de 2009.

Marina Baquerizo Martinez
Presidente da SBM

Carlos Pelleschi Taborda
1º Secretário da SBM

ANEXO 2



REVISTA BRASILEIRA DE FARMÁCIA

Órgão Oficial da Associação Brasileira de Farmacêuticos

ISSN 0370-372x e ISSN 2176-0667

Rio de Janeiro, 11 de fevereiro de 2010

Prezado Carlos R. Weber, comunicamos o recebimento do trabalho intitulado: **“*Anadenanthera colubrina*: um estudo do potencial terapêutico**”, do qual o senhor é o autor correspondente. O trabalho recebeu o **Nº 288/2010** e foi encaminhado para os revisores da *Revista Brasileira de Farmácia*, que farão uma análise a fim de orientar o parecer do corpo editorial. Tão logo tenhamos uma resposta, entraremos em contato.

Atenciosamente,

Comissão Editorial

Revista Brasileira de Farmácia

ANEXO 3



[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

SCHOLARONE™
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Carlos Weber

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Applied Microbiology*.

Manuscript ID: LAM-2010-0456

Title: ANTIMICROBIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF FRACTIONS FROM ANADENANTHERA COLUBRINA STEM BARK

Authors: Weber, Carlos
soares, carla
de Oliveira, Luciana
Santana, Andrea
da Silva, Teresinha
Nascimento, Márcia
Ximenes, Eulália

Date Submitted: 20-Mar-2010

 [Print](#)  [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.2.1 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2009. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

APÊNDICE

APÊNDICE A

***Anadenanthera colubrina*: um estudo do potencial terapêutico**

***Anadenanthera colubrina*: a therapeutic potential study**

Carlos R. Weber¹, Carla M. L. Soares², Andréa B. D. Lopes³, Terezinha S. Silva⁴,
Márcia S. Nascimento⁵, Eulália C.P.A. Ximenes⁶.

RESUMO

A espécie *Anadenanthera colubrina* apresenta potencial terapêutico de fácil acesso, reconhecida pela medicina popular e muito utilizada na elaboração de fitoterápicos. O presente estudo tem como objetivo a realização de uma revisão sistemática sobre esta planta e seu potencial terapêutico. A estratégia de busca para identificação dos estudos foi realizado através de pesquisa nos bancos de dados virtuais ScienceDirect, SCIRUS, LILACS, SciELO, SCOPUS, MEDLINE e SciFinder, no período de março a dezembro de 2009, utilizando as palavras-chave: *Acacia Cebil*, *Piptadenia Cebil*, *Piptadenia macrocarpa*, *Anadenanthera macrocarpa*, *Anadenanthera colubrina*, *Piptadenia microphylla*, *Piptadenia hassleriana*. Com a busca foram obtidos 1306 artigos, que submetidos aos critérios de exclusão, foram reduzidos a 34 estudos. Destes, 16 artigos visaram isolamento de compostos fitoquímicos ou comprovaram atividade biológica através de bioensaios, enquanto 18 artigos confirmaram ação terapêutica através do conhecimento popular. A conclusão que *Anadenanthera colubrina* apresenta um potencial terapêutico reconhecido é irrefutável, entretanto, é evidente que ainda apresenta questionamentos científicos sobre seu uso, mecanismo de ação, posologia e indicações terapêuticas. Trata-se de uma promissora planta, explorada do ponto de vista etnobotânico, mas ainda pouco explorada no sentido farmacológico.

Palavras-chave: Etnofarmacologia. Plantas medicinais. Fitoterapia.

ABSTRACT

The species *Anadenanthera colubrina* has therapeutic potential of easy access, recognized by folk medicine and widely used in the preparation of herbal medicines. This study aimed to carry out a systematic review on this plant and its therapeutic potential. The search strategy to identify the studies was conducted by searching the virtual database Cochrane Library, ScienceDirect, SCIRUS and LILACS, SciELO, MEDLINE and SCOPUS from March to December 2009 using the keywords: *Acacia Cebil*, *Piptadenia Cebil*, *Piptadenia macrocarpa*, *Anadenanthera macrocarpa*, *Anadenanthera colubrina*, *Piptadenia microphylla*, *Piptadenia hassleriana*. The search returned 1306 articles, which submitted to the exclusion criteria, were reduced to 34 studies. Of these, only 16 articles aimed to demonstrate the biological activity by bioassays, while 18 articles confirmed therapeutic action through popular knowledge. The conclusion that *Anadenanthera colubrina* has recognized therapeutic potential is undeniable; however, it is clear that science still has questions about its use, action mechanism, dosage and treatment indications. This is a promising plant, exploited in ethnobotanical terms, but still few exploited in the pharmacological sense.

Keywords: Ethnopharmacology. Medical plants. Fitoterapy.

¹ Aluno de Pós-Graduação em Patologia – CCS – UFPE. Av. Prof. Moraes Rego - S/N - Cidade Universitária - HC - Bloco A – Térreo. CEP: 50740-900. Recife/ PE– Brasil. E-mail: carlosrws@gmail.com

² Aluna de Pós-Graduação em Patologia

³ Aluna de Pós-Graduação em Química - DQF – UFPE

^{4,5,6} Docentes do Departamento de Antibióticos - CCB – UFPE

INTRODUÇÃO

O gênero *Anadenanthera* pertence à seção *Mimosoideae* da família *Fabaceae*, ordem *Fabales*. A primeira descrição científica data de 1737 no *Hortus Clinffortianus*, a partir da observação de um espécime no Jardim de Clifford na Holanda. Pesquisadores como Stanford (1916) e Siri Von Reis Altschul (1964) compartilham da teoria que este exemplar teve crescimento a partir de sementes oriundas do Oeste da Índia ou Norte da América do Sul (TORRES & REPKE, 1996).

A denominação mais remota desta planta é *Mimosa peregrina*, espécie catalogada por Linneaus (SAFFORD, 1916), que não especificou a causa de ter aplicado o epíteto peregrina, no entanto, sua descrição foi baseada em um registro mais completo do *Hortus Clinffortianus* (TORRES e REPKE, 1996).

O gênero *Anadenanthera*, inicialmente proposto por J. P. M. Brenan (1955) e Reis Altschul (1964, 1967), consistia de quatro espécies, anteriormente incluídas como seção *Niopa* do gênero *Piptadenia*, originalmente concebida por Benthham (1840, 1841-1842, 1874-1875) devido às suas semelhanças morfológicas. No entanto, o pesquisador Siri Von Reis Altschul (1964, 1967), em sua revisão taxonômica do gênero considerou este ser composto de apenas duas espécies, *A. Peregrina* (L.) Speg. e *A. colubrina* (Vell.) Brenan, cada uma delas contendo duas variedades. As duas variedades de *A. peregrina* são *A. peregrina* (L.) Speg. var. *peregrina* Reis Altschul e *A. peregrina* (L.) Speg. var. *falcata* (Benth.) Reis Altschul, enquanto as variedades de *A. colubrina* são *A. colubrina* (Vell.) Brenan var. *colubrina* Reis Altschul e *A. colubrina* (Vell.) Brenan var. *Cebil* (Griseb.) Reis Altschul. Elas foram distinguidas por meio de poucos caracteres morfológicos consistentes e suas correlações com localizações geográficas particulares. Atualmente, ainda existem equívocos relacionados a taxonomia desta planta, fato que dificulta comparação mais acurada entre os trabalhos atuais e trabalhos do início da sua investigação farmacológica.

Anadenanthera colubrina é descrita na literatura como um arbusto alto (com altura variando entre 3 e 30 metros), cujo diâmetro do caule pode variar entre 30 e 50 cm (REIS ALTSCHUL, 1964). A casca apresenta espessura entre 2-5 cm, com coloração acinzentada, e aspecto liso ou espiculado. Fornece madeira vermelho-escura, compacta, não elástica, rija, pesada (densidade 1,07 g/cm³), de grande durabilidade, própria para construção naval e civil, dormentes de ferrovias, marcenaria, carpintaria, muito utilizada como lenha e na produção de carvão vegetal (CORRÊA, 1984; LORENZI, 1998). As folhas são compostas, folíolos rígidos, flores brancas dispostas em capítulos globosos, fasciculados, axilares. O fruto é descrito como uma vagem achatada, podendo apresentar até 32 cm de comprimento (Figura 1) (CORRÊA, 1984, LORENZI, 1998).

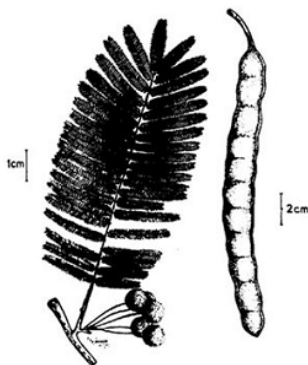


Fig. 1 - Folha e fruto de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *Cebil* (Griseb.) Von Reis Alt. Fonte: Saldias (1993)

As sementes de *A. colubrina* possuem alcaloides psicoativos, dentre os quais a bufotenina (5-OH-DMT) varia de 1 a 12% da massa das sementes e o N,N-dimetiltriptamina (N,N-DMT) e 5-metoxi-dimetiltriptamina (5-MeO-DMT). Registros remetem a utilização das sementes na forma de rapé, podendo ocasionalmente ser fumadas ou empregadas por via retal (TORRES & REPKE, 2009).

Esta espécie ocorre apenas ao sul da linha do Equador, e tem uma distribuição estimada entre a latitude de 0°-30°S (HUNZIKER, 1973; REIS ALTSCHUL, 1964). Foi adaptada às mais variadas condições climáticas e ambientais, essa adaptação é muito mais desenvolvida que outras espécies da família *Fabaceae*, podendo ser encontrada em margens de rios ou encostas seca de altitudes de 2700 m (TORRES & REPKE, 2005).

No Brasil, ocorre numa faixa compreendida desde o Maranhão até São Paulo, passando por Minas Gerais e Mato Grosso de Sul, sendo uma das espécies lenhosas típicas do bioma Caatinga (LORENZI, 1998).

A. colubrina floresce exuberantemente todos os anos durante os meses de setembro a novembro, o que a torna ornamental e própria para arborização de parques e praças, seus frutos (vagens) amadurecem de agosto a setembro (LORENZI, 1998).

Apesar de ser uma espécie encontrada na caatinga, bioma exclusivamente brasileiro, *A. colubrina* não é uma espécie exclusiva do Brasil. Estudos realizados na América Latina relatam que comunidades da Argentina, Venezuela e Bolívia utilizam este vegetal para diversos fins terapêuticos ou não, utilizando também como alucinógeno em rituais religiosos (HILGERT, 2001; RODD, 2002; ANGELO, 2004; MACÍA; GARCIA;VIDAURRE, 2005).

MÉTODOS

O presente estudo teve como referência às diretrizes metodológicas para realização de uma revisão sistemática, as quais estão de acordo com protocolo pré-determinado no manual Cochrane para revisões sistemáticas.

A estratégia de busca para identificação dos estudos se deu através realização de pesquisa nos bancos de dados virtuais ScienceDirect, SCIRUS, LILACS, SciELO, SCOPUS, MEDLINE e SciFinder durante o período compreendido entre março e dezembro de 2009. Para isso foram utilizadas as seguintes palavras-chave: *Acacia Cebil*, *Piptadenia Cebil*, *Piptadenia macrocarpa*, *Anadenanthera macrocarpa*, *Anadenanthera colubrina*, *Piptadenia microphylla*, *Piptadenia hassleriana*. A utilização da elevada quantidade de palavras-chave é justificada pelo fato da espécie botânica apresentar diversas sinônimas.

Critérios de inclusão e exclusão dos estudos

Nesta revisão foram incluídos artigos com dados sobre etnofarmacologia da espécie *A. colubrina*, além de estudos com informação acerca das formas de utilização popular. Os artigos que estavam de acordo com estes critérios foram divididos em tres grupos: o primeiro grupo compreendeu todos os artigos sobre a avaliação do potencial terapêutico determinada através de bioensaios, incluindo artigos que avaliassem atividades citotóxica, antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, antimicrobiana de extratos ou compostos isolados, e o segundo grupo compreendeu estudos sobre conhecimento do potencial terapêutico, os quais não estavam relacionados diretamente aos bioensaios, mas traziam informações relevantes, principalmente de cunho popular, sobre atividade biológica da planta. O terceiro grupo trazia informações sobre

isolamento de compostos químicos realizados na espécie botânica. Não houve restrição quanto ao idioma do estudo, nem ano de publicação.

Foram excluídos os artigos em duplicados nas bases de dados, bem como os artigos que tinham o objetivo restrito ao estudo genético, paleontológico, ecológico ou botânico de *A. colubrina*, sem relatado interesse medicinal, químico ou qualquer relação etnofarmacológica.

Coleta dos dados

Os dados foram extraídos de cada estudo, em ambos os grupos, de forma independente pelos autores. No GRUPO 1, caracterizado pelos relatos da avaliação do potencial terapêutico de *A. colubrina* através da investigação da atividade biológica, foram extraídas as informações acerca do objetivo e conclusão dos bioensaios. No GRUPO 2, caracterizado por apresentar informações sobre o conhecimento do potencial terapêutico, foi extraída toda e qualquer informação acerca do potencial medicinal, além de informações sobre uso terapêutico de qualquer parte do vegetal, sob qualquer forma de apresentação medicamentosa. No GRUPO 3, caracterizado pelos artigos de isolamento de compostos fitoquímicos, foram extraídas informações sobre classe fitoquímica, bem como sua estrutura química.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *Cebil* (Griseb.) von Reis Alt., alvo deste estudo, apresenta diversas sinônimas (ALTSCHUL, 1964), assim como diversos nomes populares e indígenas (Tabela 1). Este fato dificultou a revisão dos estudos relacionados ao seu potencial terapêutico, descrito através das inúmeras determinações *in vitro* e *in vivo* das suas atividades biológicas, bem como àquelas sobre sua utilização popular.

Nas bases de dados supracitadas foram encontradas 1306 artigos referentes à espécie botânica, publicados entre os anos de 1955 e 2010. Destes artigos, foram selecionados 34 estudos após a utilização dos critérios de exclusão para a revisão sistemática. Dez (10) foram identificados como pertencentes ao GRUPO 1 e estão apresentados na Tabela 2 e 18 pertencentes ao GRUPO 2, apresentados na Tabela 3. Pertencentes ao GRUPO 3, foram identificados apenas 6 artigos, os quais estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 1 – Sinonímia científica, nomes populares e indígenas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *Cebil* (Griseb.) von Reis Alt.

Sinonímia	Nomes Populares	Conhecimento Indígena			Referência
		Nomes	Comunidades	País	
<i>Acacia Cebil</i> (Griseb.) <i>Piptadenia macrocarpa</i> Benth. <i>Piptadenia macrocarpa</i> Benth. var. <i>vestita</i> Chod. & Hass. <i>Piptadenia macrocarpa</i> Benth. var. <i>genuina</i> Chod. & Hass. <i>Piptadenia macrocarpa</i> Benth. var. <i>Cebil</i> (Griseb.) Chod. & Hass. <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth.) Brenan <i>Piptadenia Cebil</i> (Griseb.) Griseb. <i>Piptadenia microphylla</i> Benth. <i>Piptadenia Hassleriana</i> Chod. <i>Piptadenia Hassleriana</i> Chod. var. <i>fruticosa</i> Chod. & Hass.	Angico Angico-de-carço Angico-vermelho Angico-do-campo Angico-preto Arapiraca Angico-de-casca	Aimpä, Aimpë	Tupari, Rio Branco e Guaporé	Brasil	Caspar (1956), Wassén (1965, 1967b).
		Akiri	Bororo, Mato Grosso.	Brasil, Paraguai	Fabian (1992)
		Cebil, Cébil, Cevil, Cibil, Sebil, Sevil.	---	Argentina, Paraguai, Uruguai	Torres e Repke (2006), Sotelo de Narvaez (1965 , primeira citação datada em 1583), Reis Altschul (1972)
		Hatáj, Há'tax, Jatáj, Jatáj-lé	Hatax, Jatáj- Wichi	Bolivia	Arenas (1992), Califano (1976), Dasso (1985), Dijour (1933)
		Kurupa, Kurupáí, Curupay	Guaraní (Sul do Brasil)	Brasil	Pardal (1937), Reis Altschul (1967)
		Vihó	Tukano, Rio Vaupés	Colombia	Reichel-Dolmatoff (1971)
		Vilca, Huillka, Willka.	Huilca, Villca, ---	Peru Bolivia	Torres e Repke (2006), Reis Altschul (1967), Duviols (1967, citado por Cristobal de Albornoz, 1580), Larraíns Barros (1976), Yacovleff e Herrera (1934-1935)

Tabela 2 – Estudos relacionados à atividade biológica de *A. colubrina*, comprovada através de bioensaios *in vitro* e *in vivo*.

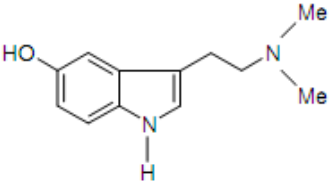
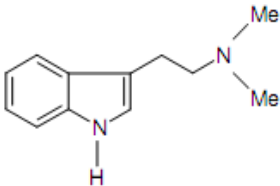
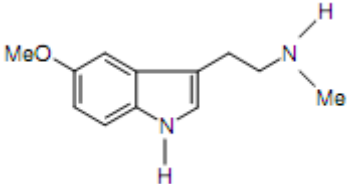
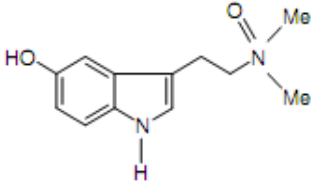
Referência Bibliográfica	Ano	Objetivo	Conclusão
Desmadechelier et al	1999	Identificar atividade antioxidante e propriedades anti-radicaais livres <i>in vitro</i> de extratos aquoso e metanólico da casca de <i>A. macrocarpa</i> e mais três outras espécies utilizadas como agentes anti-inflamatórios no interior da Bahia.	Os extratos hidroalcoólico e metanólico testados apresentaram atividade <i>in vitro</i> propostas nos testes. O extrato metanólico da casca de <i>A. macrocarpa</i> apresentou a maior atividade antioxidante e seu extrato aquoso mostrou a maior atividade contra o íon peroxila sugerindo que estas propriedades possuem um importante papel na atividade anti-inflamatória da planta.
Tokarnia et al	1999	Estudar a intoxicação cianídrica em bovinos promovida por <i>A. colubrina</i> e outras plantas cianogênicas.	As folhas de <i>A. colubrina</i> são mais tóxicas quando em brotos do que maduras. Sua toxicidade é perdida lentamente quando dessecadas. Os resultados positivos do teste do papel picro-sódico realizado foram mais lentos para brotos de <i>A. colubrina</i> e mais retardadas nas folhas maduras sugerindo que o teste tem valor apenas relativo na avaliação de glicosídeos cianogênicos em material vegetal.
Brito et al	2000	Testar em coelhos a toxicidade de folhas secas de <i>P. macrocarpa</i> coletadas e armazenadas durante 4-6 meses sob duas formas: sacos de algodão e embalagens de vidro.	A toxicidade neuromuscular em coelhos foi observada em folhas dessecadas armazenadas nos primeiros cinco meses. A dose letal de 6g/kg foi caracterizada nas folhas em fase brotação e posteriormente dessecadas.
Moretão et al	2003	Estudar a atividade imunológica da goma extraída de <i>A. colubrina</i> , formada por um complexo de heteropolissacarídeos ácidos, constituídos principalmente por galactose e arabinose (ARAGAL) em macrófagos peritoneais de ratos.	A exposição <i>in vitro</i> do ARAGAL aumentou a atividade fagocítica de macrófagos com uma relação tempo e dose-dependente. Os resultados obtidos sugeriram que a goma possivelmente possui um papel como mediador de resposta imunológica.
Moretão et al	2004	Determinar a atividade antitumoral e imunomoduladora da goma extraída de <i>A. colubrina</i> , formada por um complexo de heteropolissacarídeos ácidos, constituídos principalmente por galactose e arabinose (ARAGAL) na ativação de macrófagos peritoneais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	A exposição <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do ARAGAL aumentou a habilidade fagocitária e produção de superóxido, bem como aumentou em número os macrófagos peritoneais de ratos e a produção de (fator de necrose tumoral alfa) α -TNF pelos macrófagos, que se mostraram hábeis em destruir células do Sarcoma 180. Esses resultados sugerem a possível participação do ARAGAL como mediador de resposta imunológica frente a tumores.

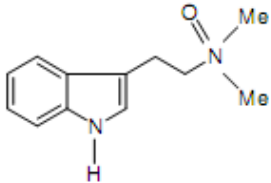
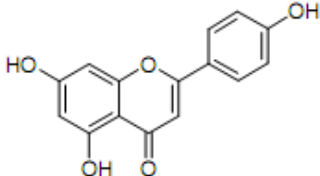
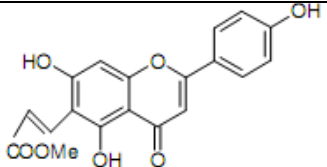
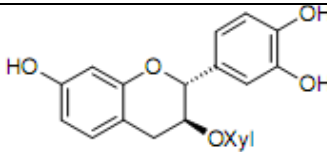
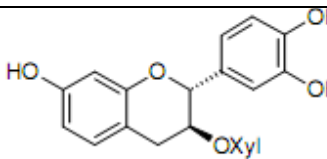
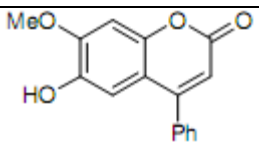
Luna et al	2005	Testar a atividade moluscicida e larvicida de 23 espécies de plantas.	O extrato da casca de <i>A. macrocarpa</i> composta basicamente de fenois, flavonoides e terpenos apresentou atividade larvicida e moluscicida. outras espécies apresentaram toxicidade mais pronunciada como <i>Operculina macrocarpa</i> e <i>Caesalpinia echinata</i> .
Schepetkin; Quinn	2006	Artigo na forma de review que aborda informações sobre as propriedades terapêuticas de diversos polissacarídeos oriundos de plantas, fungos e algas com atividade moduladora de macrófagos. O artigo aponta possíveis adjuvantes terapêuticos com esta propriedade.	A maioria dos polissacarídeos com atividade imunomoduladora produzidos por plantas ligam-se a uma variedade de receptores na superfície de macrófagos como CD14 e CR3. O tratamento com polissacarídeos de plantas induz ativação de NF-kB promovendo secreção de diversos compostos incluindo citocinas, no entanto pouco se conhece sobre a estrutura molecular dos polisacarídeos.
Da Silva et al	2006	Realizar entrevistas com produtores e técnicos dos 17 municípios que compõem a região do Seridó, Rio Grande do Norte – Brasil, para identificar plantas tóxicas para bovinos e equinos.	Foram reportados diversos casos de intoxicação de ruminantes por diversas espécies de plantas, incluindo vegetais de toxicidade ainda não comprovada. A intoxicação por plantas cianogênicas como <i>A. colubrina</i> são importantes na região e o acesso a galhos e folhas, principalmente, está relacionado à quebra de galhos durante temporais e ventanias, corte para aproveitamento da madeira ou ingestão dos brotos de folhas cortados por formigas. Todos relataram que tomam devidos cuidados em cercar os animais durante corte ou poda do angico. Os sintomas descritos do envenenamento sugerem toxicidade neuromuscular. De acordo com os entrevistados, a morte dos animais ocorreu em até duas horas.
Da Silva et al	2009	Avaliar o efeito sinérgico de extratos vegetais do angico e de outras plantas como o manjerição com Mancozeb no controle de infecções por <i>Fusarium oxysporum</i> Realizar comparação destes extratos ao fungicida químico, em sementes de feijão caupi.	O extrato combinado de angico e manjerição não inibiu o crescimento micelial do fungo. O extrato de manjerição isoladamente, se mostrou um potente fungicida. A associação de Mancozeb e extrato de angico proporcionaram uma redução do desenvolvimento da infecção fungic nas plantas avaliadas.
Svetaz et al	2010	Investigar a atividade antifúngica em plantas utilizadas popularmente contra micoses, e comparar às plantas não utilizadas para esses fins. Identificar diferenças nas atividades de plantas com potencial antifúngico frente a dermatófitos, leveduras ou <i>Aspergillus</i> spp.	As abordagens etnofarmacológicas são ferramentas importantes na busca por tratamentos e para cura de micoses superficiais, pois fornece informações sobre plantas com atividade antifúngica.

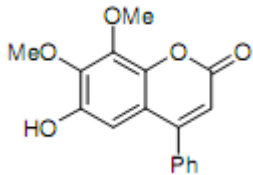
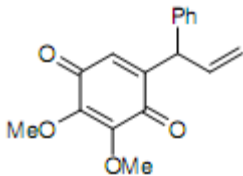
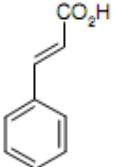
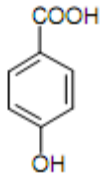
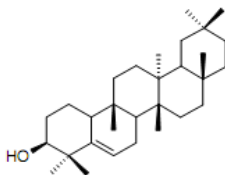
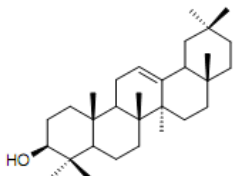
Tabela 3 – Estudos relacionados a etnofarmacologia da espécie *A. colubrina* (indicação terapêutica, parte utilizada da planta , forma de utilização).

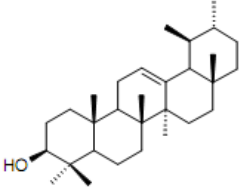
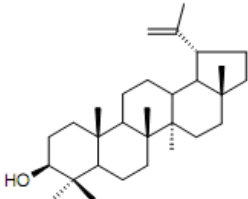
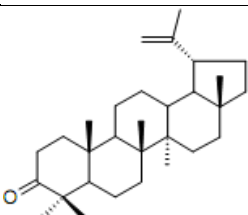
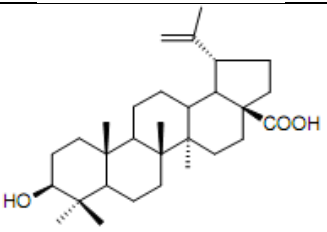
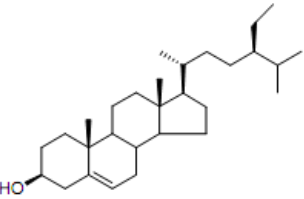
Referência	Indicação Terapêutica	Parte da planta utilizada	Forma de utilização
Paula, 1981	Tratamento de doenças hepáticas, infecção gonocócicas, leucorreia e infecção ovariana, piorreia e bronquites, dores de cabeça, resfriados e sinusites.	Casca do caule e sementes	Cocção da casca do caule, gargarejo. Inalação de sementes moídas secas.
Agra et al, 1994; Agra et al, 1996; Agra, 1996; Agra, 1999; Albuquerque & Oliveira, 2007.	Tratamento da tosse, tosse crônica, bronquite e inflamação geral.	Cascas do caule	A partir da maceração em um litro de vinho ou cachaça. A mistura é ingerida três vezes ao dia até que os sintomas desapareçam
Hilgert, 2001	Apresenta ação anti-inflamatória e antipirética	Cascas do caule	Cocção e ingestão da infusão.
Almeida et al., 2006	Tratamento da bronquite e pneumonia. A ação terapêutica é justificada pela presença de fenois, taninos, triterpenos e quinonas.	Cascas do caule	Cocção e ingestão e inalação da infusão.
Macia, Garcia e Vidaurre, 2005	Utilizado com objetivo de retardar menstruação.	Sementes da vagem	Cocção e ingestão da infusão.
Albuquerque, 2006	Utilizado no tratamento da tosse	Cascas do caule	Cocção juntamente com açúcar ou mel (xarope) e ingestão da mistura.
Agra et al, 2007	Utilizado no tratamento da tosse, bronquite e coqueluche	Cascas do caule	Realizada da maceração em bebida alcoólica destilada. Ingestão da bebida.
Albuquerque et al, 2007a	Tratamento da anemia, tosse, processo inflamatório, asma, gripe.	Cascas do caule	Solução hidroalcoólica com bebida destilada. Ingestão da bebida.
Albuquerque et al, 2007b	Tratamento da anemia, tosse, asma, bronquite, gripe, prisão de ventre, processos inflamatórios, neoplasias, distúrbios hemostáticos, trauma, difteria, fissuras nos pés, gastrite. Utilizado como expectorante.	Cascas do caule, raiz, flor, folha, fruto	Maceração e cocção da casca do caule, associado ao açúcar ou mel. Maceração em bebida alcoólica. Ingestão da bebida.
Lucena et al, 2007	Apresenta atividade anti-inflamatória e é utilizado no tratamento de doenças respiratórias.	Cascas do caule	--
Araújo et al., 2008	Apresenta atividade anti-inflamatória	Cascas do caule	Extrato alcoólico produzido com bebida destilada
Brandão et al, 2008; Monteiro et al, 2006	Utilizado no tratamento da Bronquite	Resina do caule	Maceração com bebida alcoólica e água, e ingestão da bebida.
Monteiro et al, 2006	Tratamento de processos Inflamatórios, tratamento de feridas, tratamento de doenças do aparelho geniturinário, respiratório (especialmente tosse). Uso veterinário	Casca do caule	Cocção e ingestão ou produção de extrato alcoólico para uso externo.

Tabela 4 – Estrutura dos compostos químicos isolados da *A. colubrina*.

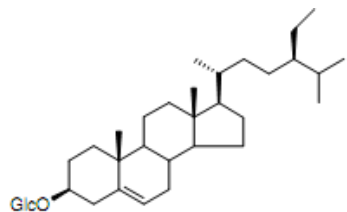
Nome dos compostos isolados	Estrutura química dos compostos isolados	Classe de metabólito secundário	Parte da planta	Referência Bibliográfica
Bufotenina		Alcaloide	Vagens	Iacobucci et al, 1964
			Semente	Pachter et al, 1959; Fisch et al, 1955; Iacobucci et al, 1964; Yamasato et al, 1972
N, N- dimetiltryptamina		Alcaloide	Semente	Iacobucci et al, 1964; Yamasato et al, 1972
			Vagens	Fisch et al, 1955
5 Metoxi-N-metiltryptamina		Alcaloide	Casca	Iacobucci et al, 1964
Óxido de bufotenina		Alcaloide	Semente	Fisch et al, 1955

Óxido de N, N-dimetiltriptamina		Alcaloide	Semente	Fisch et al, 1955
Apigenina		Flavonoide	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo et al, 2004
Ananthoflavona		Flavonoide	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo et al, 2004
Ananthosídeo		Flavonoide	Casca	Piacente et al, 1999
Prosopina		Flavonoide	Cerne	Miyauchi et al, 1976
Dalbergina		Outro composto aromático	Cerne	Miyauchi et al, 1976

Kuhimannina		Outro composto aromático	Cerne	Miyauchi et al, 1976
Dimetoxidalbergina		Outro composto aromático	Cerne	Miyauchi et al, 1976
Ácido cinâmico		Outro composto aromático	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo et al, 2004
Ácido 4-hidroxibenzoico		Outro composto aromático	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo et al, 2004
Alnusenol		Terpenoides	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo et al, 2004
β-amirina		Terpenoides	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo et al, 2004

α -amirina		Terpenoides	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo et al, 2004
Lupeol		Terpenoides	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo et al, 2004
			Cerne	Miyauchi et al, 1976
Lupeona		Terpenoides	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo et al, 2004
			Cerne	Miyauchi et al, 1976
Ácido betulínico		Terpenoides	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo et al, 2004
β -sitosterol		Esteroides	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo et al, 2004
			Cerne	Miyauchi et al, 1976

Daucosterol

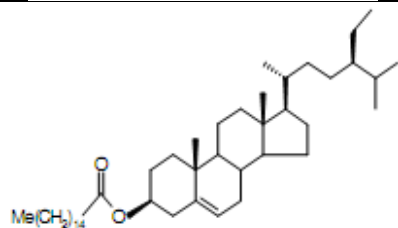


Esteroides

Cerne

Miyauchi et al, 1976

Palmitato de β -sitosteril

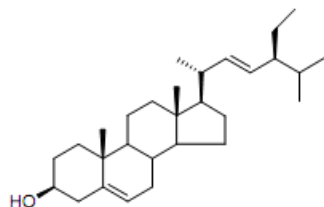


Esteroides

Cerne

Miyauchi et al, 1976

Stigmasterol



Esteroides

Partes aéreas

Gutierrez-Lugo et al, 2004

Muitas espécies de plantas medicinais presentes na caatinga são amplamente conhecidos e utilizadas pela população, incluindo a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb). O número de estudos de plantas medicinais na região semi-árida do Nordeste tem crescido progressivamente. A maioria destes estudos é descritiva, no entanto, apresentam também uma visão popular que anuncia a plantas junto às suas indicações terapêuticas, modo de utilização, e a parte utilizada para preparação terapêutica (CABRAL & AGRA, 1998; COSTA-NETO & OLIVEIRA, 2000; SILVA & ANDRADE, 2002; ALMEIDA & ALBUQUERQUE, 2002; MOREIRA et al, 2002; ALBUQUERQUE & ANDRADE, 2002a, b; ALMEIDA et al, 2006). Os testes sobre conhecimento específico de plantas locais, entretanto, são raros (ALMEIDA et al., 2005; MONTEIRO et al., 2006) e têm sido geralmente limitados a construção de generalizações sobre o uso de recursos medicinais em regiões áridas e semi-áridas

Estudos mostram que a *A. colubrina* é uma das mais populares espécies botânicas cujas propriedades medicinais são amplamente referidas pela população nativa da área endêmica desta espécie (AGRA et al, 2007).

A. colubrina também têm sido documentada por Albuquerque et al (2007) em duas pesquisas realizadas no Mercado de São José, no Recife, Estado de Pernambuco, Brasil. Estes estudos foram conduzidos através da aplicação de questionários específicos, e concluíram, que na maioria das vezes, a planta é administrada oralmente, preparada por decocção, infusão, maceração ou como sumo, obtido após a maceração das folhas ou outras partes da planta com água.

Algumas preparações são descritas por Agra et al. (2007) pelo nome de "garrafada", constituída por uma preparação de diferentes plantas, principalmente raízes e cascas de caule. O processo de preparação inclui maceração e armazenamento de parte da planta por um período de 3 dias a 1 semana em bebida alcoólica destilada (preferencialmente cachaça). Ela é usada principalmente por adultos, mais freqüentemente pelos homens. Outras preparações são os xaropes de açúcar ou mel, que são conhecidos no folclore como "lambedor", são usados principalmente no tratamento de doenças pediátricas, inflamações de garganta ou como expectorante. Para uso externo, a forma preferida é a aplicação em cataplasma, indicada principalmente para dores reumáticas, inflamações dermatológicas e úlceras externas, nesta preparação, as folhas são aquecidas com manteiga ou azeite e aplicadas sobre a parte afetada.

Alguns fitoterápicos para uso externo são preparados como decocção e são utilizados para lavar as áreas afetadas por doenças de pele ou indicado após o banho sem restrição a área lesada. Este modo de utilização também foi documentado em um levantamento de plantas medicinais comercializados na Bolívia por Macia, Garcia e Vidaurre (2005). Em Santa Cruz, Bolívia, é utilizada não somente para fins medicinais, mas também para curtir o couro, além da utilização da sua madeira para fins de construção ou como lenha (SALDIAS, 1993).

Albuquerque et al (2006) justificou o conhecimento e ampla citação de *A. colubrina* pela população sertaneja adepta a medicina popular pelo fato de ser uma árvore autóctone e, sendo a casca a parte mais utilizada, a sua disponibilidade não é limitada pela sazonalidade. Popularmente, a casca do caule é unânime como a mais utilizada na preparação de cocções e tinturas. Uma importante característica das plantas medicinais para a comunidade é o fato de ter um fornecimento contínuo para elaboração de preparações terapêuticas, como por exemplo, a casca do caule. Entretanto, o fornecimento contínuo de matéria prima não garante sustentabilidade de suas colheitas, uma vez que a coleta destes materiais podem destruir o exemplar botânico e não garantir novas coletas (ALBUQUERQUE & ANDRADE, 2002a; ALBUQUERQUE et al, 2005a, b).

Em alguns trabalhos foi demonstrado que a casca do caule de *A. colubrina* contém, em média, 15,38% de tanino. As vagens contêm sementes com 3% de taninos e cerne 1,8% deste metabólito secundário (CORRÊA, 1984; LORENZI, 1998).

É uma das plantas mais empregadas pelos curteiros; dela exsuda abundante goma resina com aplicações industriais e medicinais, pois é empregada no tratamento da bronquite (CORRÊA, 1984; LORENZI, 1998). Estudos mais recentes demonstraram que a quantidade de taninos na casca do caule poderia variar de 3,21 a 11,07% em relação ao peso total (MONTEIRO, 2005; NOZELLA, 2001), já que a concentração destes compostos depende da interação planta-ambiente, em resposta a diversos fatores biológicos e químicos, como concentração de nitrogênio e oxigênio no solo (FREITAS et al, 2004). O mesmo estudo ainda demonstrou não haver diferenças significativas entre os teores de taninos e flavonoides da casca da árvore e de suas folhas.

MORS et al (2000) relataram uma evidente atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *A. colubrina*, no entanto, alguns estudos questionam esta atividade biológica. O trabalho de Gonçalves, Alves Filho e Menezes (2005) expõe uma inexistente atividade antimicrobiana dos extratos desta espécie, e aponta como causa a resistência das linhagens de microrganismos a antibióticos usuais. Este estudo ainda sugere que os micro-organismos teriam apresentado resistência também a fração hidroalcoólica do extrato bruto.

Os micro-organismos os quais foram testados as drogas vegetais, na maioria dos estudos relatados na literatura, não tiveram sua resistência testada contra antibióticos comerciais, assim como não foram quantificados teores de metabólitos secundários como taninos e flavonoides. Esse fato dificultou a comparação mais acurada entre estes resultados discrepantes.

Embora muitos metabólitos sejam relatados neste gênero (Tabela 4), poucos trabalhos foram realizados mostrando a importância biológica de seus compostos isolados e purificados. Gutierrez-Lugo et al. (2004), estudando os inibidores da lipoxigenase, verificaram que entre os 12 compostos isolados das partes aéreas de *A. colubrina*, os mais ativos eram: ananthoflavona, lupenona, lupeol, α -amirina e apigenina. A inibição da lipoxigenase é uma área de pesquisa significativa devido a suas implicações no tratamento do câncer, da aterosclerose e de várias doenças inflamatórias (STEELE et al, 1999; BRASH, 1999; NATARAJAN et al, 1996).

Desmarchelier et al (1999) relataram que o extrato das cascas do caule de *A. colubrina* suprimiu a geração de radicais peróxila e a degradação do DNA mediado pelo radical hidroxila, como também inibiu a peroxidação lipídica em ratos. Desta forma, os resultados obtidos sugeriram que tal atividade antioxidante pode desempenhar um papel importante na atividade anti-inflamatória descrita para esta planta.

Em outra investigação relacionada com *A. colubrina*, foi comprovado que o extrato das cascas de sua madeira apresentou toxicidade contra *Artemia salina*, um microcrustáceo de água salgada (LUNA et al, 2005). De acordo com McLaughlin, Chang e Smith (1991), este ensaio é considerado uma ferramenta útil para a avaliação preliminar de toxicidade e tem mostrado boa correlação com atividade citotóxica frente a tumores sólidos humanos.

A utilização de produtos farmacêuticos contendo a espécie *A. colubrina* (Elixir Sanativo®) originam-se das propriedades adstringentes de sua casca. A decocção da casca ralada é utilizada para complicações hepáticas, gonorreia, leucorreia, infecção dos ovários e como depurativo do sangue. O xarope da casca e da resina é administrado por via oral no tratamento da bronquite e angina. Também a decocção da casca e resina é utilizada em gargarejos e no tratamento da piorreia. Para dores de cabeça, resfriados e secreção pulmonar são realizados inalações de quantidades pequenas de sementes

previamente secas ao sol, assadas e moídas (PAULA,1981; MONTEIRO et al, 2006). No entanto, Brandão et al (2008) expõe que não há comprovação científica das propriedades asseguradas pela medicina popular desta planta medicinal.

Extratos hidroalcoólico e acetato de etila da espécie *Anadenanthera colubrina* apresentaram o alcaloide N,N-imetiltriptamina, esteroides (palmitato de β -sitosterol, β -sitosterol, glicosídeos), flavonoides, triterpeno (lupeol), e compostos fenólicos (dalbergina, 3,4,5-dimetoxidalbergina) (LORENZI & MATOS, 2002).

Investigações químicas das partes aéreas desta árvore resultou no isolamento de um novo flavonoide chamado de anadanthoflavona, além dos ácidos alnusenol lupenona, lupeol, estigmasterol, apigenina, ácido 4-hidrobenzênico e ácido cinâmico (GUTIERREZ-LUGO et al, 2004). O alcaloide com propriedades psicotrópicas presente em sua estrutura é a bufotenina (DANTE ANGELO & CAPRILES, 2004). A casca desta árvore é rica em taninos, que conferem propriedades medicinais, tais como ação anti-inflamatória, anti-oxidante e antimicrobiana (DESMARCHELIER et al, 1999, MONTEIRO et al, 2005). A resina de *A. colubrina* demonstrou forte atividade antitumoral frente a linhagem de células do sarcoma 180 (MORETÃO et al, 2004), em consonância com as indicações populares abordadas nesta revisão.

Outros trabalhos têm focado principalmente a importâncias de substâncias psicoativas como parte de cerimônia religiosas, utilizando para isso alguma parte da espécie *A. colubrina* (DANTE ANGELO & CAPRILES, 2004).

Fisch et al. (1955) estudaram a composição química das sementes e vagens de duas espécies, *A. peregrina* Benth. e *A. colubrina* Benth. Nas sementes e vagens de ambas as espécies foram encontradas quatro bases indólicas. As vagens continham o composto N,N-dimetiltriptamina e as sementes as substâncias bufotenina e os óxidos dessas duas substâncias (Tabela 4). Os autores citaram ainda a presença dessa substância como o alcaloide majoritário nas espécies estudadas. De acordo com Pachter et al. (1959), as sementes de *A. colubrina* constituem-se em uma rica fonte de alcaloides, sendo também bufotenina o alcaloide mais abundante.

No Brasil e na América latina, existem indícios do uso de sementes de *A. colubrina* como rapé (SMET & RIVIER, 1987). A produção manufaturada de “rapé” tem por finalidade sua utilização em rituais.

Nesta conjuntura, mesmo que se tenha um conhecimento popular acerca da ação terapêutica de *A. colubrina*, ainda existe a necessidade de uma maior investigação científica com finalidade de averiguar e comprovar as informações obtidas através do conhecimento popular.

CONCLUSÃO

Anadenanthera colubrina apresenta um potencial terapêutico reconhecido e utilizado pela medicina popular. A espécie botânica é nativa da caatinga, encontrada principalmente no nordeste brasileiro e, apesar de amplamente utilizada na medicina tradicional pelos nativos da região, apresenta questionamentos científicos, inerentes ao seu uso, mecanismo de ação, posologia e indicações de tratamento. Embora muitos metabólitos sejam relatados como isolados do gênero *Anadenanthera*, poucos trabalhos foram realizados mostrando a importância biológica de seus compostos puros. Trata-se de uma promissora planta, explorada do ponto de vista etnobotânico e econômico, mas ainda pouco explorada farmacologicamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRA, M. F. Plantas da Medicina Popular dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil: espécies mais comuns. João Pessoa: União, 1996, 125p.
- AGRA, M. F. Plantas medicinais dos cariris velhos, Paraíba: um projeto interdisciplinar. In: ARAÚJO, F. D.; PENDERGAST, H. D. V.; MAYO, S. J. (Eds.) Plantas do nordeste, anais do I workshop geral. Royal Botanic Gardens, Kew, Great Britain, pp. 16–21, 1999.
- AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURITA, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. A. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *J Ethnopharmacol*: Lausanne, v. 111, n. 2, p. 383–395, 2007.
- AGRA, M. F.; LOCATELLI, E.; ROCHA, E. A.; BARACHO, G. S.; FORMIGA, S. C. Plantas Medicinais dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil, Parte II: Subclasses *Magnoliidae*, *Caryophylliidae*, *Dilleniidae* e *Rosidae*. *Rev Bras Farm*: Rio de Janeiro, v.77, p. 97–102, 1996.
- AGRA, M. F.; ROCHA, E. A.; FORMIGA, S.C.; LOCATELLI, E. Plantas medicinais dos cariris velhos, Paraíba, Brasil, parte I: subclasse *Asteridae*. *Rev Bras Farm*: Rio de Janeiro, v. 75, P. 61–64, 1994.
- ALBUQUERQUE, U. P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the caatinga vegetation of NE Brazil. *J Ethnobiol Ethnomed*: London, v. 26, p. 2-30, 2006.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Act Bot Bras*: São Paulo, v. 16, n. 3, p. 273-285, 2002b.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). *Interciencia*: Caracas, v. 27, n. 7, p. 336–345, 2002a.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C.; CABALLERO, J. Structure and floristics of homegardens in Northeastern Brazil. *J Arid Environ*: London, v. 62, n. 3, p. 491–506, 2005b.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C.; SILVA, A. C. O. Use of plant resources in a seasonal dry forest (Northeastern Brazil). *Acta Botânica Brasílica*: São Paulo, v. 19, n. 1, p. 19–38, 2005.
- ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P.; MONTEIRO, J. M.; FLORENTINO, A. T. N.; RAMOS, M. A.; ALMEIDA, C. F. C. B. R. Evaluating two quantitative ethnobotanical techniques. *Ethnobotany Research & Applications*: Honolulu, v. 4, p. 51–60. 2006
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L.; MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of ne Brazil: a quantitative approach. *J Ethnopharmacol*: Lausanne, v. 114, n. 3, p. 325–354, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, M.; RAMOS M. A.; AMORIM, A. L. C. Medicinal and magic plants from a public market in Northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol*: Lausanne, v. 110, n. 1, p. 76–91, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P.; OLIVEIRA, R. F. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? *J Ethnopharmacol*: Lausanne, v. 113, n. 1, p. 156–170, 2007.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R.; ALBUQUERQUE, U. P. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (nordeste do Brasil): um estudo de caso. *Interciência*: Caracas, v. 27, n. 6, p. 276–285, 2002.

- ALMEIDA, C. F. C. B. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. MAIA, M. B. S. Medicinal plants popularly used in the Xingo Region—a semi-arid location in northeastern Brazil. *J Ethnobiol Ethnomed*: London, v. 2, p. 1-7, 2006.
- ALSTCHUL, S. von R. A taxonomic study of the genus *Anadenanthera*. *Contributions from the Gray herbarium of Harvard University*: Cambridge, n. 193, p. 3-65, 1964.
- ALSTCHUL, S. von R. Vilca and its use. In: EFRON, D. H.; HOLMSTEDT, B.; KLINE, N. S. *Ethnopharmacologic search for psychoactive drugs*. New York: Raven Press, 1967.
- ARAÚJO, T. A. S.; ALENCAR, N. L.; DE AMORIM, E. L. C.; DE ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *J Ethnopharmacol*: Lausanne, v. 120, n. 1, p. 72-80, 2008.
- ARENAS, P. El cebíl o el árbol de la ciencia del bien y del mal. *Parodiana*: Buenos Aires, v. 1-2, p. 101-114, 1992.
- BENTHAM, G. Contributions towards a flora of South America. *Hooker Journal of Botany and Kew garden miscellany*: London, n. 2, p. 38-103, 127-146, 210-223, 286-324, 1840.
- BENTHAM, G. Notes of *Mimoseae*, with a short synopsis of species. *Hooker Journal of Botany and Kew garden miscellany*: London, n. 4, p. 323-418, 1841-1842.
- BENTHAM, G. Revision of suborder *Mimoseae*. Transactions of the Linean Society. *Hooker Journal of Botany and Kew garden miscellany*: London, n. 30, p. 335-664, 1874-1875.
- BRANDÃO, M. G.; ZANETTI, N. N.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C. F.; SANTOS, A. C.; MONTE-MÓR, R. L. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the official pharmacopoeia. *J Ethnopharmacol*: Lausanne, v. 120, n. 2, p. 141-148, 2008.
- BRASH, A. R. Lipxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem*: Berlin, v. 274, n. 34, p. 23679-23682, 1999.
- BRENAME, J. P. M. Notes of *Mimosideae*: I. *Kew Bull*: London, n. 2, p. 161-191, 1955.
- BRITO, M. F.; FRANÇA, T. N.; OLIVEIRA, K. D.; CERQUEIRA, V. D. Estudos experimentais em coelhos com plantas cianogênicas. *Pesq Vet Bras*: Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 65-70, 2000.
- CABRAL, S. C. M. C.; AGRA, M. F. Etnomedicina e farmacobotânica das *Capparaceae* da caatinga paraibana, Brasil. *Rev Bras Farm*: Rio de Janeiro, v. 79, p. 2-6, 1998.
- CALIFANO, M. El chamanismo matak. *Scripta Ethnologica*: Buenos Aires, v. 3, n. 3, p. 7-60, 1976.
- CASPARE, F. Tupari. 1st. Ed. London: Bell, 1956, 224p.
- CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. 1ª. Ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978, p. 125-126.
- COSTA-NETO, E. M.; OLIVEIRA, M. V. M. The use of medicinal plants in the country of Tanquinho, state of Bahia, northeastern Brazil. *Rev Bras Pl Med*: São Paulo, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2000.
- DA SILVA, D. M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; DE OLIVEIRA, O. F. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. *Pesq Vet Bras*: Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 223-236, 2006.
- DA SILVA, J. A.; PEGADO, C. M. A.; RIBEIRO, V. V.; DE BRITO, N. M.; DO NASCIMENTO, L. C. Efeito de extratos vegetais no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp *tracheiphilum* em sementes de caupi. *Ciênc Agrotec*: Lavras, v. 33, n. 2, p. 611-616, 2009.

- DANTE ANGELO, Z.; CAPRILES, J. M. La importancia de las plantas psicotrópicas para la economía de intercambio y relaciones de interacción en el altiplano sur andino. *Chungará*: Arica, v.36, s. esp. 2, p. 1023-1035, 2004.
- DASSO, M. C. El chamanismo de los matakos de la margen derecha del Río Bermejo (Provincia del Charco, República Argentina). *Scripta Ethnologica*: Buenos Aires, n. 5, p. 9-35, 1985.
- DESMARCHELIER, C.; ROMÃO, R. L.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the “caatinga” region of northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol*: Lausanne, 67, n. 1, p. 69-77, 1999.
- DIJOUR, E. Las cérémonies d’expulsions des maladies chez les Matakos. *Journal de La Société des Américanistes*: Paris, v. 25, p. 212-217, 1933.
- DUVIOLS, P. Un inédit de Cristóbal de Albornoz: la instrucción para descubrir todas las guacas del Pirú y sus camayos y haziendas. *Journal de la Société des Américanistes*: Paris, v. 55, p. 497-510, 1967.
- FABIAN, S. M. Space-time of the Bororo of Brazil. 1st. Ed. Gainesville: University Press of Florida, 1992, 272p.
- FISCH, M. S.; JOHNSON, N. M.; HORNING, E. C. Piptadenia alkaloids. Indole base of *P. peregrina* (L.) Benth. and related species. *J Am Chem Soc*, v. 77, p. 5892-5895, 1955.
- FREITAS, M. S. M.; MARTINS, M. A.; CARVALHO, A. J. C.; CARNEIRO, R. F. V. Crescimento e produção de fenois totais em carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) D.C.] em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, na presença e na ausência de adubação mineral. *Rev Bras Pl Med*: São Paulo, v. 6, n. 1, p.30-34, 2004.
- GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq Inst Biol*: São Paulo, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.
- GUTIERREZ-LUGO, M. T.; DESCHAMPS, J. D.; HOLMAN, T. R.; SUAREZ, E.; TIMMER-MANN, B. N. Lipxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. *Planta Med*: Stuttgart, v. 70, n. 2, p. 263-265, 2003.
- HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica. 9^a ed. Cidade do México: McGrawHill, 1996, 1436p.
- HILGERT, N. I. Plants used in home medicine in the Zenta river basin, northwest Argentina. *J Ethnopharmacol*: Lausanne, v. 76, n. 1, p. 11-34, 2001.
- HUNZIKER, A. T. El cebil (*Anadenanthera colubrina*, var. cebil) en la provincia de Córdoba. *Kurtziana*: Buenos Aires, v. 7, p. 265, 1973.
- IACOBUCCI, G. A.; RÚVEDA, E. A. Bases derived from tryptamine in argentine Piptadenia species. *Phytochemistry*, v. 3, p. 465-467, 1964.
- LARRAÍN-BARROS, H. La Vilca o Paricá (*Anadenanthera* spp.) ¿Purga o estimulante indígena? Algunas referencias etnohistóricas. *Sarance*: Otavalo, v. 2, n. 3, p. 27-49, 1976.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras - manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. volume 2. São Paulo: Plantarum, 1998, p. 97.
- LUCENA, R. F. P.; ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; ALMEIDA, C. F. C. B. R.; FLORENTINO, A. T. N.; FERRAZ, J. S. F. Useful plants of the semi-arid northeastern region of Brazil – a look at their conservation and sustainable use. *Environ Monit Assess*: Dordrecht, v. 125, n. 1-3, p. 281-290, 2007.

- LUNA, J de S.; DOS SANTOS, A. F.; DE LIMA, M. R. F.; DE OMENA, M. C.; DE MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvacidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *J Ethnopharmacol*: Lausanne, v. 97, n. 2, p. 199-206, 2004.
- MACÍA, M. J.; GARCÍA, E.; VIDAURRE, P. J. An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. *J Ethnopharmacol*: Lausanne, v. 97, n. 2, p. 337-350, 2005.
- McLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C.; SMITH, D. Bench-top bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: ATTA-UR RAHMAN (Ed.) *Studies in Natural Product Chemistry*, vol. 9. London: Pergamon Press, 1991, p. 383-389.
- MIYAUCHI, Y.; YOSHIMOTO, T.; MINAMI, K. Extractives from the heartwood of *Piptadenia* sp. *Mokuzai Gakkaishi*, v. 22, p. 47-50, 1976.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS NETO, E. M. F.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. *J Ethnopharmacol*: Lausanne, v. 105, n. 1-2, p. 173-186, 2006.
- MOREIRA, R. C. T.; COSTA, L. C. B.; COSTA, R. C. S.; ROCHA, E. A. Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na Vila Cachoeira, Ilheus, Bahia, Brasil. *Acta Farmaceutica Bonaerense*: Buenos Aires, v. 20, p. 205-211, 2002.
- MORETÃO, M. P.; BUCHI, D. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (angico-branco) on peritoneal macrophage functions. *Immunol Lett*: Amsterdam, v. 89, n. 2-3, p. 175-185, 2003.
- MORETÃO, M. P.; ZAMPRONIO, A. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrine* (angico-branco). *Immunol Lett*: Amsterdam, v. 93, n. 2-3, p. 189-197, 2004.
- MORS, W. B.; RIZZINI, C. T., PEREIRA, N. A. *Medicinal Plants of Brazil*. 1^a ed. Michigan: Reference Publications, 2000. 501p.
- NATARAJAN, R.; BAI, W.; GU, J. L.; RANGARAJAN, V.; NADLER, J. Platelet-derived growth factor BB mediated regulation of 12-lipoxygenase in porcine aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol*: Philadelphia, v. 169, n. 2, p. 391-400, 1996.
- NOZELLA, E. F. Determinação de tanino em plantas com potencial forrageiro para ruminantes. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2001.
- PACHTER, I. J.; ZACHARIAS, D. E.; RIBEIRO, O. Indole alkaloids of *Acer saccharinum* (The Silver Maple), *Dictyoloma incanescens*, *Piptadenia columbrina*, and *Mimosa hostiles*. *J Org Chem*, v. 24, p. 1285, 1959.
- PARDAL, R. *Medicina arborígen americana (Las Piptadenias)*. Colección Humanior, Sección 3. Buenos Aires: Biblioteca del Americanista Moderno, 1937, p. 333-3414.
- PAULA, J. E. de. Estudo das estruturas internas das madeiras de dezesseis espécies da flora brasileira visando o aproveitamento econômico para a produção de álcool, carvão, coque e papel. *Brasil Florestal II*: Brasília, v. 11, n. 47, p. 23-50, 1981.
- PIACENTE, S.; BALDERRAMA, L.; DE TOMMASI, N.; MORALES, L.; VARGAS, L.; PIZZA, C. Anadanthoside: a flavanol-3-O- β -D-xylopyranoside from *Anadenanthera macrocarpa*. *Phytochemistry*, v. 51, p. 709, 1999.
- REICHEL-DOLMATOFF, G. La cultura material de los indios Guahibo. *Revista del Instituto Etnológico Nacional*: Bogotá, v. 1, n. 2, p. 437-506, 1946.

- RODD, R. Snuff synergy: preparation, use and pharmacology of yopo and *Bonisteriopsis caapi* among the Piaroa of southern Venezuela. *J Psychoactive Drugs*: San Francisco, v. 34, n. 3, p. 273-279, 2002.
- SALDIAS, M. *Mimosoideae*: en guía de árboles de Bolivia. In: KILLEEN, T. L.; GARCÍA, E.; BECK, S. G. (eds) La Paz: Herbario nacional de Bolivia, 1993, p. 420-456p.
- SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol*: Amsterdam, v. 6, n. 3, p. 317-333, 2006.
- SILVA, V. A.; ANDRADE, L. H. C. Etnobotânica xucuru: espécies místicas. *Biotemas*: Florianópolis, v. 15, n. 1, p. 45-57, 2002.
- SMET, P. A. G. M.; RIVIER, L. Intoxicating paricá seeds of the Brazilian maué Indians. *Econ Bot*: Baltimore, v. 41, n. 1, p. 12-16, 1987.
- SOTELO DE NARVAEZ, P. relación de las provincias de Tucumán. Relaciones geográficas de Indias. 1a. ed. Madrid: Ediciones Atlas, 1965, p. 390-396.
- STEELE, V. E.; HOLMES, C. A.; HAWK, E. T.; KOPELOVICH, L.; LUBET, R. A.; CROWELL, J. A.; SIGMAN, C. C.; KELLOFF, G. J. Lipxygenase inhibitors as potential cancer chemopreventives. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*: Philadelphia, v. 8, n. 5, p. 467-483, 1999.
- SVETAZ, L.; ZULJAN, F.; DERITA, M.; PETENATTI, E.; TAMAYO, G.; CÁRCERES, A.; CECHINEL FILHO, V.; GIMÉNEZ, A.; PINZÓN, R.; ZACCHINO, S. A.; GRUPTA, M. Value of ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. *J. Ethnopharmacol*: Lausanne, v. 127, n. 1, p. 137-158, 2010.
- TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V.; BRITO, M. F.; DUARTE, M. D.; BRUST, L. A. C. Estudos experimentais com plantas cianogênicas em bovinos. *Pesq Vet Bras*: Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, p. 84-90, 1999.
- TORRES, C. M.; REPKE, D. *Anadenanthera* : visionary plant of ancient South America. 1st. ed. Binghamton: The Haworth Herbal Press. 2006, 256p.
- TORRES, C. M.; REPKE, D. The use of *Anadenanthera colubrina* var. Cebil by wich (mataco) shamans of the chaco central, Argentina. *Yearbook for Ethnomedicine and the Study of Consciousness*: Berlin, v. 5, p. 41-58, 1996.
- WASSÉN, S. H. Anthropological survey of the use of South America snuffs. In: EFRON, D. H.; HOLMSTEDT, B.; KLINE, N. S. Ethnopharmacologic search for psychoactive drugs. New York: Raven Press, 1967, p. 233-289.
- WASSÉN, S. H. The use of some specific kinds of South American Indian snuff and related paraphernalia. *Ethnologiska Studier*: Gothenburg, v. 28, 1965.
- YACOVLEFF, E. HERRERA, F. El mundo vegetal de los antiguos peruanos. *Revista del Museo Nacional*: Lima, v. 3, n. 2, p. 243-322, 1934.
- YACOVLEFF, E. HERRERA, F. El mundo vegetal de los antiguos peruanos. *Revista del Museo Nacional*: Lima, v. 4, n. 1, p. 31-102, 1935.
- YAMASATO, S.; KAWANISHI, K.; KATO, A.; HASHIMOTO, Y. Organic bases from Brazilian Piptadenia species. *Phytochemistry*, v.11, p. 737-739, 1972.