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

AVALIAÇÃO DE BIOENSAIO DAS SEMENTES DE

Caesalpinia echinata Lam. (in vivo e in vitro)

DANIELLE ÍSIS DE SÁ E SILVA

RECIFE
2012

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

AVALIAÇÃO DE BIOENSAIO DAS SEMENTES DE *Caesalpinia echinata* Lam. (*in vivo e in vitro*)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Mestranda: Danielle Ísis de Sá e Silva

Orientadora: Prof. Ivone Antônia de Souza

RECIFE
2012

Catalogação na Publicação
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586a Silva, Danielle Ìsis de Sá e.
Avaliação de bioensaio das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (in vivo e in vitro) / Danielle Ísis de Sá e Silva. – Recife: O autor, 2012.
100 folhas: il.; tab.; quadr.; 30 cm.

Orientador: Ivone Antônia de Souza.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Caesalpinia. 2. Pau-Brasil. 3. Toxicidade aguda. 4. Antineoplasias. 5. Antibacterianos. I. Souza, Ivone Antônia de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2013-001)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Recife, 14 de março de 2012.

Defesa de Dissertação de Mestrado de **Danielle Ísis de Sá e Silva** defendida e **APROVADA,** por decisão unânime, em 14 de março de 2012 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRA EXAMINADORA INTERNA: Prof.ª Dr.ª Ivone Antônia de Souza
(Deptº de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

SEGUNDA EXAMINADORA INTERNA: Prof.ª Dr.ª Maria Nelly Caetano Pisciottano
(Deptº de Ciências Farmacêuticas de Pernambuco-UFPE).

Assinatura: _____

EXAMINADORA EXTERNA: Prof.ª Dr.ª Falba Bernadete Ramos dos Anjos.
(Depto. Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE).

Assinatura: _____

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

ANÍSIO BRASILEIRO DE FREITAS DOURADO
REITOR

SÍLVIO ROMERO DE BARROS MARQUES
VICE-REITOR

FRANCISCO DE SOUSA RAMOS
PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO
DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

VÂNIA PINHEIRO RAMOS
VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DALCI JOSÉ BRONDANI
CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

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

NEREIDE STELA SANTOS MAGALHÃES
COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANA CRISTINA LIMA LEITE
VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Aos meus pais, Delma e Benedito, por toda força e apoio e por sempre acreditarem comigo que meus sonhos eram possíveis.

Dedico

A todos os meus amigos, pessoas que acompanharam minha caminhada e foram parte essencial no desenvolvimento desse trabalho.

Ofereço

“O dever cumprido é a melhor maneira de fazer da própria consciência o mais alto lugar de repouso”

Emmanuel

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por todas as coisas maravilhosas que me foram concedidas e até mesmo por todas as provações, pois sem elas eu não seria o que sou hoje.

Aos meus pais, Maria Delma e Benedito José por nunca medirem esforços para me ajudar, por acreditarem em mim e pelo apoio de sempre.

A minha orientadora, Prof. Dra. Ivone Antonia de Souza por ter acreditado em mim, pela paciência em passar todos os conhecimentos de uma área que eu nunca havia trabalhado, pelos ensinamentos em todos os aspectos, pelas risadas nos dias mais complicados, enfim, por tudo.

A minha co-orientadora de coração, Prof. Kêsia Xisto pelo apoio, por sempre estar disposta a me ajudar em todos os momentos e pensar em mim até quando eu estava ausente. Pelas palavras amigas e conselhos de sempre.

A Leonardo e Ludhymylla por estarem presentes nos primeiros momentos dessa pesquisa, por me ajudarem a me adaptar ao manuseio com os animais, por aguentarem meus gritos e momentos de desespero quando eu achava que não ia conseguir e por rirem da minha cara por isso também, faz parte.

A todos que fazem parte do Laboratório de Canceologia Experimental, em especial a Karen por toda a ajuda, pela ótima convivência, pela amizade e pela companhia nos almoços às 2 da tarde. A Marcos por toda a ajuda, pelos momentos de descontração, a Elis pelo apoio nos ensaios desenvolvidos e a Dr. Eduardo pela confiança e companhia durante meus experimentos.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Fármacos e Ensaios Antimicrobianos, por todo o carinho de sempre, por sempre estarem presentes, por todo o auxílio e pela torcida para que tudo desse certo, em especial a Persio, Flávia, Maira, Nelânia, Erik, Maria, Marcio, Prof. Norma, Ceci e aos agregados Baltar e Igor.

A minhas queridas amigas Evelyne Solidônio e Rosilma Araújo, pela amizade, pelas conversas, pela disposição em me apoiar, por torcer por mim, enfim, por estarem sempre presentes em todos os momentos e principalmente por continuarem sendo as amigas especiais que sempre foram, mesmo distantes. Como já disse, vocês já tem o lugar garantido no céu.

A todos os funcionários do Departamento de Antibióticos, em especial a Orlando, Luiz e Janilson pela ajuda e a “Seu Nido”, por todo o apoio.

A Prof. Fálba, pelo primeiro contato com o meu objeto de estudo, pela simpatia de sempre e por fazer parte da avaliação desse trabalho.

A Prof. Nelly, pela simpatia e disposição em me atender e discutir sobre minhas perspectivas futuras e por fazer parte da avaliação desse trabalho.

A todos os meus colegas de graduação e pós-graduação, em especial a Janu pelas conversas descontraídas durante a aula e a Alan/Alex (desculpem, vocês sabem que eu nunca sei quem é quem) pelo apoio nas práticas de Haroudo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho ou que torceram para que tudo desse certo, meu muito obrigada!

RESUMO

A *Caesalpinia echinata* Lam. é uma árvore nativa da Mata Atlântica pertencente a família Fabaceae, subfamília Caesalpinnoidea, conhecida popularmente, como pau-brasil. A espécie se destaca hoje na lista de ameaçadas de extinção devido a sua intensa exploração. Desde a época da colonização sua madeira foi utilizada na construção de navios e na extração de um corante bastante usado no tingimento de tecidos. Até os dias atuais vem sendo utilizada para a construção de violinos. Além do potencial ornamental, o pau-brasil possui diversas propriedades medicinais, sendo utilizada desde para o tratamento de diarréias até o diabetes. Considerando que a planta já demosntrou fortes indícios de que possui componentes com propriedades terapêuticas e que, na literatura, poucos registros foram encontrados sobre sua ação farmacológica, em especial das sementes. O presente trabalho objetivou avaliar a ação biológica (toxicológica, antimicrobiana e antineoplásica) do extrato etanólico bruto das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. O estudo toxicológico foi realizado através de ensaio de toxicidade aguda utilizando camundongos e *Artemia salina*. O extrato foi administrado por via intraperitoneal em camundongos fêmeas com o objetivo de determinar a $DL_{50.}$ Os animais receberam doses entre 350 e 4.500 mg/Kg e até a maior dose não foi observada letalidade, impossibilitando o cálculo da DL_{50}, desta forma o extrato foi considerado de baixa toxicidade. Embora não tenham ocorrido óbitos, o extrato provocou a ocorrência de sinais clínicos nos animais. Para o teste com *Artema salina,* foram testadas diluições do extrato em água do mar com concentração final entre 50 a 1.000 µg/ml. Após 24 horas de contato das larvas com as soluções, não houve óbitos nas larvas em nenhum dos tubos, o que pode ser considerado como ausência de toxicidade ou baixa toxicidade. O estudo antimicrobiano foi realizado pelo método de difusão em disco, com bactérias gram-positivas, negativas e uma levedura. O extrato de *C. echinata* demonstrou-se pouco ativo frente a *Staphylococcus aureus*, não havendo inibição em relação aos demais micro-organismos testados. A avaliação antitumoral foi realizada com utilização de tumores sólidos em camundongos fêmeas tratados por via intraperitoneal durante 7 dias e ao final os animais foram sacrificados, os tumores pesados e os percentuais de inibição calculados. Os testes demonstraram que o extrato possui efeito antitumoral frente às duas linhagens tumorais estudadas, em especial no carcinoma.

Palavras chave: *Caesalpinia echinata*, pau-brasil, toxicidade aguda, atividade antineoplásica, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The *Caesalpinia echinata* Lam. is a tree native to the rainforest belonging to the family *Fabaceae*, subfamily *Caesalpinnoidea*, popularly known as Brazil wood. The species stands today in the list of endangered species due to its intense exploration. Since the time of colonization its wood was used for ship building and it extracted a dye widely used in the dyeing of fabrics. Up to the present day has been used for the construction of violins. Besides the ornamental potential, Brazil wood has many medicinal properties, being used since for the treatment of diarrhea to diabetes. Taking into account that the plant has shown strong evidence that has compounds with therapeutic properties and that, in the literature, few records are found on their pharmacological properties, especially the seeds, this study aimed to evaluate the biological action (toxicological , antimicrobial and anticancer) of crude ethanolic extract of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. The toxicological study was performed through acute toxicity test using mice and brine shrimp. The extract was administered intraperitoneally into female mice in order to determine the LD_{50}. Doses between 350 and 4500 mg/kg were administered and even the highest dose was not observed mortality, preventing the calculation of LD_{50}, so that the extract has been considered of low toxicity. Although no deaths occurred, the extract led to the occurrence of clinical signs in the animals. To *Artemia salina* test, dilutions of the extract in sea water were tested with final concentration of between 50-1000 g/ml. After 24 hours of contact between the solution and larvae, no death was observed at any of the tubes, which may be considered low or no toxicity. The antimicrobial study was conducted by disk diffusion method, using Gram-positive, negative and a yeast. The extract of *C. echinata* showed partial activity against *Staphylococcus aureus*, no inhibition compared to other micro-organisms tested. The antitumor evaluation was performed with the use of solid tumors in female mice. Treatment was administered intraperitoneally for 7 days and at the end the animals were sacrificed, the tumors weighed and the percentage inhibition calculated. The tests showed that the extract has antitumor activity against the two tumor cell lines studied, especially in carcinoma.

Key words: *Caesalpinia echinata*, Brazil wood, acute toxicity, antineoplastic activity, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA **PÁGINA**

Figura 1 - Tronco de árvore jovem coberto por acúleos (a) e tronco de exemplar adulto (b). **Fonte:** www.flick.com..... **27**

Figura 2 - Cortes transversais da *Caesalpinia echinata* (a) com 12 anos (b) com 27 anos. **Fonte**: www.hestia.org.br..... **28**

Figura 3 - Folha de *Caesalpinia echinata* demonstrando (a) pina e (b) folíolo. **Fonte**: arboretto.blogspot.com..... **28**

Figura 4 - Flor (a) e cacho de flores (b) de *Caesalpinia echinata*. **Fonte**: www.flickr.com..... **29**

Figura 5 - Fruto (a) e sementes (b) de *Caesalpinia echinata*. **Fonte**: http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.brn e http://arvoresdesaopaulo.wordpress.com..... **29**

Figura 6 - Estrutura química dos constituintes majoritários do cerne da madeira de *Caesalpinia echinata*. **Fonte**: SERRANO, LOPES, SERUYA, 2007..... **33**

Figura 7 - Passo a passo do processo de carcinogênese. **Fonte**: BRASIL, 2011a..... **36**

Figura 8 - Estágio de iniciação. **Fonte**: www.inca.gov.br..... **37**

Figura 9 - Estágio de promoção. **Fonte**:www.inca.gov.br..... **37**

Figura 10 - Estágio de progressão. **Fonte**:www.inca.gov.br..... **38**

Figura 11 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma. **Fonte:** Brasil, 2011b..... **39**

Figura 12 - Larva de *Artemia salina.* **Fonte**: flickriver.com..... **43**

Figura 13 - *Staphylococcus aureus*. **Fonte**: wikipedia.com..... **45**

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I - Avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae/Caesalpinioideae). **PÁGINA**

Tabela 1 - Sinais clínicos da toxicidade observada em camundongos albinos swiss fêmeas, tratados com diferentes doses do EE das sementes de *C. echinata*, por via intraperitoneal..... **55**

ARTIGO II - Sinais clínicos da toxicidade observada em camundongos albinos swiss fêmeas, tratados com diferentes doses do EE das sementes de *C. echinata*, por via intraperitoneal.

Tabela 1 - Micro-organismos utilizados para o ensaio antimicrobiano..... **65**

Tabela 2 - Atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto das sementes de C. echinata frente aos micro-organismos testados..... **66**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	Antes de Cristo
CL_{50}	Concentração Letal Média
° C	Graus Celsius
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centímetros
CTZ	Cetoconazol
D1	Dose mais elevada isenta de mortalidade
D2	Menor dose com 100% de óbito
d.C	Depois de Cristo
DL_{50}	Dose Letal Média
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EE	Extrato Etanólico
EESCe	Extrato Etanólico das Sementes de *Caesalpinia echinata*
GEN	Gentamicina
Kg	Kilogramas

Km^2	Kilômetros quadrados
Lam.	Lamarck
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
S-180	Sarcoma 180
SUS	Sistema Único de Saúde
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFPEDA	Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
µg	Microgramas
µL	Microlitros
v.i.p	Via Intraperitoneal
v.o	Via oral

SUMÁRIO

RESUMO
ABSTRACT
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO 19

2 REVISÃO DE LITERATURA 22

2.1 Plantas Medicinais 22

2.2 *Caesalpinia echinata* **Lam. 26**

2.2.1 Características botânicas 26

2.2.2 Utilização e importância econômica 30

2.2.3 Propriedades Farmacológicas 31

2.2.4 Aspéctos Fitoquímicos 33

2.2.5 Aspectos Toxicológicos 34

2.3 Câncer 35

2.3.1 Carcinogênese 36

2.3.2 Epidemiologia e tratamento 38

2.3.3 Cancerologia experimental 39

2.3.3.1 Carcinoma de Ehrlich 40

2.3.3.2 Sarcoma 180 41

2.4 Toxicologia e Toxicidade aguda 41

2.5 Bacteriologia e resistência a antibióticos 44

2.5.1 *Staphylococcus aureus* **..... 45**

3 OBJETIVOS 49

3.1 Objetivo Geral 49

3.2 Objetivo Específicos 49

4 ARTIGO I - Avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto das sementes de *Caesalpinia echinata* **Lam. (Fabaceae/Caesalpinioideae) 51**

RESUMO 51

ABSTRACT 51

INTRODUÇÃO 52

MATERIAL E MÉTODO 53

Material Botânico e Obtenção da matéria prima 53

Preparação do Extrato Etanólico Bruto das Sementes 53

Toxicidade aguda em camundongos 53

Toxicidade aguda utilizando *Artemia salina* 54

RESULTADOS E DISCUSSÃO 55

REFERÊNCIAS 57

5 ARTIGO II - Atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto das sementes de *Caesalpinia echinata* **Lam. (Fabaceae) 62**

RESUMO **62**

ABSTRACT **62**

INTRODUÇÃO **63**

MATERIAIS E MÉTODOS **64**

Material Botânico e Obtenção da matéria prima **64**

Preparação do Extrato Etanólico Bruto das Sementes **64**

Padronização dos inóculos **64**

Teste de Difusão em disco de papel **65**

RESULTADOS E DISCUSSÃO **66**

REFERÊNCIAS **67**

6 ARTIGO III - Estudo da propriedade antineoplásica do extrato etanólico das sementes de *Caesalpinia echinata* **Lam.** **72**

RESUMO **72**

ABSTRACT **72**

INTRODUÇÃO **73**

MATERIAIS E MÉTODOS **74**

Material Botânico e Obtenção da matéria prima **74**

Preparação do Extrato Etanólico Bruto das Sementes **74**

Animais **75**

Implante dos tumores e tratamento **75**

Análise estatística **76**

RESULTADOS E DISCUSSÃO **76**

REFERÊNCIAS **77**

7 CONCLUSÕES **82**

8 REFERÊNCIAS **84**

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos remotos, os produtos naturais tiveram fundamental participação no desenvolvimento das civilizações como fonte de alimentos, vestuário, ferramentas, adornos, combustíveis e medicamentos. A utilização de plantas com fins terapêuticos é relatada desde a antiguidade, sendo considerada a primeira forma de tratamento usada pelo homem e é ainda hoje a base da medicina tradicional em muitos países (BADKE *et al*, 2011; SAHOO; MANCHIKANTI; DEY, 2010; CARVALHO; SILVEIRA, 2010).

Em consequência ao grande desenvolvimento da Medicina e da Química, dentre tantos outros, observados após a Segunda Guerra Mundial, os medicamentos sintéticos foram substituindo gradativamente a utilização da medicina tradicional, levando ainda a uma redução do interesse pela pesquisa e desenvolvimento dos produtos farmacêuticos de origem natural. Porém, nos últimos anos tem ocorrido uma revalorização desses produtos pela indústria, incrementado pelo aumento de seu uso pela população que busca opções aos medicamentos alopáticos objetivando, entre outros motivos, uma melhor qualidade de vida (ALMEIDA; PINTO, 2011; BELLO; MONTANHA; SCHENKEL, 2002; TAUFNER; FERRAÇO; RIBEIRO, 2006)

As plantas são consideradas fontes promissoras de moléculas para o tratamento de várias patologias, entre elas o câncer, enfermidade cada vez mais comum em todo o mundo, podendo ser empregadas diretamente como tratamento ou como modelo para síntese de pró-fármacos. O desenvolvimento de novos agentes terapêuticos antineoplásicos a partir de plantas tem sua importância justificada na busca por medicamentos cada vez mais potentes e menos tóxicos que os convencionais atualmente utilizados, que sejam mais eficazes e seletivos (BRANDÃO *et al*, 2010).

O desenvolvimento de resistência microbiana é uma preocupação constante no tratamento de doenças infecciosas, sendo uma das principais causas de aumento da morbidez, mortalidade e custos de cuidado médico. Nas ultimas décadas, vários antimicrobianos foram desenvolvidos pela indústria farmacêutica, porém, a resistência dos micro-organismos a essas drogas se desenvolve rapidamente gerando insegurança em relação ao futuro do tratamento desse tipo de enfermidade (ANG; EZIKE; ASMAR, 2004; CABRERA; GÓMEZ; ZÚÑIGA, 2007; ROSSI; ANDREAZZI, 2005). Desta forma, a busca por produtos vegetais com elevada atividade antimicrobiana é de extrema importância, pois acende a possibilidade de encontrar

compostos com atividade muito superior aos medicamentos disponíveis (PEREIRA *et al*, 2004).

O Brasil, devido a sua grande biodiversidade, possui um enorme potencial para o desenvolvimento de novos fármacos a partir de vegetais. Assim, pesquisas tem sido desenvolvidas no país objetivando a obtenção de medicamentos com uma maior eficácia, qualidade e com menores custos, com o intuito de encontrar alternativas na superação da dependência externa, já que a grande maioria dos fármacos utilizados no país é fruto de importações ou produções multinacionais (BENINI *et al*, 2010; CALIXTO, 2003; SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2004). Porém, apesar da diversidade de espécies vegetais, a maioria delas é desconhecida sob o ponto de vista científico, principalmente em relação à flora nacional, pois, infelizmente, o interesse e investimentos para estudos que objetivam a avaliação de atividade biológica de plantas ainda ocorrem com maior intensidade em países desenvolvidos (LAZA; RODRIGUEZ; SARDINA, 2003; YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

O pau-brasil, árvore nativa da Mata Atlântica, possui entre outras propriedades, a ação antitumoral e antimicrobiana de extratos obtidos a partir de suas folhas, flores e cerne, também presentes em outras plantas pertencentes à mesma família (*Fabaceae*). Pouco se sabe sobre as características farmacológicas de suas sementes já que as pesquisas científicas envolvendo essa espécie tratam geralmente de aspectos botânicos e agronômicos devido a sua condição de espécie ameaçada de extinção (BASTOS, 2011; FREIRE M. F, 2004)

Alicerçados nos fatores pré-descritos, justificou-se a proposta deste protocolo experimental de pesquisa, cujo objetivo foi investigar a ação farmacológica e atividade antimicrobiana das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. frente a tumores induzidos em camundongos e micro-organismos padrão, uma vez que a espécie em questão possui um grande potencial terapêutico.

2 Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

A origem do conhecimento do homem sobre as propriedades medicinais das plantas confunde-se com sua própria história já que essas são utilizadas, desde os primórdios da humanidade, como alimento e no tratamento de várias doenças (BENDAZZOLI, 2000; CALIXTO, 2000; NOVAIS *et al*., 2003).

Há indícios de que flores possam ter sido utilizadas com fins medicinais pelos homens de Neanderthal que habitavam o Iraque há 60.000 anos, época dos *Homo sapiens*. Inicialmente foi evidenciada a presença de pólen nos dentes desses ancestrais, prova de que vegetais poderiam também fazer parte de sua dieta, contrariando a idéia inicial de que sua alimentação era essencialmente carnívora. Tempos depois, seu potencial terapêutico foi comprovado, levantando a suspeita de que poderiam ter sido utilizadas intencionalmente para este propósito (LIETAVA, 1992; SOURROUILLE *et al*, 2009).

A transmissão dos conhecimentos sobre plantas medicinais, antes do surgimento da escrita, se realizava oralmente. Os primeiros escritos sobre o assunto datam de aproximadamente 3000 anos a.C.. Eram placas de barro com origem na Suméria e Babilônia, escritas em caracteres cuneiformes por ordem do rei assírio Ashurbanipal. Nelas, são descritas mais de 1000 substâncias derivadas de plantas, entre elas o Cedro, Alcaçuz, Mirra e Papoula, cujas propriedades são utilizadas até hoje para tratamento das mais variadas doenças. Atualmente essas placas encontram-se expostas no “British Museum”, em Londres (CUNHA, 2008; NEWMAN, 2000).

Porém, supõe-se que o uso de plantas é anterior na Àsia, principalmente na China, onde a prática da Medicina Herbal remonta a mais de 5000 anos, sendo o país com mais longa e ininterrupta tradição com ervas. Conta a história que o Imperador Shen Nung ou Imperador Yan, fundador da Medicina Chinesa, em 2838 a.C estudou a aplicação medicinal de centenas de ervas e experimentou os efeitos das drogas em si mesmo. O registro dessas experiências é compilado na obra Pen T’são, que lista mais de 350 drogas vegetais. Logo depois, em 2798 a.C., o Imperador Huang Ti ou Imperador Amarelo, inventor dos princípios da medicina chinesa, mencionou 252 plantas em seu “Cânone das Ervas”. No século II da Era Cristã, Chung-ching, considerado o Hipócrates chinês já escrevera 222 ensaios, 397 notas e 113

prescrições e no século VII, Sun Ssu-moh (581-682 d.C.), já havia estudado mais de 1074 plantas, 443 substâncias animais e 11.091 medicamentos, deixando à disposição da população chinesa, uma lista conhecida como os "500 remédios de ouro" (APUNTE, 2008; BRAGA, 2011; MCCLEDON, 1934; NOGUEIRA; MONTANARI; DONNICI, 2009).

No Egito antigo, as principais fontes de informações sobre a medicina local foram deixadas escritas em papiros. O mais famoso deles, o Papiro de Ebers, data de 1550 a.C.. Com comprimento superior a 20 metros, trata de mais de 7000 substâncias medicinais incluídas em 800 fórmulas quantitativas em escrita Hierática. Possui esse nome em homenagem a Georg Ebers (1837-1898), egiptólogo alemão nascido em Berlim que foi o primeiro a estudá-lo em 1875. Este papiro conserva-se atualmente no museu da Universidade de Leipzig, na Alemanha. Sua autoria é atribuída por alguns autores a Imhotep, o primeiro médico egípcio a tratar doenças utilizando plantas. Além da cura, os egípcios empregavam plantas no famoso método de preparo das múmias, que até hoje não está totalmente elucidado (AGUIAR, 2010; BRAGA, 2011; DIAS, 2005).

Entre os anos de 1500 e 800 a.C, a história da medicina na Índia passava por um período denominado período védico onde as informações eram derivadas principalmente dos Vedas (palavra que significa conhecimento), conjunto de 4 livros sagrados. Em um deles, o Atarva-veda, além de várias doenças, havia também registros de 760 plantas medicinais. Já no Charaka, um dos três livros clássicos da medicina indiana escrito no início da Era Cristã, mais de 500 remédios foram catalogados e divididos em grupos de acordo com a natureza de sua ação (AGUIAR, 2010)

Os Gregos e Romanos também se utilizaram das plantas medicinais para tratamento de males, difundindo seus conhecimentos e adquirindo novas práticas sobre o assunto em cada território conquistado. Na Grécia Antiga, Hipócrates (460-377 a.C.), considerado o "Pai da Medicina", elaborou a obra *Corpus Hipocratium*, na qual reunia informações sobre doenças e aconselhava medicamentos vegetais. Já no início da Era Cristã, aproximadamente em 78 d.C., Dioscórides descreve 600 drogas vegetais incluindo seu emprego terapêutico em seu "De Materia Medica". Porém, os gregos não as utilizavam apenas na medicina terapêutica, fazendo uso também de sua toxicidade para execução de condenados a morte, como ocorreu com o filósofo Sócrates, executado no ano de 399 a.C através da ingestão de um extrato vegetal (GOMES, 2011; MARTINS *et al*, 2003; NETO; CAETANO, 2005).

A ascensão e queda do império Romano assim como o fortalecimento da Igreja Católica durante a Idade Média fizeram com que a busca pelo conhecimento científico e estudo sobre as plantas medicinais se estagnassem durante um longo período. Muitas informações já existentes foram perdidas e o que restou só foi recuperado no início do século XIII com o surgimento das Escolas de Salerno e Montpelier, na Europa (BRAGA, 2011; MARTINS *et al*, 2003).

O primeiro herbário do continente Americano data do século XVI. É o Manuscrito Badanius, de origem Asteca. Os primeiros imigrantes trouxeram para as Américas mudas e sementes de suas ervas preferidas, que logo se misturaram às ervas nativas (BRAGA, 2011).

No Brasil, a prática da medicina natural origina-se nos povos indígenas que antes da colonização já utilizavam largamente as plantas no combate a várias doenças. Baseados nesses conhecimentos, os jesuítas, em especial o padre José de Anchieta, formularam receitas a base de plantas medicinais para o tratamento de doenças, às quais foi atribuído o nome de "Boticas dos Colégios". Nessa época, o conhecimento acerca do tratamento era dominado pelos Pajés, que empregavam os compostos vegetais em rituais para a cura. Estas informações foram repassadas de geração a geração sendo incorporadas aos dados europeus trazidos pelos colonizadores. Um pouco mais tarde, a cultura africana foi adicionada a toda essa gama de informações formando, então, a base do conhecimento sobre ervas medicinais no Brasil (BRAGA, 2011; LAMEIRA; PINTO, 2008; NETO; CAETANO, 2005).

O tratamento a base de ervas é a mais lucrativa prática da medicina tradicional no mercado internacional. O faturamento anual chega à ordem dos bilhões de dólares. Nos EUA, no ano de 2000, o setor movimentou 6,6 bilhões. Na Europa Ocidental, entre 2003 e 2004, arrecadou-se 5 bilhões. Na China, as vendas de produtos totalizaram US$ 14 bilhões em 2005. No Brasil, no entanto, a receita auferida com o comercio de ervas foi apenas de 160 milhões de dólares em 2007, um valor modesto para suas dimensões, o que reforça que o país necessita ainda de estímulos para que a grande variedade de suas plantas medicinais se transforme em produtos de alto valor agregado e com grandes repercussões sobre o desenvolvimento econômico sustentável do país (PINTO *et al*, 2002; RODRIGUES; NOGUEIRA, 2008; WHO, 2008).

Em maio de 1978, a Organização Mundial de Saúde, reconheceu a importância das plantas medicinais nos cuidados de saúde, considerando seu valor terapêutico. A partir dessa

iniciativa, ocorreu um estímulo para utilização de ervas, que vêm seduzindo a cada ano mais adeptos nos países desenvolvidos (PINTO *et al*, 2002).

No ano de 2006, duas políticas apresentaram diretrizes que incentivam a pesquisa e desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), aprovada através da Portaria Ministerial MS/GM nº 971 de 03 de maio de 2006 e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicada através do Decreto nº 5.813 em 22 de junho de 2006. Ambas apontam medidas para a valorização e reconhecimento desse recurso terapêutico com qualidade, segurança e eficácia à população, incentivando seu acesso aos usuários do SUS (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b).

Devido a relativa facilidade para aquisição das plantas medicinais, a sua eficácia aliada a um baixo custo operacional, sua utilização nos Programas de Atenção Primária à Saúde pode se constituir numa alternativa terapêutica muito útil, e por esta razão já está incorporada aos vários Programas de Fitoterapia como opção terapêutica eficaz e pouco onerosa (MATOS, 1994; SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

O uso de plantas medicinais é de grande relevância para a Saúde Pública, representando em todo o mundo aproximadamente 30% do total de produtos consumidos com finalidade terapêutica. Nos países desenvolvidos, essa utilização ocorre como um tratamento alternativo, para os que buscam nos medicamentos naturais menores efeitos colaterais e uma menor toxicidade, apesar de nem sempre ser uma verdade. Porém, em alguns países, os medicamentos a base de ervas são a única opção de tratamento. Em parte da Ásia e África, 80% da população depende da medicina tradicional para cuidados de saúde primários e este é o único recurso terapêutico de parcela da população brasileira e de mais de 2/3 da população do planeta (DI STASI, 2007; PINTO *et al*, 2002).

Muitas sociedades tradicionais possuem um enorme conhecimento sobre propriedades medicinais das plantas, boa parte proveniente de recursos vegetais encontrados em ambientes nativos, cultivados e/ou alterados pela própria população. A constatação de que a base do conhecimento empírico acumulado por essas populações, ao longo de séculos, pode ser comprovada cientificamente incrementou o interesse acadêmico a respeito do conhecimento que esses indivíduos detêm sobre plantas e seus usos (AMOROZO, 2002; FARNSWORTH, 1988).

As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações multidisciplinares, com abordagens nas áreas de etnobotânica, química orgânica, fitoquímica, farmacologia, química orgânica sintética, química medicinal e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos (MACIEL *et al*, 2002).

2.2 *Caesalpinia echinata* **Lam.**

2.2.1 Características botânicas

Caesalpinia echinata, conhecida pelos índios como ibirapitanga, que significa árvore ou madeira vermelha, é uma espécie nativa da Mata Atlântica popularmente conhecida como pau-brasil, arabutã, pau-pernambuco e pau-vermelho. O termo *Caesalpinia* deriva da palavra Caesalpina, gênero descrito pelo botânico francês Charles Plumier em 1689, que atribuiu este nome em homenagem ao também botânico e médico grego Andrea Cesalpino. Em 1753, Lineu retomou o gênero *Caesalpina* de Plumier em seu sistema de nomenclatura binomial, apesar de não se referir à espécie brasileira. Em 1785, finalmente, nossa árvore entra oficialmente na nomenclatura botânica. Em sua publicação, Lamarck inclui a *Caesalpinia echinata* dentre as outras do gênero. A palavra "echinata" remete ao termo "*leguminibus echinatis"*, devido ao fato de sua vagem possuir espinhos, característica exclusiva dessa espécie no gênero (CORRÊA, 2003; CARVALHO, 2003; MURALT, 2006; PINTO, 1999).

A família Fabaceae, anterior Leguminosae, é a terceira maior família entre as angiospermas, compreendendo cerca de 619 gêneros e 17.815 espécies divididos em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae. Dentre as demais famílias, é a segunda de maior importância econômica, atrás apenas da Poaceae, possuindo papel de destaque principalmente como plantas alimentícias, forrageiras e ornamentais. No Brasil, esta família está representada por cerca de 190 gêneros e 2.100 espécies (JUDD *et al*, 2009; LIMA, 2000).

A sub-família Caesalpinioideae apresenta 171 gêneros e 2.250 espécies, encontradas em quantidade nas regiões da América do Sul, África tropical e Sudeste da Ásia, sendo,

desses, 64 gêneros e 790 espécies nativas do Brasil. São plantas subarbustivas, arbustivas, arbóreas ou trapadeiras, raramente são ervas com folhas compostas em geral simplesmente pinadas ou duplamente pinadas (BARROSO *et al*, 1991; JOLY, 1998; LEWIS *et al*, 2005).

O pau-brasil possui porte arbóreo, com registros de até 30 metros de altura, tronco geralmente curto, tortuoso e irregularmente ramificado apresentando entre 30 e 40 cm de diâmetro, podendo chegar até a 70 cm nas maiores árvores. Uma das características do seu tronco é a presença de acúleos, espinhos que aparecem durante o estágio de crescimento. Com o passar do tempo a casca torna-se cinzenta e escura e os espinhos desaparecem, mantendo-se apenas nos galhos mais jovens (Figura 1). Sua madeira é pesada, dura e apresenta cerne de coloração de castanho alaranjado ao vermelho escuro quando recém-cortada (Figura 2) (CARVALHO, 2003; CORREA, 1984; MAINIERI, 1960; REZENDE *et al*, 2004).

Figura 1 – Tronco de árvore jovem coberto por acúleos (a) e tronco de exemplar adulto (b).
Fonte: www.flick.com.

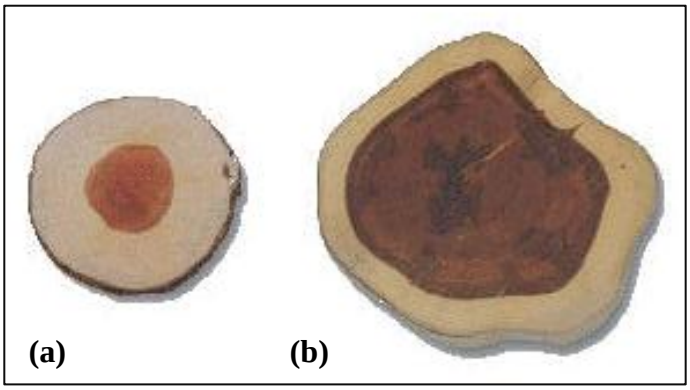

Figura 2 – Cortes transversais da *Caesalpinia echinata* (a) com 12 anos (b) com 27 anos. **Fonte**: www.hestia.org.br.

Sua copa é irregular, as folhas são compostas, bipinadas com 10 a 15 centímetros de comprimento com 3 a 7 pinas e de 8 a 21 folíolos por pina (Figura 3). Possui flores em cacho amarelo-douradas (Figura 4), com odor floral intenso, apresentando uma mancha vermelho-púrpura numa das pétalas, sua inflorescência apresenta, em média, 17 cm de comprimento, com 15 a 43 flores localizadas em seus ramos terminais. Sua floração acontece entre os meses de outubro e novembro no Sudeste e entre janeiro e fevereiro no Nordeste (LEWIS, 1998; LIMA, 1992, ROCHA, 2010).

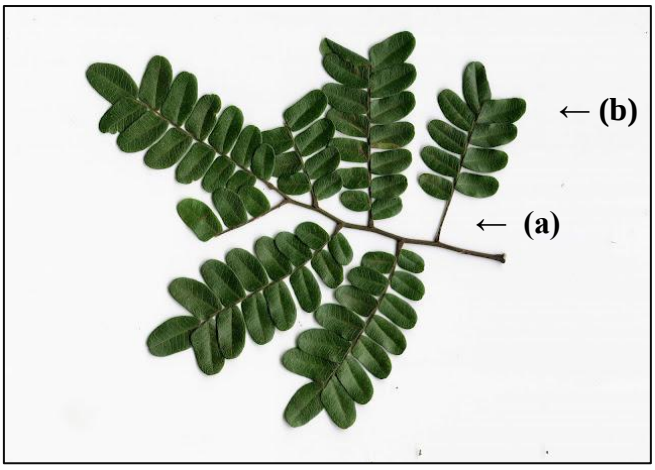

Figura 3 – Folha de *Caesalpinia echinata* demonstrando (a) pina e (b) folíolo. **Fonte**: arboretto.blogspot.com.

Figura 4 – Flor (a) e cacho de flores (b) de *Caesalpinia echinata*.
Fonte: www.flickr.com.

Os frutos, do tipo vagem, com 6 a 8 centímetros de comprimento e 2 a 3 centímetros de largura, são oblíquos, podendo ser mais largos no ápice. Possuem deiscência explosiva, amadurecendo, em média, em um mês após a floração e, assim como o tronco, são repletos de acúleos. Suas sementes de coloração acastanhada, são normalmente planas e irregularmente orbiculares, com 1 a 1,5 cm de diâmetro, presentes entre 1 a 2 por fruto (Figura 5) (LEWIS, 1998; LIMA, 1992).

Figura 5 – Fruto (a) e sementes (b) de *Caesalpinia echinata*. **Fonte**: http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/teses/2007/t_igor_ferrari_borges.html e http://arvoresdesaopaulo.wordpress.com/2009/12/15/o-pau-brasil-esta-frutificando-na-cidade.

2.2.2 Utilização e importância econômica

O extrativismo do pau-brasil foi a primeira atividade econômica desenvolvida pelos portugueses em terras brasileiras, considerado o primeiro ciclo econômico do Brasil, que perdurou por mais de três séculos (HOMMA, 2005).

O interesse pela espécie veio logo após o descobrimento. Foi intensamente explorada, inicialmente, para extração da brasileína, substância largamente empregada no tingimento de tecidos e elaboração de corantes de tonalidade avermelhada. Foi utilizada em substituição à *Caesalpinia sappan* L., espécie asiática já conhecida pelos colonizadores pelas mesmas propriedades, porém com maior custo. Sua exploração para esse fim só se extinguiu no século XIX, com a descoberta das anilinas sintéticas. Estima-se que, nos 100 primeiros anos, 2 milhões de árvores de pau-brasil foram derrubadas (MURALT, 2006; PINTO, 1999).

O pau-brasil tornou-se o produto local mais precioso para os portugueses que o vendiam na Europa também para utilização na construção de móveis e navios, devido à qualidade de sua madeira e produção de arcos para instrumentos de corda, por apresentar características únicas de ressonância, densidade, durabilidade, beleza, entre outras qualidades, que a tornam ideal para tal uso. Devido a essas propriedades e sua utilização já consagrada, sua substituição encontra resistência por parte dos consumidores, o que faz com que essa espécie continue a ser intensamente explorada (AGUIAR; PINHO, 2007; ANGYALOSSY; AMANO; ALVES, 2005; FAUSTO, 2002; RIZZINI, 1971).

Desde 1978 instituída árvore nacional, devido à grande extração ocorrida durante séculos, hoje a *Caesalpinia echinata* figura na lista Oficial de Espécies Brasileiras Ameaçadas de Extinção e sua população encontra-se restrita a pequenos fragmentos florestais distribuídos por toda a costa oriental atlântica brasileira desde o Rio de Janeiro até o Rio Grande do Norte (BRASIL, 1978; BRASIL, 2008; CORREA, 2003; MELO *et al*, 2007; OLIVEIRA, L. G. *et al*, 2002).

Essa redução drástica no número de exemplares desde o início de sua exploração acabou por promover uma maior preocupação com a conservação de populações nativas dessa espécie, gerando importantes iniciativas de conservação além de utilização na ornamentação de cidades, principalmente nos estados de sua ocorrência natural . A planta tem potencial ornamental devido à sua beleza e raridade. Apresenta porte elegante, copa arredondada, folhas

verde-brilhantes e flores suavemente perfumadas (AGUIAR; PINHO,1996; ROCHA; BARBEDO, 2008; SOUZA, 1982).

2.2.3 Propriedades Farmacológicas

O pau-brasil tem sido pouco estudado quanto ao seu potencial farmacológico, porém, estudos apontam a espécie como adstringente, secante e tônica (ASSIS, 2009), também usada pela população no tratamento de infecções de garganta (MOSCA; LOIOLA, 2009).

É utilizado também como corroborante e odontálgico no tratamento de patologias. Sua casca cozida é empregada no tratamento de diarreias e desinterias e, quando reduzida a pó, atua fortalecendo gengivas e atenuando cólicas menstruais, já o chá feito com suas folhas é ótimo contra diabetes (CORREA, 1984; COSTA; OLIVEIRA, 1996; FREIRE M. L., 2004; SOUZA *et al*, 2003).

A brasilina, substância encontrada no pau-brasil e brazileína, seu produto de oxidação, são conhecidas por suas propriedades medicinais. Possuem efeito neuroprotetor, protegendo o cérebro contra isquemia devido, provavelmente, à ação anti-inflamatória (SHEN *et al*, 2007), atividade imunossupressora, induzindo apoptose de linfócitos em camundongos (YE *et al*, 2006), efeito cardiotônico (ZHAO *et al*, 2006), antibacteriano contra bactérias multirresistentes (XU; LEE, 2004), hipoglicemiante (MOON, 1993) e quimiopreventiva para o câncer (BAE *et al*, 2005).

De acordo com Hernández-Pérez et al (2010), a resorcina, resorcinol ou m-dihydroxy-benzeno, substância extraída pela destilação do pau-brasil, é utilizada em clínicas dermatológicas como parte de fórmulas para peeling, melhorando a textura da pele, homogeneizando a pigmentação e atenuando rugas, sendo considerado como seguro, efetivo e de baixo custo.

Pouco se sabe sobre a composição de suas sementes, porém pesquisas já demonstraram a presença de vários inibidores de proteases em sementes de algumas leguminosas, incluindo a *Caesalpinia echinata* (OLIVEIRA, L. G. *et al*, 2002; OLIVA *et al*, 2000; BATISTA *et al*, 1996).

Proteases e inibidores de protease tem sido cada vez mais reconhecidos como fatores importantes na fisiopatologia de doenças humanas, em especial o câncer. Foi evidenciado que

elas estão diretamente ligadas a invasão tumoral e metástase e que inibidores de proteases podem atuar previnindo a disseminação dessas células ou inibindo seu crescimento, por isso estão emergindo como possíveis ferramentas no tratamento da doença (DECLERCK; IMREN, 1994).

Dois inibidores de tripsina foram identificados e isolados de sementes de *C. echinata* (OLIVEIRA L. G. *et al*, 2002). Outro inibidor de proteinase, também encontrado nas sementes, para calicreína plasmática, plasmina e fator Xlla, atua inibindo enzimas que participam da coagulação sanguínea e fibrinólise (CRUZ-SILVA *et al*, 2004), podendo também atuar no tratamento de psoríase e mal de Alzheimer (RIBEIRO *et al*, 2008).

Em estudo realizado por Luna et al (2005), em busca por produtos naturais que pudessem ser utilizados no controle de vetores de doenças tropicais, foi observada atividade do extrato etanólico das folhas de pau-brasil frente ao *Aedes aegypti* e à *Artemia salina*. O extrato etanólico do caule do pau-brasil também apresentou uma atividade muito potente contra os ovos de *Biomphalaria glabrata*.

Em 2002, sua atividade pró-inflamatória foi demonstrada por Alencar e colaboradores, que isolaram uma lactose/galactose ligada a lectina das folhas do pau-brasil capaz de induzir a migração de neutrófilos dependentes e independentes das células residentes (macrófagos, mastócitos e linfócitos).

Caesalpinia echinata foi capaz de inibir em 75,37% o câncer em modelos experimentais. A planta apresentou ainda atividade antimicrobiana, inibindo micro-organismos patogênicos como *Escherichia coli, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris* e *Bacillus cereus* (FREIRE, M. L., 2004), *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (SOUZA *et al*, 2003).

O extrato do cerne possui um expressivo potencial anti-inflamatório, mesmo quando comparado com fármacos considerados padrões para essa atividade, apresentando também uma grande inibição tumoral em tumores carcinomatosos e sarcomatosos (SILVA, 2006).

Grangeiro, em 2009, analisando as propriedades do extrato etanólico bruto de folhas de *C. echinata*, observou significativa atividade antitumoral frente ao sarcoma 180 e atividade antinociceptiva expressiva.

As flores também apresentam propriedades importantes. Seu extrato foi eficaz frente a *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus coagulase negativo,*

Escherichia coli e *Enterococcus faecali.* Além da propriedade antibacteriana, promoveu uma inibição tumoral em camundongos de 78% (BASTOS, 2011).

2.2.4 Aspéctos Fitoquímicos

Grandes quantidades de taninos foram encontradas na casca de *C. echinata* através de estudo fitoquímico (SILVA, 2001). A investigação do lenho do vegetal demonstrou a presença de ligninas, polímero de três álcoois: p-coumaril, siringil e sinapil, polímero que compões 20 a 30 % da parede celular da madeira e lhe confere rigidez e durabilidade, podendo ser responsável por suas propriedades vibracionais, o que justifica sua utilização na fabricação de arcos de violino (FUKUSHIMA; FUZETO, 2003). Contudo, o principal constituinte do extrato bruto desta parte do vegetal é sem dúvida a brasilina (OLIVEIRA, L. F. *et al*., 2002).

A brasilina é descrita como uma substância naturalmente incolor e que em presença de luz e oxigênio tem sua hidroxila oxidada em um grupo carbonila, originando a brasileína, de cor vermelha (Figura 6). Explorado excessivamente, este composto era bastante valorizado como corante, não tanto pela qualidade de seu tingimento mas pelas várias nuances de cores obtidas de seu pigmento. Atravéz de sua acidificação com vinagre ou fermento eram obtidos tons vermelhos e pela sua alcalinização, tons roxos (MELO; MELO; CLARO, 2006; OLIVEIRA, L. F. *et al*, 2002; SERRANO; LOPES; SERUYA, 2007).

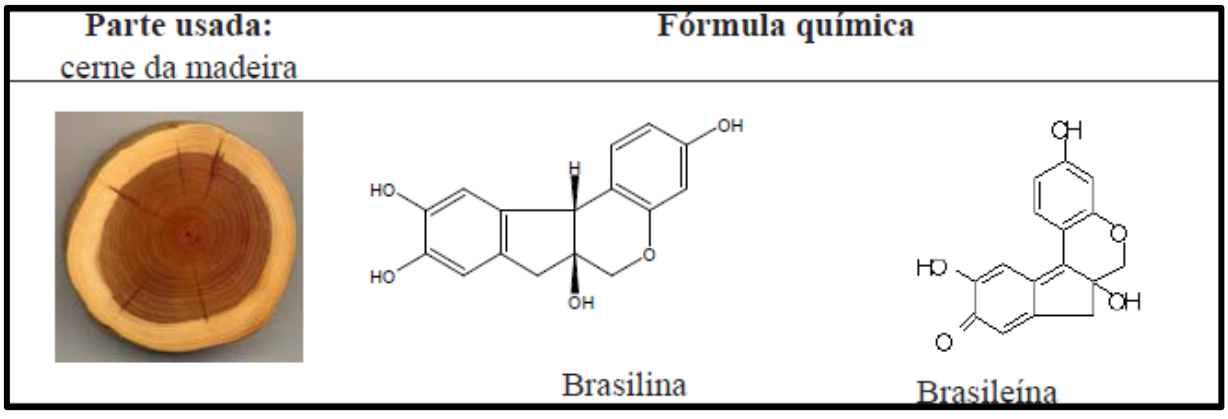

Figura 6 – Estrutura química dos constituintes majoritários do cerne da madeira de pau-brasil. **Fonte**: SERRANO, LOPES, SERUYA, 2007.

Em estudo fitoquímico realizado por Silva (2006), utilizando extrato de cerne de *C. echinata*, além de grande quantidade de flavonoides, classe a qual pertencem a brasilina e brasileína, foram evidenciados ainda cumarinas e taninos catéquicos em pequena quantidade.

De acordo com Rezende et al (2004), em estudo que avaliou a composição das flores, o *E*-beta-ocimeno aparece como constituinte majoritário, sendo observanda ainda a presença de outros terpenos como mirceno, linalol e neo-allo-ocimeno. Foi identificado também um grupo de derivados C6 contendo n-hexanal, (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexenol e 1-hexanol e alguns compostos nitrogenados como o indol e o antranilato de metila. As flores de *C. echinata* Lam. demonstraram ainda a presença de flavonóides, proantocianidinas condensadas, açucares redutores, triterpenos e esteroides (BASTOS, 2011).

Em 2005, Luna *et al.* relataram a presença de fenóis, flavononas, flavonas, flavonóides, esteróides, triterpenos, antraquinonas e antronas no extrato etanólico das folhas de *C. echinata.* Rezende *et al.* (2004) apontaram o (E)-3-hexeno-1-ol como constituinte encontrado em maior quantidade, seguido de b-ionol. Ainda no mesmo estudo, a classe de metabólitos mais bem representada foi a dos compostos fenólicos.

As sementes maduras contém de 30 a 40% de amido e 10 a 15% de carboidratos solúveis, predominantemente sacarose e vestígios de rafinose e estaquiose. Estes compostos estão diretamente ligados à germinabilidade das sementes assim como com a tolerância à dessecação durante o desenvolvimento e maturação das sementes (GARCIA *et al*, 2006).

2.2.5 Aspectos Toxicológicos

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

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

Já em estudo utilizando extrato etanólico de flores, Bastos (2011) observou uma DL50 de 1.825 mg/Kg de peso corpóreo do animal, quando administrado pela via intraperitoneal, não sendo verificados óbitos até a dose de 5.000 mg/Kg quando administrado por via oral.

2.3 Câncer

O câncer é uma das mais temidas doenças do mundo. Este medo deriva, provavelmente, da carência de tratamento efetivo para a maioria dos tumores metastáticos inoperáveis (LIU; ROBINS, 2006).

É considerada uma doença genética, resultado de alterações genônimas, sendo necessário o acúmulo de cinco a nove modificações numa determinada célula para que ocorra uma transformação maligna. Porém, ao contrário das demais síndromes genéticas humanas, não é necessariamente hereditária pois os cânceres humanos são, na sua maioria, de origem somática resultantes da interação de fatores genéticos e ambientais. Os carcinógenos químicos e físicos, agentes infecciosos e o estilo de vida do indivíduo são alguns dos principais fatores ambientais que possuem papel importante em sua etiologia e no surgimento de sua forma maligna (GUEMBAROVSKI; CÓLUS, 2008; MILLS; RIEGER, 2006; PERERA, 1996).

Apenas entre 5 e 10% de todos os cânceres que ocorrem podem ser considerados de causa hereditária. Neste caso, as mutações germinativas estão diretamente associadas à predisposição familiar e, nesses casos específicos, o câncer é classificado como uma doença genética e hereditária, sendo sua ocorrência relativamente rara (MILLS; RIEGER, 2006).

O câncer não é uma doença nova, é razoável acreditar que sempre existiu, já que é resultado de mutações genéticas que acontecem desde o início da vida. A mais antiga evidência de sua presença, no entanto, remonta a 8.000 a.C.. Foi detectada, em fósseis, a presença de osteossarcoma, um câncer ósseo cuja ocorrência é mais comum nesse material, apesar de sua característica rara, já que para cada 5000 fósseis com joelhos preservados um único caso é encontrado (EGGERS, 2002).

As primeiras descrições de tumores foram encontradas em papiros egípcios que datam de 1.600 a.C. Documentos na Índia, de 600 a.C., também descreveram lesões na cavidade bucal que se assemelham ao câncer (EBBERS, 2002).

A palavra câncer origina-se do grego *karkínos* e do latim *câncer,* ambos significando caranguejo devido a semelhança entre as veias intumescidas ao redor do tumor e as pernas do animal. Foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, o pai da medicina, que viveu entre 460 e 377 a.C. (BRASIL, 2011a).

Atualmente, câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células, que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos (BRASIL, 2011a). A massa de tecido que se forma, é morfológica e geneticamente diferente do tecido normal e cresce de forma autônoma é denominada neoplasia e o processo de formação dessa massa, no qual a função fisiológica normal das células é alterada resultando num crescimento anormal e incontrolável é denominado carcinogênese. Esses fenômenos são promovidos pela exposição inicial a agentes carcinógenos, que induzem uma série de eventos genéticos aumentando a incidência de neoplasia, podendo ser divididos em químicos (maior parte), físicos e biológicos (VULIMIRI; DIGIOVANNI, 2006).

2.3.1 Carcinogênese

O termo carcinogênese é usado para descrever a cascata de eventos que transforma uma célula normal em câncer e é visto hoje como um processo de múltiplos estágios sendo possível destacar três principais: iniciação, promoção e progressão (Figura 7) (BRASIL, 2011a; LIU; ROBINS, 2006).

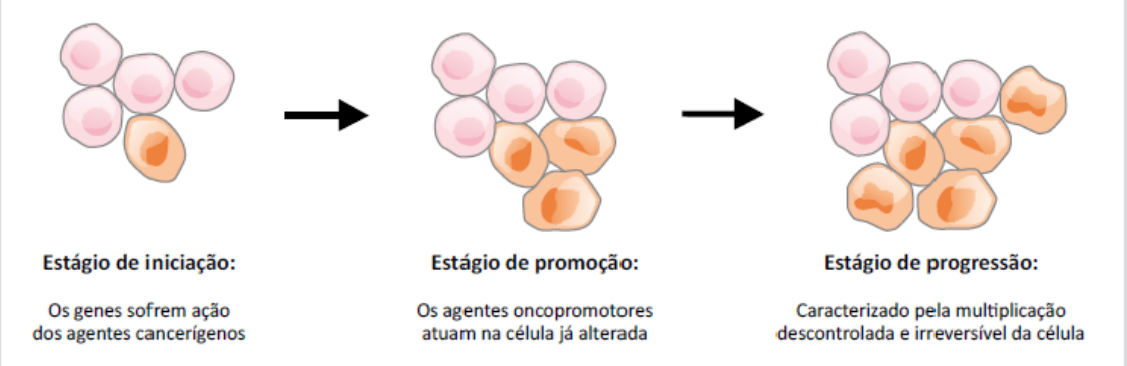

Figura 7 – Passo a passo do processo de carcinogênese. **Fonte**: BRASIL, 2011a.

O estágio de iniciação começa nas células, em geral células-tronco, por meio de mutações a partir da exposição a carcinógenos. Esses compostos alteram de modo irreversível a composição ou estrutura básica do componente celular de DNA, dando partida ao desenvolvimento do câncer. Nesta fase elas se encontram, geneticamente alteradas, porém ainda não é possível se detectar um tumor clinicamente. Os proto-oncogenes que controlam positivamente a proliferação e diferenciação celular e os genes supressores de tumor, reguladores negativos do crescimento celular, ambos genes ceclulares normais, parecem ser alvos dos carcinógenos nesta fase (Figura 8) (VULIMRI; DIGIOVANNI, 2006).

Figura 8 – Estágio de iniciação.
Fonte:www.inca.gov.br.

O estágio de promoção do câncer envolve a alteração da expressão do gene, a expansão clonal seletiva e a proliferação das células que sofreram iniciação. Ao contrário da iniciação e progressão, nesse estágio as alterações são reversíveis, podendo regredir com a descontinuação do agente promotor, podendo, porém reaparecer com a reinstituição do agente. A promoção exige um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor, que não é mutagênico mas age através de mecanismos epigenéticos (Figura 9) (LIU; ROBINS, 2006).

Figura 9 – Estágio de promoção.
Fonte:www.inca.gov.br.

O último dos estágios chama-se progressão ou conversão maligna. Caracteriza-se por alterações moleculares adicionais, um aumento maior da massa tumoral primária, o

desprendimento de células dessa massa, o movimento na direção de órgãos e tecidos adjacentes e a penetração de células neoplásicas individuais ou em pequenos agrupamentos no sistema circulatório, com seu transporte e fixação em órgãos e tecidos distantes de sua origem e posterior crescimento (metástase) (Figura 10) (LIU; ROBINS, 2006).

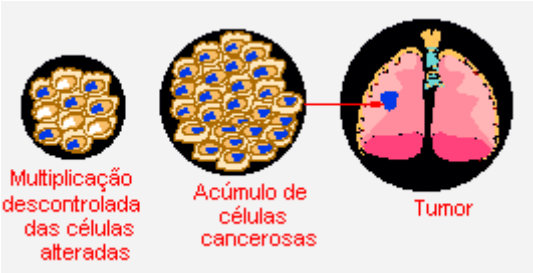

Figura 10 – Estágio de progressão.
Fonte:www.inca.gov.br.

2.3.2 Epidemiologia e tratamento

Conhecido há muitos séculos, o câncer foi amplamente considerado como uma doença dos países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. Há aproximadamente quatro décadas, a situação vem mudando, e a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos. Assim, nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média rendas (BRASIL, 2011b).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, válidas também para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide para o sexo feminino. São esperados um total de 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino (Figura 11) (BRASIL, 2011b).

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Figura 10 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma. **Fonte:** Brasil, 2011b.

Existem basicamente três principais formas de tratamento do câncer: quimioterapia, radioterapia e cirurgia (BRASIL, 2011a). Mais recentemente tem-se usado também a terapia fotodinâmica (MORAES; COSTA, 2011; RIBEIRO *et al*, 2009) e imunoterpia (FELDMANN; SCHMITT, 2009), sendo que o objetivo de cada um destes tratamentos é erradicar o câncer, normalmente por meio da terapia combinada, onde é associado mais que um tipo de tratamento. A escolha terapêutica deve levar em consideração uma gama de fatores tais como idade do paciente, estágio da doença, características do tumor, susceptibilidade ao tratamento, entre outras (BRASIL, 2011a).

Todos os pacientes oncológicos que não respondem bem à excisão cirúrgica, e à radioterapia ou que apresentem metástases disseminadas, são geralmente tratados com quimioterápicos antineoplásicos. A quimioterapia convencional utiliza-se de fármacos que têm como alvo diversos processos fisiológicos das células. Alguns medicamentos, no entanto, não atuam exclusivamente sobre as células cancerígenas, afetando outras células normais que estão se proliferando. Isso significa que ao mesmo tempo em que vêm possibilitar a cura, por outro lado essas drogas produzem efeitos colaterais desagradáveis (FUKUMASU *et al*, 2008).

2.3.3 Cancerologia experimental

Estudos com animais são normalmente os primeiros estudos *in vivo* a serem realizados com um medicamento ou terapia para determinar os efeitos de substâncias diversas e seus limites de segurança. Além disso, o estudo *in vivo* permite a análise dos processos

bioquímicos e fisiológicos e de inúmeros eventos comportamentais (JANSSEN; SMITS, 2002).

A qualidade dos estudos na fase pré-clínica, passo essencial para a correta aplicação dos ensaios clínicos em seres humanos, depende muito da adequação dos modelos em animais (HOSSNE, 2002).

A cancerologia experimental é de grande valia para se estudar os diversos aspectos relacionados aos processos neoplásicos em humanos. O modelo animal para o estudo de tumores ganhou um novo impulso, na última década, após constatar-se que animais desenvolvem o câncer por motivos semelhantes aos humanos (QI & XU, 2006).

A utilização de camundongos como protótipos de estudos biológicos ocorre de modo intenso, principalmente nas áreas de imunologia, oncologia e genética. Essa prática ocorre por diversas razões, dentre elas o fato das linhagens de camundongos serem altamente padronizadas, possuírem características conhecidas e monitoradas após várias gerações, devido ao seu pequeno tamanho, facilidade de manuseio, baixo custo de manutenção e período de vida curto, além do fato de compartilharem similaridades genéticas e fisiológicas com os humanos, permitindo que múltiplas características da doença sejam estudadas nestes modelos (HANN; BALMAIN, 2001; JANSSEN; SMITS, 2002).

2.3.3.1 Carcinoma de Ehrlich

Pode-se afirmar que o Tumor de Ehrlich, por ser um dos primeiros tumores transplantáveis conhecidos, é o mais extensamente utilizado para experimentação (GUERRA, 1983).

O carcinoma de Ehrlich foi introduzido por Paul Ehrlich em 1986 e descrito em 1906 como um carcinoma mamário de camundongos fêmeas de origem epitelial maligna, espécie-específica. Inicialmente, o tumor foi desenvolvido experimentalmente sob a forma sólida, quando inoculado no subcutâneo. Somente em 1932, com Loewenthal & Jahn, é que surgiu a forma ascítica, inoculado intraperitonealmente (DAGLI, 1989; EHRLICH, 1906).

O tumor de Ehrlich, em camundongos, desenvolve-se em cavidades serosas como a abdominal e pleural, bem como em músculos; não se observa, porém, crescimento em vísceras parenquimatosas, como fígado. É bom modelo para estudos envolvendo citologia,

por crescer na forma ascítica, o que permite a obtenção de células tumorais isoladas (HOSSNE, 2002).

2.3.3.2 Sarcoma 180

O sarcoma 180 ou tumor Crocker é um tumor transplantável, não-metastatizante originário do tecido conjuntivo do rato (WORLEY; SPATER, 1952). Este tumor que foi descoberto em 1914 pelo Dr. WH Woglom no Laboratório Crocker nos Estados Unidos como um tumor murino espontâneo, de natureza epitelial e localizado na região axilar. Depois de alguns transplantes, a classificação aceita com base em investigações histopatológicas foi sarcoma, apesar de, nessa época a definição de sua origem ser bastante controversa (GÜNTHER *et al*, 1984).

O sarcoma 180 é um bom modelo de estudo, pois as células são de fácil obtenção e manutenção. Histologicamente apresenta-se como massa sólida formada por células poliédricas de citoplasma basófilo e núcleo central, arranjadas em ninhos ou cordões, que invadem o músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos sangüíneos. Apesar de seu comportamento agressivo local, esta neoplasia não produz metástases. Pode ser transplantado por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal e cresce rapidamente em 90% a 100% dos animais inoculados, havendo regressão natural em 8% a 10% desses (WUTHSTRACK; SILVEIRA; FURLAN, 2001).

2.4 Toxicologia e Toxicidade aguda

A história da toxicologia acompanha a própria história da civilização, apesar da falta de registros. Desde a época mais remota, o homem possuía conhecimento sobre os efeitos tóxicos de venenos animais e de uma variedade de plantas tóxicas. O poder aniquilador de venenos era frequentemente utilizado como instrumento de caça ou como arma contra inimigos (OGA; SIQUEIRA, 2008).

Um dos documentos mais antigos, o Papiro de Ebers, datado de 1500 a.C., de origem egípcia, registra uma lista de 800 ingredientes ativos incluindo metais como chumbo e cobre, venenos animais e diversos vegetais tóxicos. Hipócrates (460-364 a.C), Theofrastus (370-287

a.C.), Dioscorides (40-90 a.C.), entre outros, contribuíram muito para a identificação de novos agentes tóxicos e terapêuticos (OGA; SIQUEIRA, 2008).

Mitriades (120-63 a.C.), provavelmente, foi o primeiro a realizar experiências toxicológicas, testando venenos em escravos. Nicandro (204-135 a.C) descreve em seus poemas a toxicidade e antidotismo de vários venenos. Avicena (980-1037 a.C) deu sua contribuição à toxicologia discutindo sobre os mecanismos de ação dos venenos (OGA; SIQUEIRA, 2008).

Um agente tóxico, também conhecido por toxicante ou poison é definido como qualquer substância que em dose suficiente provoque doenças e a morte. Paracelso (1493-1541), um médico do século XVI, observou que "todas as substâncias são tóxicas; não existem substâncias que não sejam tóxicas. A dose certa é que diferencia o remédio do tóxico" (LANGMAN; KAPUR, 2006).

Grande parte dos consumidores de plantas medicinais sentem-se encorajados por acreditarem que estes remédios, por serem naturais, são inerentemente seguros. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente (VEIGA JR.; PINTO; MACIEL, 2005).

A flora brasileira apresenta um número grande e variado de espécies potencialmente lesivas para o ser humano. A planta medicinal utilizada em medicamento é um xenobiótico, isto é, um produto estranho ao organismo humano, nele introduzido com finalidades terapêuticas. Como toda substância estranha, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos e assim devem ser encarados até que se prove o contrário (SCHVARTSMAN, 1991; SIMÕES *et al*., 2003).

O estudo da toxicologia serve a sociedade de diferentes maneiras, para proteger os humanos e a natureza dos efeitos deletérios dos toxicantes, estabelecer limites seguros para os agentes químicos, para facilitar o desenvolvimento de pesticidas e fármacos mais seletivos e para prevenir, diagnosticar e tratar as intoxicações de maneira mais eficiente (GALLO, 2001; HODGSON, 2003).

Assim nos estudos de plantas e de novas substâncias, um balanço entre a atividade biológica versus a toxicidade é um parâmetro fundamental para verificar sua aplicabilidade (CALIXTO, 2000).

Os testes toxicológicos normalmente requeridos com propósito regulatório de substâncias incluem: toxicidade aguda, toxicidade sub-crônica, toxicidade crônica, mutagênese, carcinogênese, reprodução e teratogênese, toxicocinética, efeitos locais sobre a pele e olhos, sensibilização cutânea e ecotoxicidade (BARROS, DAVINO, 2008; SPIELMANN, 2002).

Toxicidade aguda é definida como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto após a administração de uma dose única ou doses múltiplas dentro de 24 horas. Tem por objetivo caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao cálculo da DL50 (Dose letal 50%) ou CL50 (Concentração letal média) (BARROS; DAVINO, 2008).

A utilização de *Artemia salina* como organismo bioindicador em teste de toxicidade aguda é um bioensaio que serve tanto como indicador de toxicidade como de bioatividade de diversas substâncias químicas, inclusive extratos de plantas. Apresenta vantagens como: rapidez, praticidade, simplicidade, baixo custo, requer pouca quantidade de amostra, além de apresentar boa relação com testes *in vivo*, sugerindo que é um método útil (Figura 12) (LOGARTO *et al*., 2001; LOPES *et al*., 2002).

Figura 12 – Larva de *Artemia salina.*
Fonte: flickriver.com.

2.5 Micro-organismos e resistência a antibióticos

Bactérias estão presentes muito antes da evolução humana e doenças bacterianas provavelmente co-evoluiram com cada uma das espécies que involuntariamente as hospeda. Muitas doenças bacterianas observadas hoje existem desde o surgimento de nossa espécie, outras podem ter se desenvolvido mais tarde, porém, em ambos os casos, por muito tempo, o conhecimento da causa dessas doenças infeciosas não era conhecido. Com a microbiologia os patógenos bacterianos se tornaram aparentes (WASSENAAR, 2011).

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

No decorrer das últimas décadas, o desenvolvimento de fármacos eficientes no combate a infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas. Por outro lado, a disseminação do uso de antibióticos lamentavelmente fez com que as bactérias também desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos, com o conseqüente aparecimento de resistência (RANG; DALE; RITTER, 2001).

As bactérias tem um um curto período de duplicação (aproximadamente 20 minutos), o que lhes confere a propriedade de responder rapidamente as mudanças do ambiente, já que várias gerações podem se desenvolver em apenas algumas horas, havendo, portanto, inúmeras oportunidades para uma adaptação evolutiva. A frequência de mutações espontâneas para determinado gene em populações bacterianas é extremamente baixa, sendo de aproximadamente uma a cada 106-108 células por divisão. Desta forma, a probabilidade é de que uma célula em cada 10 milhões irá, ao dividir-se, produzir uma célula-filha contendo uma mutação em determinado gene (RANG; DALE; RITTER, 2001).

Apesar da presença de poucos microrganismos geneticamente modificados não ser suficiente para produzir resistência, se uma população bacteriana infecciosa contendo alguns mutantes resistentes a determinado antibiótico for exposta a este fármaco, os genotipicamente alterados terão maior vantagem seletiva (RANG; DALE; RITTER, 2001).

A resistência a antibióticos é inevitável e irreversível, sendo uma consequência natural da adaptação da célula bacteriana a exposição dos antibióticos e, portanto, fármacos que hoje

lideram as listas dos mais vendidos correm o risco de se tornarem obsoletos, devido ao aumento da resistência bacteriana (SANTOS, 2004; SILVEIRA *et al*, 2006).

O desenvolvimento de novos agentes bactericidas potentes vem sendo alcançado com sucesso, seja pela elaboração racional de novas gerações de antibióticos visando suplantar a resistência ou a partir de programas direcionados ao descobrimento de produtos naturais bioativos (SILVEIRA *et al*, 2006).

As novas estratégias da pesquisa em produtos naturais microbianos, envolvendo a busca de substâncias em micro-organismos pouco explorados e a procura por novos produtos naturais, explorando a ampla biodiversidade existente, podem acelerar o processo de descoberta de novos antibióticos, extremamente importantes num cenário de rápido desenvolvimento de resistência pelas bactérias aos agentes terapêuticos disponíveis (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

2.5.1 *Staphylococcus aureus*

Estafilococos são bactérias Gram-positivas de forma esférica, pertencentes à família *Micrococcaceae*, que por se dividirem em planos diferentes, quando vistos ao microscópio, aparecem na forma de cachos de uva (Figura 13). São imóveis, medindo de 0,5 a 1,0 μm. Apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, atuando sobre carboidratos com produção de ácidos, sendo anaeróbias facultativas. Crescem em temperaturas de 7 a 47,8º C com desenvolvimento ótimo entre 30 e 37º C (BREED; MURRAY; SMITH, 1994; FRANCO; LANDGRAF, 2002).

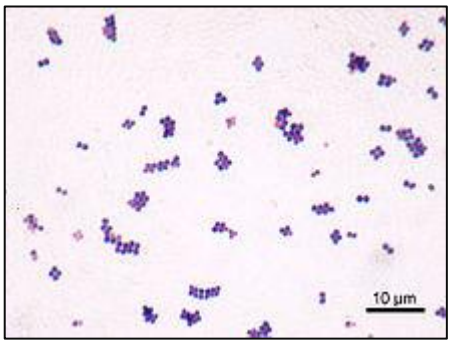

Figura 13 – Staphylococcus aureus.
Fonte: wikipedia.com.

Staphylococcus aureus é considerado uma das bactérias não esporuladas mais resistentes no meio ambiente. Podem sobreviver por longos períodos em superfícies secas, suportam relativamente o calor e podem tolerar uma concentração aumentada de sal (KONEMAN *et al*., 2001; SCHAECHTER *et al*., 2002).

Os humanos e animais são seus principais reservatórios, estando presentes nas vias nasais, garganta, cabelo e pele de 50% ou mais dos indivíduos saudáveis, podendo ter incidência maior em indivíduos que têm contato com ambientes hospitalares. Os manipuladores assim como equipamentos e superfícies manipuladas por esses são as principais fontes de contaminação de alimentos por este tipo de microrganismo, tornando-o um dos patógenos mais apontados como causador de intoxicação alimentar (FORSYTHE, 2002; XAVIER *et al*., 2007).

Uma série de fatores de virulência, principalmente componentes de superfície celular são produzidos por *Staphylococcus aureus*. Peptidoglicano e ácidos teicóicos estimulam a produção de citocinas, funcionando de forma semelhante ao LPS (Lipopolissacarideo) das bactérias Gram-negativas. A cápsula, produzida pela maioria das cepas, confere resistência à fagocitose, assim como a proteína A, que produz o mesmo efeito impedindo que os anticorpos interajam com as células fagocitárias. Proteínas que se ligam à fibronectina, colágeno e fibrinogênio, funcionam como adesinas, promovendo a colonização dos tecidos pelo *S. aureus*. Outras enzimas extracelulares como: coagulase, catalase, desoxirribonucleases, hialuronidase, lipase, proteases e estafiloquinase atuam facilitando sua disseminação pelos tecidos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

A capacidade de *S. aureus* de causar infecção é multifatorialmente mediada. O início da infecção e a evolução da doença dependem da resistência do hospedeiro (mecanismos de defesa) e da capacidade do organismo para superar estes fatores de virulência (BAIRD-PARKER, 1990).

O aumento da resistência bacteriana é atribuído principalmente à administração arbitrária de antibióticos (incluindo a prescrição desnecessária e auto-medicação) e ao uso inadequado. A tudo isto se conjuga a falta de um sistema global de vigilância da resistência antimicrobiana que gere informações para tomada de decisões e desenvolvimento de políticas, tanto terapêuticas quanto reguladoras (LA RESISTENCIA..., 1999).

Há alguns anos, as cepas deste microrganismo eram quase que na sua totalidade sensíveis à penicilina, o que já não acontece nos dias de hoje onde apenas 10 % apresentam esta característica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). A eficácia deste antibiótico, introduzido nos anos 40, foi praticamente anulada dentro de uma década devido à disseminação de plasmídeos que espalharam o gene β-lactamase entre os *S. aureus*. Na década de 60, dois anos após a introdução de penicilinase β-lactamicos resistente (meticilina), já eram isoladas cepas resistentes à meticilina, consideradas um dos mais importantes agentes causadores de infecções hospitalares. Como alternativa ao tratamento desses micro-organismos é utilizada a vancomicina, que hoje já não possui eficácia em alguns casos (LENCASTRE; OLIVEIRA; TOMAZ, 2007).

3 Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a ação biológica (toxicológica, microbiológica e antitumoral) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam.

3.2 Objetivo Específicos

- Classificação botânica do vegetal;
- Obtenção de extratos brutos das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. utilizando solventes orgânicos;
- Verificar a toxicidade aguda do extrato bruto etanólico das sementes da *Caesalpinia echinata* Lam. através da determinação da dose letal para 50% da população (DL_{50});
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico das sementes da *Caesalpinia echinata* Lam.;
- Analisar a atividade antineoplásica do extrato bruto etanólico das sementes da *Caesalpinia echinata* Lam.;

Artigo I

Artigo submetido à Revista Brasileira de Plantas Medicinais

Avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae/Caesalpinioideae)

SILVA, D.I.S.[1*]; CAVALCANTI, K.P.S. [2] ; SILVA, E.C.B. [1]; OLIVEIRA, M.V.G. [3] ; CARIBÉ, R.A. [1]; SOUZA, I.A. [1]

[1] Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas [2] Hospital das Clínicas [3] Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP: 50670-90, Recife – Brasil *daniiss@hotmail.com

RESUMO: Embora a utilização de plantas para uso terapêutico seja largamente difundida, poucos são os estudos toxicológicos que comprovem sua segurança. O pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) é uma espécie nativa da mata atlântica que vem sendo extremamente estudada devido a suas mais diversas propriedades medicinais. Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial toxicológico do extrato etanólico das sementes de *C. echinata* através de ensaio de toxicidade aguda com utilização de camundongos albinos e o micro crustáceo *Artemia salina*. Aos animais foram administradas doses do extrato entre 350 e 4.500 mg/mL por via intraperitoneal, sendo observados periodicamente por 24 horas quanto à presença de sinais clínicos e óbitos. Larvas de *Artemia salina* foram divididas em grupos de 10 e submetidas a concentrações de 50 a 1.000 µg de extrato por mL, sendo então observadas pelo mesmo período quanto à motilidade e morte das larvas. Os testes toxicológicos demonstraram baixa toxicidade do extrato utilizado embora tenha sido verificada a presença de reações adversas nos camundongos.

Palavras-chave: *Caesalpinia echinata* Lam., toxicidade, *Artemia salina*

ABSTRACT: Evaluation of acute toxicity of crude ethanolic extract of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (*Fabaceae* / *Caesalpinioideae*). Although the use of plants for therapeutic use is widespread, few toxicological studies to prove their safety. Brazil wood (*Caesalpinia echinata* Lam.) is a species native to the Atlantic forest that has been greatly studied due to its many medicinal properties. This study aimed to evaluate the toxicological potential of ethanolic extract of seeds of *C. echinata* through acute toxicity test with the use of albino mice and micro crustacean *Artemia salina*. For the animals were administered doses of

the extract between 350 and 4500 mg / ml intraperitoneal, observed periodically for 24 hours for the presence of clinical signs and mortality. Larvae of *Artemia salina* were divided into groups of 10 and subjected to concentrations from 50 to 1000 mg of extract per mL, and then observed for the same period for motility and death of larvae. Toxicology tests showed low toxicity of the extract used although it was verified the presence of adverse reactions in mice.
Key words: *Caesalpinia echinata* Lam., toxicity, *Artemia salina*

INTRODUÇÃO

Embora haja grande utilização de plantas consideradas medicinais no Brasil alimentada pela reconhecida riqueza da nossa flora, pouquíssimos são os dados científicos existente no país sobre o uso terapêutico e possíveis efeitos tóxicos dos vegetais (PIRES *et al*, 1997). O uso tradicional de diversas espécies de plantas medicinais baseado em conhecimentos populares, aliado à crença de que, por ser natural não causa reações adversas, fez com que poucas espécies fossem avaliadas através de estudos pré-clínicos e clínicos, a fim de comprovar sua eficácia e segurança (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

A toxicidade de uma substância pode ser definida como a capacidade de causar dano grave ou morte a um dado organismo (DRAIZE *et al*, 1944). Os dados referentes à investigação pré-clínica compreendem o estudo da toxicidade aguda, subaguda a doses repetidas e toxicidade crônica, sendo a primeira avaliada através da administração de uma única dose do medicamento ou de doses fracionadas ao animal, em um período não superior a 24 horas (BRASIL, 1997).

A família *Fabaceae*, anterior *Leguminosae*, é a terceira maior família entre as angiospermas e está dividida em três subfamílias: *Caesalpinioideae*, *Faboideae* e *Mimosoideae* (JUDD *et al*, 2009). Ocupa o segundo lugar em importância econômica dentre as demais famílias, sendo bastante utilizada na alimentação e ornamentação (LIMA, 2000).

Caesalpinia echinata Lam. é uma espécie nativa da mata atlântica popularmente conhecida como pau-brasil, arabutã, ibirapitanga, pau-pernambuco e pau-vermelho. Apresenta diversas propriedades medicinais, tendo o seu cerne, casca e folhas extensamente estudados devido a suas propriedades adstringente, secante, odontálgica, tônica, antitumoral e antimicrobiana já demonstradas (CORREA; PENNA, 1984; FREIRE, 2004; SOUZA *et al*, 2003). A composição de suas sementes é alvo de estudos cujos resultados caracterizam a

presença de inibidores de protease, compostos diretamente ligados a fisiopatologia de várias doenças humanas (DECLERCK; IMREN, 1994; OLIVEIRA *et al*, 2002).

Diante desse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial toxicológico do extrato etanólico das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (EESCe) através da avaliação de toxicidade aguda por dois métodos distintos.

MATERIAL E MÉTODO

Material Botânico e Obtenção da matéria prima

O material botânico constituído de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. foi coletado na Reserva Ecológica de Tapacurá, localizada no município de São Lourenço da Mata, Pernambuco. Foram coletados os frutos (vagens) diretamente da árvore ainda imaturos, que foram secos ao sol durante 1 a 2 dias para que ocorresse a liberação das sementes. A exsicata da espécie vegetal foi identificada pela botânica Drª. Marlene Barbosa, e depositada no herbário Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco, sob o registro 68.190.

Preparação do Extrato Etanólico Bruto das Sementes

Após limpeza e pesagem, as sementes secas foram trituradas e colocadas em etanol absoluto, permanecendo em contato com o solvente por um período de 48 horas à temperatura ambiente, sendo o conjunto agitado manualmente, esporadicamente, e mantido ao abrigo da luz. O líquido da extração foi filtrado e concentrado à vácuo em evaporador rotativo acoplado a uma bomba de vácuo sob temperatura constante de 45ºC.

Toxicidade aguda em camundongos

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (*Mus musculus*) adultos com peso entre 25 e 35g, provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal

de Pernambuco. Os animais foram divididos por grupos de seis. mantidos em gaiolas de polipropileno, em condições controladas de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro), temperatura (25±2°C), permaneceram sem alimento por um período de 12 horas antes do experimento e receberam água *ad libitum*. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE, processo n° 23076.051710/2011.

A determinação da toxicidade aguda foi realizada pelo método Karber e Benhrens (1964) onde o ensaio foi dividido em fase preliminar e definitiva. Na fase preliminar, foram administradas doses em concentrações crescentes com uma progressão geométrica de razão 2. A finalidade foi determinar a maior dose que não apresentava letalidade (D_1) e a menor dose capaz de provocar morte em 100% dos animais do grupo ($D_{2)}$. Com base nos dados da etapa preliminar foi iniciada a fase definitiva. Aos animais foram aplicadas doses crescentes entre D_1 e D_2, com o objetivo de determinar a DL_{50} (dose letal para 50% dos animais), concluindo a fase definitiva. A administração da substância foi realizada por via intraperitoneal. O grupo controle recebeu o veículo utilizado na dissolução da substância em estudo. Os animais ficaram sob observação durante duas horas após administração de cada dose, com notificações a cada 10 minutos, e, a partir de então acompanhadas periodicamente durante 48 horas. Neste período foram verificados os efeitos apresentados e a ocorrência de óbitos, dados necessários para a obtenção do percentual de mortalidade e para cálculo das doses letais. A DL_{50} foi calculada utilizando-se a fórmula $DL50 = Df - \Sigma(a.b)/ n$, Onde: Df = Dose mínima capaz de matar todos os animais; a = Diferença entre as suas doses consecutivas; b = Média de animais mortos entre duas doses consecutivas; n = Número total de animais por lote.

Toxicidade aguda utilizando *Artemia salina*

Foi utilizada para o teste a metodologia de Meyer *et al*. (1982). Neste ensaio biológico foram utilizadas larvas de *Artemia salina* Leach, obtidas a partir da incubação de 20 mg de cisto de Artemia salina em água marinha, sob luz artificial por 48 horas. Grupos de 10 metanáuplios foram expostos a diferentes concentrações (50, 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/ml) de extrato etanólico das sementes de *C. echinata* (EESCe) e as percentagens de mortalidade determinadas após 24 horas de contato. Todo o experimento foi desenvolvido em

triplicata. De acordo com a metodologia utilizada, a CL_{50} deve ser interpolada através da plotagem gráfica dos dados.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a aplicação do extrato etanólico das sementes de *Caesalpinia echinata*, nas doses de 350 a 4.500 mg/Kg, os camundongos foram observados separadamente de forma a catalogar as reações referentes à absorção do extrato (Tabela 1).

Tabela 1- Sinais clínicos da toxicidade observada em camundongos albinos swiss fêmeas, tratados com diferentes doses do EE das sementes de *C. echinata*, por via intraperitoneal.

PARÂMETROS	DOSE (mg/Kg)				
	375	750	1500	3000	4500
Estimulantes					
Reação de fuga	+++	+++	+++	+++	+++
↑ Frequência Respiratória	-	-	-	+	+
Sibilo	-	-	-	-	-
Movimentos Estereotipados	++	++	+++	+++	+++
Tremores finos/ grosseiros	-	-	-	-	-
Movimento circulares	++	++	++	++	+++
Agitação	+	+	+	+	+
Postura em garra	+++	+++	+++	+++	+++
Movimentos de vibrissas	+	+	+	+	+
Saltos	-	-	-	-	-
Postura de ataque	-	-	-	-	-
Ereção de cauda	+	+	+	+	+
Piloereção	-	-	-	-	-
Ondulações/Fasciculações na cauda	-	-	-	-	-
Expansão do pavilhão auricular	-	-	-	-	-
Depressores					
Prostração	-	-	-	-	-
Alteração de marcha	+	-	-	-	-
Postura estática	+	+	-	+	-
Sonolência	-	-	-	-	-
Abaixamento do trem posterior	+	+++	+++	+++	+++
Dispnéia	-	-	-	-	-
Outros					
Edema de focinho	-	-	-	-	-
Refluxo	-	-	-	-	-

Espasmos	-	-	-	-	-
Petéquias	-	-	-	-	-
Palidez	-	-	-	-	-
Excreção fecal	++	++	++	+	+++
Distensão abdominal	-	-	-	-	-
Contorções	+++	+++	+++	+++	+++
Diurese	+	-	+	+	-
Lacrimejamento	-	-	-	-	-
Prurido	-	-	-	-	-
Agressividade	-	-	-	+	+++
Hipertrofia testicular	-	-	-	-	-
Exoftalmia	-	-	-	-	-

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

Efeitos tóxicos foram verificados após administração do extrato durante todo o ensaio. Reações de fuga e postura em garra foram observadas de forma intensa em todas as doses. Aumento da frequência respiratória, movimentos estereotipados e circulares, presentes nas menores doses, se acentuaram nas doses mais elevadas.

A espécie demonstrou ainda que produz amplo efeito sobre o trato gastrointestinal. A presença de intensas contorções em todas as doses administradas se evidenciou, com um aumento expressivo da excreção fecal na maior dose, assim como uma alteração consistência da excreção fecal, que passou de seca nas doses de 375, 750, 1.500 e 3.000 mg/Kg para pastosa e com muco na dose de 4.500 mg/Kg.

Durante algumas horas após o experimento os animais mantiveram-se reativos e agitados, contudo, após 24 horas os efeitos regrediram gradativamente.

Na avaliação toxicológica, as doses mais altas se mostraram mais reativas. Entretanto não foi verificado óbito. Dessa forma não foi possível calcular a DL_{50}.

Outras partes da planta já haviam sido estudadas quanto a sua toxicidade. Os resultados encontrados divergem do observado neste ensaio, já que foram evidenciados valores de DL_{50} de 1.825 e 995, 57 mg/Kg em flores e folhas respectivamente, o que provavelmente se deve à diferente constituição químicas das partes da planta (SILVA, 2006; BASTOS, 2011).

Quando avaliada a toxicidade de sementes de outras espécies do mesmo gênero, entretanto, não foi observada letalidade. Logo, consideramos como plantas de baixa toxicidade. Esses achados estão de acordo com os obtidos no presente estudo (CAVALHEIRO *et al*, 2009; SARMA; DAS, 2009; SELVI *et al*, 2010; SIREERATAWONG *et al*, 2010).

A análise comportamental da *Artemia salina* Leach em contato com as diluições demonstrou que não houve alteração referente a motilidade das larvas em relação ao controle, demonstrando a ausência de influência sobre a movimentação do organismo estudado.

Após 24 horas de exposição da *A. salina* Leach, não foram observados óbitos nas concentrações administradas.

Meyer *et al* (1982) estabeleceram uma correlação entre o grau de toxicidade e a concentração letal média (CL_{50}) apresentada com extratos de plantas sobre larvas de *A. salina*, considerando a substância como tóxica (CL_{50} até 500 μg/ml), moderadamente tóxica (CL_{50} de 500 a 1.000 μg/ml) e atóxica ou de baixa toxicidade (CL_{50} acima de 1.000 μg/ml). No presente estudo, não foi verificada morte de larvas em nenhuma das doses, inclusive na de 1.000 μg/ml, conclui-se, portanto, que o extrato testado pode ser considerado atóxico ou de baixa toxicidade por este método, corroborando os resultados encontrados em camundongos.

A utilização da *A. Salina* em estudos toxicológicos preliminares deve-se a simplicidade com que pode ser manuseado. A rapidez e o baixo custo favorecem a utilização em diversos estudos. Ensaios de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral podendo estimar a concentração média letal (CL_{50}) (LUNA *et al*, 2005). Além disso, os testes com esse microcrustáceo são de grande valia já que apresenta boa relação com os testes em animais (LOGARTO, 2001).

Conclui-se, portanto, que o extrato das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. apresentou baixa toxicidade em testes agudos quando administrado por via intraperitoneal em camundongos assim como quando na presença de *Artemia salina*. Embora não tenham ocorrido óbitos, o extrato demonstrou que possui influência sobre o comportamento dos animais, com novas perspectivas de futuras pesquisas científicas.

REFERÊNCIAS

BASTOS, I.V.G.A. **Avaliação da atividade farmacológica de Caesalpinia echinata Lam. (FLORES)**. 2011. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciencias Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

BRASIL. Resolução nº 251/97, de 05 de agosto de 1997. Normas de Pesquisa com Novos Fármacos, Medicamentos, Vacinas e Testes Diagnósticos Envolvendo Seres Humanos. **Diário Oficial da União**, 23 de setembro de 1997, Seção I, Página 1117.

CARVALHEIRO *et al*. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de Caesalpinia ferrea Mart., Leguminosae**. Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2, 2009.

CORREA, M.P.; PENNA, L.A. **Dicionario das plantas uteis do Brasil e das exoticas cultivadas**.Volume 6. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal: Ministério da Agricultura, 1984.

DECLERCK, Y.A.; IMREN, S. Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. **European Journal of Cancer**, v.30, n.14, 1994.

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, H.O. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, p. 337- 90, 1944.

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

KARBER, G.; BEHRENS, B. **Estatistical Methods in Biological Assays**. 2 Ed. London: Ed. Griffin Ch. and C., 1964

LOGARTO, A.P. *et al*. Comparative study of the assay of Artemia salina L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v.8. n.5, p. 395-400, 2001.

LUNA, J.S. *et al*. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. p. 199 - 206. 2005.

MEYER, B.N. *et al*. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plantconstituents. **Planta medida**, v.45, p.31-34, 1982.

OLIVEIRA, L.G.; GOZZO, A.J.; NUNES, V.A.; SILVA, I.C.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C. A.M.; ARAÚJO, M.S.. Inibidores de proteases encontrados em sementes de *Caesalpinia echinata* (paubrasil) – isolamento e caracterização do inibidor de tripsina. **Rev. Bras. Farmacogn.,** v. 12, supl., p. 72-74, 2002.

PIRES, M.T.C. *et al*. Toxicidade de plantas medicinais na terapêutica infantil. **Revista brasileira de ciências da saúde**, v. 1, n. 1/3, p. 45-52, 1997.

SARMA, G.; DAS, S. Hypoglycemic action of seed kernel of **Caesalpinia bonducella** Fleming in normal and alloxan- induced diabetic albino rats. **The Internet Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 2, 2009.

SELVI, R.S. *et al*. Evaluation of mucilage of *Caesalpinia pulcherrima* as binder for tablets**.** **International Journal of ChemTech Research**, v.2, n.1, p. 436-442, 2010.

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

SIREERATAWONG, S. *et al*. Toxicity Evaluation of Sappan Wood Extract in Rats. **Journal of The Medical Association of Thailand**, v. 93, n.7, 2010.

SOUZA, R.T.D.; AGRIPINO, D.G.; YOUNG, M.C.M. ; MORENO, P.R.H. . Caracterização da Presença de ácido Daniélico em extratos de Pau-brasil com Atividade Fungitóxica. In: SIMPÓSIO PAU-BRASIL: CIÊNCIA E ARTE, 2003, São Paulo. **Resumo**. São Paulo: Fapesp, 2003, p. 29-29.

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

5 Artigo II

Atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae)

SILVA, D.I.S.[1*]; ARAÚJO, R.O[1].; SOLIDONIO, E.G.[1]; SENA, K.X.F.R[1]; SOUZA, I.A.[1]

[1] Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Arthur de Sá, s/n, CEP: 50740-521, Recife-Brasil *daniiss@hotmail.com

RESUMO: O Brasil, pela sua grande biodiversidade, apresenta um enorme potencial no desenvolvimento de novos fármacos, em especial, antibióticos. Pouco se sabe sobre as características farmacológicas das sementes pau-brasil, porém, propriedades antimicrobianas já foram evidenciadas em outras partes da planta. Assim, o nosso objetivo foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico das sementes da *Caesalpinia echinata* Lam. frente a bactérias Gram-positivas, negativas e uma levedura. Micro-organismos foram semeados em tapete em placas de petri contendo meio específico para cada espécie. Sobre as placas semeadas foram colocados discos de papel embebidos com o extrato, com o conjunto incubado por 24 a 48 horas. Após o período de crescimento, foram medidos os halos de inibição. O extrato de C. echinata demonstrou atividade parcial frente a *Staphylococcus aureus*, não havendo inibição em relação aos demais micro-organismos testados.

Palavras-chave: Pau-brasil, *Staphylococcus aureus*, atividade antimicrobiana

ABSTRACT: Evaluation of the antimicrobial activity of crude ethanolic extract of seeds of Caesalpinia echinata Lam (Fabaceae). Brazil, for its great biodiversity, presents a huge potential in developing new drugs, especially antibiotics. Little is known about the pharmacological characteristics of the seeds of Brazil wood, however, antimicrobial properties have been evidenced in other parts of the plant. Thus, the objective was to evaluate the antimicrobial activity of crude ethanol extract of seeds of Caesalpinia echinata Lam against Gram-positive, one negative and yeast. Micro-organisms were sown by exhaustion in petri dishes containing specific medium for each species. Paper discs soaked with the extract are placed on the plates, the whole being incubated for 24-48 hours. After the growth period

were measured the inhibition. The extract of C. echinata showed partial activity against Staphylococcus aureus, no inhibition in relation to other micro-organisms tested.

Key words: Brazil wood, *Staphylococcus aureus*, antimicrobial activity

INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de proporções continentais, seus 8,5 milhões km² ocupam quase a metade da América do Sul, abarcando várias zonas climáticas e seis diferentes biomas. A variedade de biomas reflete a enorme riqueza da flora e da fauna brasileiras: o Brasil abriga a maior biodiversidade do planeta. Esta abundante variedade de vida, traduzida em mais de 20% do número total de espécies da Terra, eleva o Brasil ao posto de principal nação entre os 17 países de maior biodiversidade (MMA, 2011).

Essa enorme potencialidade pode ser aproveitada no desenvolvimento de fármacos, levando-se em consideração que as plantas são uma importante fonte de compostos naturais dotados de atividade biológica, sendo sua contribuição de grande relevância na área farmacêutica pela utilização de suas substâncias ativas como fonte de matérias-primas (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2004).

Há uma contínua necessidade na descoberta de novos antibióticos, especialmente os que atuem por mecanismos de ação diferentes dos encontrados nas drogas disponíveis. Essa busca inevitável deve-se à elevação dos níveis de resistência bacteriana e devido à importância das doenças infecciosas, que representam a segunda maior causa de morte no mundo. Uma vez que a as plantas são dotadas de uma gama de componentes com utilização terapêutica, estas podem ser consideradas como fortes alternativas a estudos nesse sentido (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010; LUZHETSKYY, PELZER, BECHTHOLD, 2007)

O pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), possui porte arbóreo, com registros de até 30 metros de altura e tronco geralmente curto, tortuoso e repleto de espinhos. Suas sementes são orbiculares, de coloração acastanhada, sendo encontradas em frutos do tipo vagem que amadurecem em aproximadamente um mês após a floração (LEWIS, 1998; LIMA, 1992).

Devido a intensa exploração desde a época da colonização e durante muitos anos, a árvore figura hoje na lista de espécies ameaçadas de extinção (BRASIL, 2008). Pouco se sabe sobre as características farmacológicas de suas sementes já que as pesquisas científicas envolvendo essa espécie tratam geralmente de aspectos botânicos e agronômicos devido a sua condição de espécie ameaçada de extinção, embora diversas propriedades medicinais já tenham sido demonstradas em outras partes da planta (ALENCAR *et al*, 2002; ZHAO *et al*, 2006).

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Botânico e Obtenção da matéria prima

As sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. foram coletadas na Reserva Ecológica de Tapacurá, em São Lourenço da Mata, Pernambuco. Foram colhidos os frutos (vagens) diretamente da árvore ainda imaturos, que foram secos ao sol durante 1 a 2 dias para que ocorresse a liberação das sementes. A exsicata da espécie vegetal foi identificada pela botânica Drª. Marlene Barbosa, e depositada no herbário Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco, sob o registro 68.190.

Preparação do Extrato Etanólico Bruto das Sementes

Após limpeza e pesagem, as sementes secas foram trituradas e colocadas em etanol absoluto, onde permaneceram em contato com o solvente por um período de 48 horas à temperatura ambiente, com agitação manual e esporádica, e mantido ao abrigo da luz. O líquido da extração foi filtrado e concentrado à secura em evaporador rotativo acoplado a uma bomba de vácuo sob temperatura constante de 45ºC.

Padronização dos inóculos

A partir das culturas mantidas sob refrigeração, os microrganismos foram semeados em Ágar nutriente ou Sabouraud e incubados a 37ºC por 24 horas para crescimento. Em seguida, colônias foram retiradas e transferidas para tubos com 5 ml de água estéril a fim de formar soluções com turvação correspondente ao tubo 0,5 de turbidez da Escala de

McFarland, que corresponde a aproximadamente 10^7 UFC/ml para fungos e 10^8 UFC/ml para bactérias (CLSI, 2010).

Teste de Difusão em disco de papel

A atividade antimicrobiana do EE das sementes de *C. echinata* foi avaliada pelo método de difusão em disco de papel (BAUER, 1966) frente a bactérias padrão obtidas da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA) (Tabela 1).

Tabela 1 - Micro-organismos utilizados para o ensaio antimicrobiano.

IDENTIFICAÇÃO	MICRO-ORGANISMO	CLASSIFICAÇÃO
UFPEDA 01	*Staphylococcus aureus*	Gram-positivo
UFPEDA 06	*Micrococcus luteus*	Gram-positivo
UFPEDA 16	*Bacillus subtilis*	Gram-positivo
UFPEDA 39	*Pseudomonas aeruginosa*	Gram-negativo
UFPEDA 71	*Mycobacterium smegmatis*	Álcool-ácido-resistente
UFPEDA 138	*Enterococcus faecalis*	Gram-positivo
UFPEDA 224	*Escherichia coli*	Gram-negativo
UFPEDA 398	*Serratia marcescens*	Gram-negativo
UFPEDA 1007	*Candida albicans*	Levedura

UFPEDA (Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco)

As suspensões foram semeadas em tapete, utilizando "swab" estéril embebido com as mesmas, em placa contendo o Ágar Müeller Hinton (*S. aureus, B. subtilis, E. coli, P. aeruginosa e S. marcescens*), glicose extrato de levedura (*E. faecalis e M. smegmatis*) e Sabouraud (*C. albicans*).

Sobre as placas semeadas foram colocados os discos de papel com 6 mm de diâmetro embebidos com 10 µl do extrato em duas concentrações, de forma que a concentração final obtida foi de 2.000 e 4.000 µg/disco. O material foi então incubado a 37ºC. Após 24 a 48 horas de incubação, as placas foram examinadas e os diâmetros das zonas de inibição foram

medidos. Todo o ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos através da média aritmética dos halos de inibição obtidos nas três placas e calculado o desvio padrão. Como controle, foram utilizados discos embebidos com Dimetil Sulfóxido (DMSO) a 100%, solvente utilizado na solubilização do extrato e como padrão, discos contendo os antimicrobianos Gentamicina, Cloranfenicol e Cetoconazol nas concentrações de 10, 50 e 300 µg/disco respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas e direcionadas com o objetivo de descobrir novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos de plantas já que os micro-organismos patogênicos tornam-se cada vez mais resistentes às drogas já conhecidas (DUARTE, 2006; OSTROSKY *et al*, 2008)

O extrato etanólico bruto das sementes de *C. echinata* Lam. apresentou atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01) com halos que variaram entre 10 e 11mm. Não foram observados halos de inibição de crescimento nos outros micro-organismos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto das sementes de C. frente aos micro-organismos testados.

MICRO-ORGANISMOS	EXTRATO DE *C. echinata*		DMSO	GEN	CLO	CTZ
	2000µg/ml	4000µg/ml				
UFPEDA 01	10 ± 0,6	11 ± 0,6	-	28 ± 1,0	36 ± 1,0	-
UFPEDA 06	-	-	-	37 ± 1,0	45 ± 0,6	-
UFPEDA 16	-	-	-	26 ± 0,6	35 ± 1,0	-
UFPEDA 39	-	-	-	26 ± 0,6	24 ± 0,6	-
UFPEDA 71	-	-	-	36 ± 0,6	21 ± 0,6	-
UFPEDA 138	-	-	-	14 ± 0,6	11 ± 0,6	-
UFPEDA 224	-	-	-	25 ± 1,0	32 ± 0,6	-
UFPEDA 398	-	-	-	25 ± 0,6	28 ± 0,6	-
UFPEDA 1007	-	-	-	-	-	44 ± 1,0

Média dos halos de inibição em milímetros. Os traços (-) indicam ausência de halo de inibição. UFPEDA (Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco). DMSO (dimetilsulfóxido). GEN (Gentamicina). CLO (Cloranfenicol). CTZ (Cetoconazol).

São raros os registros de trabalhos que avaliem atividade biológica e em especial o potencial antimicrobiano dessa planta e, devido à variedade de métodos para esse estudo, a comparação de dados acaba sendo dificultada (NASCIMENTO *et al*, 2007).

O gênero *Caesalpinia* possui comprovada atividade antibacteriana e antifúngica de algumas espécies, inclusive em sementes (AQIL; AHMAD, 2003; CRUZ *et al*., 2007; SAEED; SABIR, 2002; SUDHAKAR *et al*., 2006; WOLDEMICHAEL *et al*, 2003). Em contrapartida, a atividade antimicrobiana não foi tão expressiva no presente estudo e na maior parte dos ensaios utilizando a espécie *Caesalpinia echinata* Lam.

De acordo com Alves e colaboradores (2000), cujo trabalho apresentou uma classificação de atividade de acordo com o diâmetro dos halos de inibição, o extrato avaliado no presente estudo pode ser considerado parcialmente ativo (entre 9 e 12 mm).

O ensaio demonstrou que, através da metodologia de difusão em disco de papel, o extrato analisado possui pouca atividade contra os micro-organismos testados, resultado semelhante ao encontrado por Bastos (2011) em estudo utilizando as flores da *Caesalpinia echinata* Lam. também pela mesma técnica. Foi evidenciado, porém, no mesmo trabalho, um grande aumento na resposta antimicrobiana na realização do ensaio pela técnica de difusão em ágar.

Silva *et al*. (2006), em trabalho que utilizou cerne da mesma planta verificaram que não houve atividade antimicrobiana contra nenhuma das cepas testadas, Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, tal resultado assemelha-se ao demosntrado nesse estudo, excetuando-se o *Staphylococcus aureus*.

Pode-se concluir, portanto, através desse screening, que o extrato etanólico das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. possui atividade parcial frente *Staphylococcus aureus*, o que sugere um estudo mais aprofundado utilizando outras cepas dessa espécie e que não houve inibição em relação aos outros micro-organismos testados.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, V.B.M. *et al*. Pro-inflammatory effect of galactose binding lectin isolated from Caesalpinia echinata Lam. seeds. In: BOO-HANSEN, T.C., (Eds). **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Lemchesvej (DK): TEXTOP Publisher, 2002. 714 p.

ALVES, T. M. A. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

AQIL, F.; AHMAD, I. Broad-spectrum antibacterial and antifungal properties of certain traditionally used Indian medicinal plants. **World J Microb Biot**, v.19, p.653-657, 2003.

BASTOS, I. V. G. A.. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE Caesalpinia echinata Lam. (FLORES).** 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciencias Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. N.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº. 06, de 23 de setembro de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de setembro de 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twentieth informational supplement,** document M100-S20. Wayne, PA, USA: CLSI, 2010.

CRUZ, M. C. S.; SANTOS, P.O.; BARBOSA, J. A. M.; MELO, D.L.F.M.; ALVIAONO, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; ALVIANO, D.S.; TRINDADE, R.C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **J Ethnopharmacol**, v. 111 p.409-412, 2007.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais**, n. 07, 2006.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

LEWIS, G.P. **Caesalpinia: a revision of the Poincianella-Erythrostemon group**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1998.

LIMA, H.C. Aspectos botânicos do pau-brasil. In: CUNHA, M.W.; LIMA, H.C. (Eds.). **Viagem à terra do pau-brasil**. Rio de Janeiro: Agência Brasileira de Cultura, 1992. p.23-38.

LUZHETSKYY, A.; PELZER, S.; BECHTHOLD, A. The future of natural products as a source of new antibiotics. **Curr Opin Investig Drugs**. v.8, n.8, p.608-13, 2007.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Quarto relatório nacional para a convenção sobre diversidade biológica: Brasil**. Brasília: MMA, 2011. 248 p.

MOSCA, V. P.; LOIOLA, M. I. B. USO POPULAR DE PLANTAS MEDICINAIS NO RIO GRANDE DO NORTE, NORDESTE DO BRASIL**. Revista Caatinga**, Mossoró, v.22, n.4, p.225-234, out.-dez. 2009.

NASCIMENTO, P. F. C. I; NASCIMENTO, A. C. I; RODRIGUES, C. S. I; ANTONIOLLI, Â. R.; SANTOS, P. O.; JÚNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev. bras. farmacogn**. v.17 n.1, 2007.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais, Rev. bras. farmacogn. v.18 n.2, 2008.

SAEED M.A., SABIR A.W. Antibacterial activity of Caesalpinia bonducella seeds. **Fitoterapia**, v.72, n.7, p.807-809, 2002.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R.. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. 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**. 5ª Edição. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

SILVA, E. C. B. ; OLIVEIRA, T. L. ; LIMA, E. O. ; SOUZA, I. A. . Atividade antimicrobiana do extrato bruto da Caesalpinia echinata Lam.. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, João Pessoa-PB, v. 3, 2006.

SUDHAKAR, M.; RAO, C. V.; RAO, P.M.; RAJU, D. B.; VENKATESWARLU, Y. Antimicrobial activity of Caesalpinia pulcherrima, Euphorbia hirta and Asystasia gangeticum**.** **Fitoterapia**, 77:378-380, 2006.

ZHAO, Y. N.; PAN, Y.; TAO, J. L.; XING, D. M.; DU, L. J. Study on Cardioactive Effects of Brazilein. **Pharmacology**, v. 76, 76-83, 2006.

WOLDEMICHAEL G.M., SINGH M.P., MAIESE W.M., TIMMERMANN B.N. Constituents of antibacterial extracts of Caesalpinia paraguaiensis Burk. **Z aturforsch**., v.58, n.1-2, p.70-75, 2003.

XU, H.X.; LEE, S.F. The antibacterial principle of *Caesalpinia sappan*. **Phytother Res**, v.18, p.647– 51, 2004.

6 Artigo III

Estudo da propriedade antineoplásica do extrato etanólico das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam.

SILVA, D.I.S.[1]; CAVALCANTI, K.P.S[2]; SILVA, E.C.B[1]; OLIVEIRA, M.V.G. [1]; SOUZA, I.A. [1]

[1] Departamento de Antibióticos [2] Hospital das Clínicas
Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901

RESUMO: Ao longo das ultimas décadas as neoplasias vem crescendo consideravelmente e dentre os tratamento disponíveis, a quimioterapia é um dos mais utilizados, porém, apresenta inúmeros efeitos colaterais e nem sempre é eficaz. Daí, surge a importância do desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos, tendo as plantas como potenciais fontes para a origem de compostos efetivos e com menos danos ao paciente. Assim, o objetivo do presente ensaio foi avaliar a atividade antineoplásica do extrato bruto etanólico das sementes da *Caesalpinia echinata* Lam. em modelos animais, utilizando Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich como linhagens tumorais. O tratamento foi realizado por via intraperitoneal durante 7 dias e ao final os animais foram sacrificados, os tumores pesados e os percentuais de inibição calculados. Os testes demonstraram que o extrato possui atividade antitumoral frente às duas linhagens estudadas, em especial o carcinoma.

Palavras-chave: Câncer, pau-brasil, antitumoral, sarcoma 180, Carcinoma de Ehrlich

ABSTRACT: Study of the anticancer property of ethanolic extract of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. Over the last decades, the cancer has grown considerably and among the available treatment, chemotherapy is one of the most used, however, has numerous side effects and is not always effective. Hence comes the importance of developing new anticancer drugs, and plants as potential candidates for lead compounds effective and with less damage to the patient. The objective of this test was to evaluate the antineoplastic activity of crude ethanol extract of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. in animal models, using Sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma as tumor cell lines. Treatment was administered intraperitoneally for 7 days and at the end the animals were sacrificed, the tumors weighed

and the percentage inhibition calculated. The tests showed that the extract has antitumor activity against the two strains studied, especially carcinoma.

Key words: Cancer, Brazil wood, anti-tumor, sarcoma 180, Ehrlich carcinoma

INTRODUÇÃO

No Brasil, a mortalidade por neoplasias vem crescendo consideravelmente ao longo das últimas décadas, ao passo que as mortes por doenças infecto parasitárias foram reduzidas. As neoplasias (tumores) são hoje a segunda causa de óbito na população, o que representa mais de 14,6% do total de mortes ocorridas no país (BRASIL, 2011).

O estilo de vida do homem moderno o expõe a muitos fatores de risco que predispõem ao câncer, como o fumo, a exposição prolongada ao sol, consumo de bebida em altas doses e um contato prolongado com produtos químicos potencialmente carcinogênicos ou vírus (PIVETA, 2004).

Os três tratamentos classicamente adotados contra o câncer são a quimioterapia, radioterapia e a cirurgia. Embora existam diversas classes de compostos químicos antineoplásicos disponíveis, os tratamentos ainda apresentam inúmeros efeitos colaterais, além de uma perspectiva de cura nem sempre eficaz (MACHADO, 2000).

Compostos naturais possuem diversas e complexas estruturas moleculares em comparação às pequenas moléculas sintéticas. Alguns produtos vegetais têm sido usados para o tratamento do câncer e diversos compostos herbais têm se mostrado muito promissores como agentes antitumorais, apresentando efeitos colaterais reduzidos (DESAI *et al*, 2008; GONZALES; VALERIO, 2006; MORAES, ALONSO, OLIVEIRA-FILHO, 2011)

Com base no vasto conhecimento popular já existente para o uso de muitas plantas medicinais, estima-se que os custos para o desenvolvimento de um fito medicamento não devem ultrapassar 2 a 3 % daquele previsto para o desenvolvimento de um novo medicamento sintético (CALIXTO, 2003).

Caesalpinia echinata Lam., popularmente conhecida como pau-brasil ou pernambuco, pertence à família *leguminosae/Fabaceae*, sub-família *Caesalpinoidae*, sendo considerada de valor histórico e econômico. A cor vermelha do seu caule, que remete a madeira queimando (brasa), é a origem do nome Brasil (CRUZ-SILVA *et al*, 2004; LEWIS, 1998).

Embora poucos registros tenham sido encontrados sobre a avaliação biológica das sementes, já foi evidenciada a presença de compostos que estão diretamente ligados ao desenvolvimento do câncer e a invasão tumoral (DECLERCK; IMREN, 1994; OLIVEIRA *et al*, 2002).

Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar a atividade antineoplásica do extrato bruto etanólico das sementes da *Caesalpinia echinata* Lam. em modelos animais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Botânico e Obtenção da matéria prima

O material botânico foi coletado na Reserva Ecológica de Tapacurá localizada no município de São Lourenço da Mata, Pernambuco. Foram colhidos os frutos (vagens) diretamente da árvore ainda imaturos, que foram secos ao sol durante 1 a 2 dias para que ocorresse a liberação das sementes. A exsicata da espécie vegetal foi identificada pela botânica Drª. Marlene Barbosa, e depositada no herbário Geraldo Mariz da Universidade Federal de Pernambuco, sob o número 68.190.

Preparação do Extrato Etanólico Bruto das Sementes

Após limpeza e pesagem, as sementes secas foram trituradas e colocadas em etanol absoluto permanecendo em contato com o solvente por um período de 48 horas à temperatura ambiente, sendo o conjunto agitado manualmente, esporadicamente, e mantido ao abrigo da luz. O líquido da extração foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo acoplado a uma bomba de vácuo sob temperatura constante de 45ºC até a remoção completa do solvente.

Animais

Para a investigação da atividade antitumoral foram utilizados camundongos albinos Swiss fêmeas (Mus musculus), adultos, com peso entre 25 e 35g, divididos em grupos de seis. Os animais foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro) e temperatura (25 ± 2°C), em gaiolas de polipropileno, recebendo alimentação específica e água ad libidum. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE, processo n° 23076.051710/2011 e os ensaios foram realizados no Laboratório de Cancerologia Experimental da mesma Universidade.

Implante dos tumores e tratamento

Nos experimentos foram utilizadas duas linhagens de células tumorais: Sarcoma 180 (forma sólida) e Carcinoma de Ehrlich (forma sólida). Para o transplante dos tumores foi retirada a massa tumoral de um animal doador. Essa massa foi fragmentada eliminando partes do tecido que estejam necrosadas e as regiões do tumor que apresentarem uma alta concentração de células em crescimento foram separadas e colocadas em solução antibiótica. Um fragmento desta amostra medindo cerca de 3mm de diâmetro foi introduzido subcutaneamente na região axilar do animal receptor (STOCK *et al*., 1955; KOMIYAMA; FUNAYAMA, 1992).

Os animais transplantados foram divididos em seis grupos para cada linhagem, sendo um controle, um padrão e quatro tratados. Ao grupo controle foi administrado o veículo empregado na diluição do extrato, enquanto o grupo padrão recebeu o metotrexato, fármaco de referência para o tratamento de ambas as linhagens tumorais Ao grupo tratado foi administrado o extrato das sementes de Caesalpinia echinata Lam. nas doses de 112,5, 225, 300 e 450 mg/kg de peso dos animais. A quimioterapia experimental teve início 48 horas após o transplante dos tumores e ocorreu durante os 7 dias subsequentes. Após o término do tratamento todos os animais foram pesados e sacrificados por deslocamento cervical e os tumores foram retirados, dissecados e pesados.

A inibição tumoral foi calculada segundo a fórmula: TWI% = C – T x 100/C, onde TWI% = % de inibição tumoral, C = média dos pesos dos tumores dos animais do grupo controle e T = média dos pesos dos tumores dos animais do grupo teste.

Os ensaios foram realizados conforme a metodologia descrita por Geran *et al*. (1972).

Análise estatística

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (epm). Os dados foram analisadas através da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste t de Student. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato etanólico bruto das sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. administrado por via intraperitoneal foi capaz de inibir significativamente o desenvolvimento do tumor sólido de Carcinoma de Ehrlich em camundongos fêmeas, apresentando inibições de 78,77%, 64,02% e 73,80% nas doses de 225, 300 e 450 mg/Kg respectivamente. A dose de 112,5 mg/Kg promoveu uma estimulação no crescimento do tumor, enquanto o fármaco padrão reduziu em 50,23% o crescimento tumoral.

Quanto ao sarcoma 180, o tratamento com o EE das sementes da C. echinata por via intraperitoneal em camundongos fêmeas apresentou a menor dose (112,5 mg/Kg) como a mais efetiva, com uma inibição de 55,97%. As demais doses demonstraram redução de 39,49% (225 mg/Kg), 33,31% (300 mg/Kg) e 32,67% (450 mg/Kg) no crescimento tumoral.

O fármaco padrão utilizado para este tumor, metotrexato, atingiu índices de inibição na ordem de 55,77% .

Como demonstrado nos resultados, o EE apresentou menor atividade quando utilizado no tratamento de Sarcoma 180, uma linhagem tumoral de crescimento rápido e consistente, amplamente empregado em testes para avaliação de agentes químicos (Levi-Montalcini, 1986).

A atuação do extrato contra a linhagem carcinomatosa mostrou-se bastante ativa. O Carcinoma de Ehrlich é considerado, segundo a literatura, um tumor de crescimento rápido e comportamento agressivo (Ajith; Janardhanan, 2003, Kaneno, 2004).

Silva (2006), em pesquisa utilizando cerne de *C. echinata* observou que o efeito do respectivo extrato em fêmeas se deu de forma dose-dependente, sendo mais eficaz nas maiores doses. Esse resultado difere do encontrado no presente estudo já que as melhores taxas de inibição foram obtidas na menor dose para sarcoma e na segunda menor para carcinoma.

Ainda segundo o mesmo autor, a *Caesapinia echinata* apresenta atividade frente a tumores sólidos de Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180 pela via intraperitoneal, sendo mais efetivo contra o primeiro, resposta também encontrada no presenta estudo.

Bastos (2011), em estudo avaliando a propriedade antitumoral em extrato de flores por via intraperitoneal, também evidenciou atividade para Carcinoma de Ehrlich, assim como o presente estudo, porém, o extrato não apresentou eficácia em relação ao Sarcoma 180, o que os diferencia.

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

Foi observado ainda um aumento no crescimento tumoral do Carcinoma de Ehrlich no grupo tratado com a menor dose em relação ao controle, sugestivo da existência de substâncias indutoras. Ming (1999) relatou a presença de determinadas substâncias em plantas, com potencial indutor de mitoses, sendo, portanto, estimulantes da divisão celular

REFERÊNCIAS

AJITH TA, JANARDHANAN KK 2003. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, hellinusrimosus (Berk) Pilat. **Journal of Ethnopharmacology**, 84: 157-162.

BASTOS, I. V. G. A.. **Avaliação da atividade farmacológica de Caesalpinia echinata Lam. (FLORES)**. 2011. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciencias Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2011

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 03, p. 37-39, 2003.

CRUZ-SILVA, I.; GOZZO, A. J.; NUNES, V. A.; CARMONA, A. K.; FALJONI-ALARIO, A.; OLIVA, MARIA LUIZA VILELA 1; SAMPAIO, MISAKO U.; SAMPAIO CLAUDIO A.; ARAUJO M. S. Inibidor de proteinase das sementes de Caesalpinia echinata (pau-brasil) para calicreína plasmática, plasmina e fator Xlla**. Biological Chemistry**; v. 385, n. 11, p. 1083-1086, Nov. 2004.

DECLERCK, Y. A.; IMREN, S. Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. **Eur J Cancer**, 30A(14), 1994.

DESAI, A. G. *et al*. Medicinal plants and cancer chemoprevention. **Curr Drug Metab**., v. 9, n.7, p. 581-91, 2008.

GERAN, R. I.; SCHMCH, A. M.; ABBOT, B. J.; GREENBERG, N. H.; MACDONALD, M. M. Protocols for screening chemical agents and natural-products against animal tumors and other biological systems. **Cancer Chemotherapy Reports,** v. 2, n. 3, 1972.

GONZALES, G.F.; VALERIO, L.G. Medicinal Plants from Peru: A Review of Plants as Potential Agents Against Cancer. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 429-444, 2006.

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

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

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

LEVI-MONTALCINI, R. **The Nerve Growth Factor: Thirty-Five Years Later**. Nobel lecture, p.349-369. 1986. http://nobelprize.org/medicine/laureates/1986/levi-montalcini-lecture.html, acesso em fevereiro de 2012.

LEWIS, G.P. **Caesalpinia: a revision of the Poincianella-Erythrostemon group**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1998.

MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v.23, n.2, p. 237-243, 2000.

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

OLIVEIRA, L. G.; GOZZO, A. J.; NUNES, V. A.; SILVA, I. C.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. M.; ARAÚJO, M. S. Inibidores de proteases encontrados em sementes de *Caesalpinia echinata* (paubrasil) – isolamento e caracterização do inibidor de tripsina. **Rev. Bras. Farmacogn.,** v. 12, supl., p. 72-74, 2002.

PIVETTA M. Câncer, esperanças divididas. **Revista FAPESP**, v. 99, p. 46-48, 2004.

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

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

7 Conclusões

Diante dos resultados obtidos concluímos que:

- ✓ De acordo com a avaliação toxicológica realizada, podemos concluir que o extrato das sementes de Caesalpinia echinata Lam. apresenta baixa toxicidade quando administrado de forma aguda em camundongos por via intraperitoneal.
- ✓ O vegetal apresenta-se pouco tóxico ou atóxico frente a *Artemia Salina*.
- ✓ O screening antimicrobiano demonstrou que a planta possui atividade antimicrobiana parcial em *Staphylococcus aureus* pelo método de difusão em disco.
- ✓ Quanto à capacidade de inibir o desenvolvimento tumoral, o extrato mostrou-se eficaz contra Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich, sendo mais ativo contra a linhagem carcinomatosa.
- ✓ Sua inibição tumoral não acontece de forma dose-dependente.

8 Referências

AGUIAR, E. **Medicina: uma viagem ao longo do tempo**. 2010. Disponível em: < http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/ea000722.pdf.> Acesso em 09/11/2011.

AGUIAR, F. F. A.; PINHO, R. R. **Pau-brasil: Caesalpinia echinata Lam., árvore nacional**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2007.

AGUIAR, F.F.A.; PINHO, R.A. **Pau-Brasil**: *Caesalpinia echinata* Lam. 2. ed. São Paulo: Instituto Botânico, 1996. (Folheto, 18).

ALENCAR, V.B.M.; MELO, S.C.; ALBUQUERQUE, K.F.; FIGUEIREDO, I.S.T.; TUPINAMBÁ, D.D.; FREITAS, B.T.; ALENCAR, N.M.N.; SAMPAIO, A.H.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. Pro-inflammatory effect of galactose binding lectin isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. seeds. **In**: BOO-HANSEN, T.C., (Eds). *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Lemchesvej (DK): TEXTOP Publisher, 2002. 714 p.

ALMEIDA, M. R.; PINTO, A. C. Uma breve história da química Brasileira. **Cienc. Cult.**, v.63, n.1, 2011.

ANG, J.Y.; EZIKE, E.; ASMAR, B. I. Antibacterial resistance. **The Indian Journal of Pediatrics**, v.71, n.3, p. 229-239, 2004.

ANGYALOSSY, V.; AMANO, E.; ALVES, E. S. Anatomical features of woods used in the manufacture of bows for stringed instruments. **Acta Bot. Bras**. vol.19 no.4 São Paulo, 2005.

AMOROZO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do leverger, MT, BRASIL. **Acta Bot. Bras**., v.16, n.2, 2002.

APUNTE, J. R. C. **Diagnostico y Caracterización Botánica de Plantas Medicinales en la Zona Agroecológica de Río Verde, Cantón Echeandía, Provincia Bolívar**. 111 p. Monografia (Engenharia Agroflorestal) - Universidad Estatal de Bolívar, Guaranda, Equador, 2008.

ASSIS, C. Plantas medicinais na odontologia**. Rev. Bras. Odontol**, v. 66, n. 1, 2009.

BADKE, M. R,; BUDÓ, M. L. D.; SILVA, F. M.; RESSEL, L. B. Plantas medicinais na prática do cotidiano popular. **Esc Anna Nery (impr.)**, v. 15, n. 1, 2011.

BAE, I.; MIN, H.; HAN, A.; SEO, E.; LE, S. K. Suppression of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase by brazilin in RAW 264.7 macrophage cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 513, n.3, p.237–242, 2005.

BAIRD-PARKER, A. C. The staphylococci: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, 1990.

BARROS, S. B. M. B.; DAVINO, S. Avaliação da Toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASSO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F. & LIMA, H.C. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. v.2. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991.

BASTOS, I. V. G. A.. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE** *Caesalpinia echinata* **Lam. (FLORES).** 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciencias Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

BATISTA, I. F. C.; ARAÚJO, M. S.; SAMPAIO, M. U.; RICHARDSON, M.; FRITZ, H.; SAMPAIO, C. A. M.. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. Action on blood clotting phase enzymes. **Phytochemistry**, v. 41, p. 1017-1022, 1996.

BELLO, C. M.; MONTANHA, J. A.; SCHENKEL, E. P. Análise das bulas de medicamentos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p.75-83, 2002.

BENDAZOLLI, W. S. Fitomedicamentos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica. **Mundo da Saúde**, v. 24, p. 123-126, 2000.

BENINI, E. B. *et al*.. Valorização da flora nativa quanto ao potencial fitoterápico. **Revista destaques acadêmicos**, ano 2, n. 3, 2010.

BRAGA, C. M.. **Histórico da Utilização de Plantas Medicinais**. 24 p. Monografia (Licenciatura em Biologia) – Universidade de Brasília e Universidade Federal de Goiás, Brasília, 2011.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVIS, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, v.33, n.06, 2010.

BRASIL. Leis e Decretos . Lei 6.607. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 de dezembro, 1978.

BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 971 DE 3 DE MAIO DE 2006. **Diário Oficial da União**; Poder executivo, Brasília, DF, 4 de maio de 2006. Seção 1, p. 20-5, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2011a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2011b.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº. 06, de 23 de setembro de 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 de setembro de 2008.

BRASIL. Presidência da República. Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. Seção1, p 2. 2006b.

BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D.; SMITH, N. R. **Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology**. 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Md., 1994.

CABRERA, C. E.; GÓMEZ, R. F.; ZÚÑIGA, A. E. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. **Colombia Médica**, v.38, n.2, 2007.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 03, p. 37-39, 2003.

CALIXTO, J. *B.* Efficacy, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARVALHO, A. C. B.; SILVEIRA, D.. Drogas vegetais: uma antiga nova forma de utilização de plantas medicinais. **Brasília Medica**, v. 47, n. 2, 2010.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 637 p. (Coleção espécies arbóreas brasileiras, v. 1).

CORRÊA, A. M. S. Morfologia polínica de *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae). **Revista Brasil. Bot**., v. 26, n. 3, p. 355-359, 2003.

CORREA, M. P.; PENNA, L. A. **Dicionario das plantas uteis do Brasil e das exoticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal: Ministério da Agricultura, 6v, 1984.

COSTA, T.; OLIVEIRA, L. Para salvar o pau-brasil. **Globo Ciências**, São Paulo, dezembro, 1996.

CRUZ-SILVA, I.; GOZZO, A. J.; NUNES, V. A.; CARMONA, A. K.; FALJONI-ALARIO, A.; OLIVA, MARIA LUIZA VILELA 1; SAMPAIO, MISAKO U.; SAMPAIO CLAUDIO A.; ARAUJO M. S. Inibidor de proteinase das sementes de Caesalpinia echinata (pau-brasil) para calicreína plasmática, plasmina e fator Xlla**. Biological Chemistry**; v. 385, n. 11, p. 1083-1086, Nov. 2004.

CUNHA, A. P. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. 3ª Edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2008.

DAGLI, M.L.Z. **Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: estudo esperimental**. 1989. 148f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo.

DECLERCK, Y. A.; IMREN, S. Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. **Eur J Cancer**, 30A(14), 1994.

DIAS, J. P. S. **A farmácia e a História**. Gabinete de Estudos Históricos e Sociais da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2005.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: verdades e mentiras que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber**. São Paulo: Editora UNESP, 2007.

EGGERS, S. A história do câncer em direção à cura. **Revista Hands**, v. 2, n.10, 2002.

EHRLICH, P. Experimentelle carcinomstudien an Mäusen. **Arb. Inst. Exp. Ther. Frankfurt**, v.1, p. 78-80, 1906.

FARNSWORTH, N.R. Screening plants for new medicines. *In*: WILSON, E.O. (ed) **Biodiversity** .Washington DC: Nac. Acad. Press, 521p. 1988.

FAUSTO, B. **História do Brasil**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002. 657p.

FELDMANN, G.; SCHMITT, A. Um modelo matemático para estudo de estratégias de tratamento de tumores através de imunoterapia. **Synergismus scyentifica UTFPR**, v. 4, n. 2, 2009.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

FREIRE, M. F. I. Plantas medicinais: a importância do saber cultivar. **Revista Científica Eletrônica Agronomia**. Ano 3, n. 5, 2004.

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

FUKUMASU, H.; LATORRE, A. O.; BRACCI, N.; GÓRNIAK, S. L.; DAGLI, M. L. Z.. Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer. **Revista Brasileira de Toxicologia**, 21, n.2, 2008.

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

GALLO, M.A. History and scope of toxicology. In: Klassen, C.D. **Casarett e Douls's toxicology: The Basic Science of Poisons**. 6ª ed., New York: Mc Graw-Hill, 2001.

GARCIA, I. S.; SOUZA, A.; BARBEDO, C. J.; DIETRICH, S. M. C.; FIGUEIREDO, R. C. L. Changes in solubre carbohydrates during storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest**. J. Biol**. 66, 2006.

GOMES, M. C. O. Remédios caseiros ou naturais. **Rev. Fac. Ciênc. Méd**. Sorocaba, v. 13, n. 3, p. 31-32, 2011.

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

GUEMBAROVSKI, R. L.; CÓLUS, I. M. S. Câncer: uma doença genética. **Genética na Escola**, n.3, v.1, 2008.

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

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 3, 667-679, 2010.

GÜNTHER, A. *et al.* Differential Expression of Intermediate-Filament Proteins in Murine Sarcoma 180 Ascites or Solid Tumor. **Cancer Res**, v. 44, p. 2590-2594, 1984.

HANN, B.; BALMAIN, A. Building validated mouse models of human cancer. **Curr Opin Biol**, v.13, n.6, 2001.

HERNÁNDEZ-PEREZ, E.; HERNÁNDEZ-PEREZ, J. E.; HERNÁNDEZ-PEREZ, M.. Peelings de cara y cuerpo: el golden peel, sus modificaciones e indicaciones. **Dermatologia Ibero-Americana Online**, Dezembro, 2010.

HODGSON, E. Introduction to toxicology. In: Hodgson, E. **Modern toxicology**. 3ª ed., John Wiley & Sons. 2004.

HOMMA, A. K. O. Biopirataria na Amazônia: como reduzir os riscos? **Amazônia: Ci. & Desenv**., v.1, n.1, 2005.

HOSSNE, R. S. Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho. Implantação do modelo no Brasil. **Acta Cir. Bras.,.** v. 17, n.4, 2002.

JANSSEN, B. J. A.; SMITS, J. F. M.. Autonomic control of blood pressure in mice: basic physiology and effects of genetics modification. **Am. J. Regul. Integr. Comp. Physiol**., 282, 2002.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 12ª Ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. Porto Alegre.: Artmed, 2009.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5ª Edição, Rio de Janeiro: Ed. Médica e Científica LTDA, 2001.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P. **Plantas Medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular**. Belém: Embrapa Amazonia Oriental, 2008.

LANGMAN, L.J., KAPUR, B.M. Toxicology: Then and now. **Clinical Biochemistry**, v.39, p. 498-510. 2006.

LA RESISTENCIA a antimicrobianos en las Américas. **Rev Panam Salud Publica**, v. 6, n. 6, p. 437-439, 1999.

LAZA, D. L.; RODRIGUEZ, I. L.; SARDINA, G. C. Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales. **Rev Cubana Plant Med**, v. 8, n. 3, 2003.

LENCASTRE, H.; OLIVEIRA, D.; TOMASZ, A. Antibiotic resistant Staphylococcus aureus: a paradigm of adaptive Power. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, p. 428–435, 2007.

LEWIS, G.P. **Caesalpinia: a revision of the Poincianella-Erythrostemon group**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1998.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.A.; LOCK, J.M. **Legumes of the World**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005.

LIETAVA, J. Medicinal plants in a Middle Paleolithic grave Shanidar IV? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, n. 3, 1992

LIMA, H.C. Aspectos botânicos do pau-brasil. In: CUNHA, M.W.; LIMA, H.C. (Eds.). **Viagem à terra do pau-brasil**. Rio de Janeiro: Agência Brasileira de Cultura, 1992. p.23-38.

LIMA, H.C.. **Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica: uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similiaridades florísticas em remanescentes florestais do Estado do Rio de Janeiro.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

LIU, G.; ROBINS, H. I.. A História Natural e a Biologia do Câncer. In: POLLOCK, R. E.; DOROSHOW, J. H.; KHAYAT, D.; NAKAO, A.; O´SULLIVAN, B.. **Manual de Oncologia Clínica da UICC**. 8ª Ed. Sao Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 2006.

LOGARTO, A. P. *et al*. Comparative study of the assay of Artemia salina L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant xtracts. **Phytomedicine**, v.8, i.5, p.395-40, 2001.

LOPES, W. B *et al*. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Horizonte Científico**. 2002.

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

MACIEL et al. Plantas Medicinais: a Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Quim. Nova**, Vol. 25, No. 3, 429-438, 2002.

MAINIERI, C. **Estudo macro e microscópico de madeiras conhecidas por pau-brasil**. São Paulo: IPT, Publicação 612, 1960.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais do cultivo a terapêutica**. 6ª ed. Petrópolis: Vozes, 2003.

MATOS, F. J. Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 2 ed. Fortaleza, **EUFC**. 180 p, 1994.

MCCLEDON, J. F. The History of Chinese Medicine. **Science**, v. 79, n. 2057, 1934.

MELO, J. S.; MELO, M. J.; CLARO, A. As Moléculas da cor na Arte e na Natureza. **Química**, 101, Abr-Jun, 2006.

MELO, S. C. O.; GAIOTTO, F. A.; CUPERTINO, F. B.; CORRÊA, R. X.; REIS, A. M. M.; GRATTAPAGLIA, D.; BRONDANI, R. P. V. Microsatellite markers for *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), a tree that named a country. **Conservation Genetics**, v. 8, n. 6, 2007.

MILLS, G. B.; RIEGER, P. T. Predisposição genética ao câncer. In: POLLOCK, R. E.; DOROSHOW, J. H.; KHAYAT, D.; NAKAO, A.; O´SULLIVAN, B.. **Manual de Oncologia Clínica da UICC**. 8ª Ed. Sao Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 2006

MOON, C.; LEE, S. H.; LEE, M. O.; KIM, S. G. Effects of brazilin on glucose oxidation, lipogenesis and therein involved enzymes in adipose tissues from diabetic KK-mice. **Life Sciences**, Volume 53, Issue 16, Pages 1291–1297, 1993.

MORAES, M.; COSTA, A. L. L. Terapia fotodinâmica em desordens potencialmente malignas e no câncer oral. **Brasília Med**, 48(3), 2011.

MOSCA, V. P.; LOIOLA, M. I. B. USO POPULAR DE PLANTAS MEDICINAIS NO RIO GRANDE DO NORTE, NORDESTE DO BRASIL. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.22, n.4, p.225-234, out.-dez. 2009.

MURALT, M. V. A árvore que se tornou país. **Rev. USP**, n.71, 2006.

NETO, P. A. S. P.; CAETANO, L. C. **Plantas Medicinais: do popular ao científico**. Maceió: EDUFAL, 2005.

NEWMAN, D. J.; GORDON, M. C.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Reports**, v. 17, p. 215-234, 2000.

NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Rev. Virtual Quim**., v. 1, n. 3, 2009.

NOVAIS, T. S.; COSTA J. FO.; DAVID J. P. L.; DAVID J. M.; QUEIROZ L. P.; FRANÇA F.; GIULIETTI A. M.; SOARES, M. *B.* P.; SANTOS R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognia**, v. 13, p. 5-8, 2003.

OGA, S.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Introdução à Toxicologia. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O.. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OLIVA, M. L. V.; SOUZA-PINTO, J. C.; BATISTA, I. F. C.; ARAÚJO, M. S.; SILVEIRA, V. F.; AUERSWALD, E. A.; MENTELE, R.; ECKERSKORN, C.; SAMPAIO, U. M.; SAMPAIO, C. A. M. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 64-74, 2000.

OLIVEIRA, L. F. C.; EDWARDS, H. G. M.; VELOZO, E. S.; NESBITT, M. Vibrational spectroscopy study of brazilin and brazilein, the main constituents of brazilwood from Brazil. **Vibrational spectroscopy**, v. 28, 2002.

OLIVEIRA, L. G.; GOZZO, A. J.; NUNES, V. A.; SILVA, I. C.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. M.; ARAÚJO, M. S. Inibidores de proteases encontrados em sementes de *Caesalpinia echinata* (paubrasil) – isolamento e caracterização do inibidor de tripsina. **Rev. Bras. Farmacogn.,** v. 12, supl., p. 72-74, 2002.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Rev Saúde Pública**, v. 8, n.2, 2004.

PERERA, F. P. Molecular epidemiology: Insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 8, p.496-509, 1996.

PINTO, A. C. O Pau-brasil e um pouco da história brasileira. 1999. Disponível em: < http://www.sbq.org.br/filiais/adm/Upload/subconteudo/pdf/Historias_Interessantes_de_Produtos_Naturais07.pdf> Acesso: 01 de Fevereiro de 2012.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Quim. Nova**, Vol. 25, Supl. 1, 45-61, 2002.

QI, L.; XU, Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. **Bioorganic Med. Chem. Letters**. v. 16, n. 16, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001.

REZENDE, C. M.; CORRÊA, V. F. S.; COSTA, A. V. M.; CASTRO, B. C. S.; ALVES, R. J. V. Constituintes químicos voláteis das flores e folhas do pau-brasil (*Caesalpinia echinata*, Lam.). **Quím. Nova** , v. 27, n. 3, 2004.

RIBEIRO, A. V. F. N. *et al.* Substâncias ativadas pela luz: potentes armas na batalha contra o câncer**. Interscienceplace**, 2ed, 2009.

RIBEIRO, R. C. F. *et al*. **Pau-brasil da semente à madeira: conhecer para conservar**. São Paulo: Instittuto de Botanica, 184p, 2008.

RIZZINI, C.T. Plantas do Brasil – **Árvores e Madeiras Úteis do Brasil** – Manual de Dendrologia Brasileira. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1971.

ROCHA, Y. T.; BARBEDO, A. S. C. PAU-BRASIL (Caesalpinia echinata LAM., LEGUMINOSAE) NA ARBORIZAÇÃO URBANA DE SÃO PAULO (SP), RIO DE JANEIRO (RJ) E RECIFE (PE). **Rev. SBAU**,v.3, n.2, 2008.

ROCHA, Y. T. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E ÉPOCA DE FLORESCIMENTO DO PAU-BRASIL (Caesalpinia echinata LAM. – LEGUMINOSAE). **Revista do Departamento de Geografia**, v.20, p.23-36, 2010.

RODRIGUES, W.; NOGUEIRA, J. M. Competitividade da Cadeia Produtiva de Plantas Medicinais no Brasil: uma perspectiva a partir do comércio exterior. **Informe Gepec** – Vol. 12, nº2, jul./dez. 2008.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência Bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu; 2005.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**. v. 81, 2010.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enferm**, v. 13, p. 64-70, 2004.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia**: Mecanismos das Doenças Infecciosas. 3ª Edição, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. 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**. 5ª Edição. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

SERRANO, M. C.; LOPES, A. C.; SERUYA, A. I. Plantas Tintureiras. **Revista de Ciências Agrárias**, Junho, 2007.

SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações agudas**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 355p. 1991.

SHEN, J.; ZHANG, H.; LIN, H.; SU, H.; XING, D.; DU, L. Brazilein protects the brain against focal cerebral ischemia reperfusion injury correlating to inflammatory response suppression. **European Journal of Pharmacology**, v. 558, Issues 1–3, 2007.

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

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

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

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M.; TERENZI, H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 4, 844-855, 2006.

SIMÕES, C.M.O. *et al*. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC. 2003. 1102 p.

SOURROUILLE, C.; MARSHALL, B.; LIÉNARD, D.; FAYE, L.; From Neanderthal to Nanobiotech: from plant potions to pharming with plant factories. In: FAYE, L.; GOMORD, V. **Recombinant proteins from plants: methods and protocols**. Humana press: v. 483, 358 p., 2009.

SOUZA, H.M. **O pau-brasil**. O Estado de São Paulo, n. 1386, p. 6, 12 de fev. 1982.

SOUZA, R. T. D. ; AGRIPINO, D. G. ; YOUNG, M. C. M. ; MORENO, P. R. H. **Caracterização da Presença de ácido Daniélico em extratos de Pau-brasil com Atividade Fungitóxica**. In: Pau-brasil: Ciência e Arte, 2003, São Paulo. Resumos. São Paulo : FAPESP, p. 29-29, 2003.

SPIELMANN, H. Animal use in the safety evaluation of chemicals: harmonization and emerging needs. **ILAR Journal**, v. 43, supl., p. S11- S17, 2002.

TAUFNER, C. F.; FERRAÇO, E. B.; RIBEIRO, L. F. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Tereza e Marilândia, ES. **Natureza on line**, v. 4, n. 1, p. 30-39, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª Edição, São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Medicinais: Cura Segura?. **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, 2005.

VULIMIRI, S, V.; DIGIOVANNI, J.. Carcinogênese. In: POLLOCK, R. E.; DOROSHOW, J. H.; KHAYAT, D.; NAKAO, A.; O´SULLIVAN, B.. **Manual de Oncologia Clínica da UICC**. 8ª Ed. Sao Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 2006.

YE, M.; XIE, W.; LEI, F.; MENG, Z.; ZHAO, Y.; SU, H.; DU, L. Brazilein, an important immunosuppressive component from Caesalpinia sappan L. **International Immunopharmacology**. V. 6, n 3, 2006.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. ***Quim. Nova***, v. 24, n. 1, 147-152, 2001.

WALSH, C. **Antibiotics: actions, origins, resistance**. Washington: ASM press, 2003.

WASSENAAR, T. M.. **Bacteria. The Benign, the Bad, and the beautiful**. 1ª Ed., New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Traditional medicine. Fact sheet N°134, 2008.

WORLEY, L. G.; SPATER, H. W. The cytoplasmic cytology of Sarcoma 180. **Quaterly Journal of Microscopical Science**, v. 93, 1952.

WUTHSTRACK, E.; SILVEIRA, M. L. L.; FURLAN, S. A. **Desenvolvimento do sarcoma 180 em ratos albinos swiss fêmeas**. 11º Seminário de Iniciação Científica – SIC. Universidade da Região de Joinville, UNIVILLE, Joinville/SC, 2001.

XAVIER, C. A. C.; OPORTO, C. F. O.; SILVA, M. P.; SILVEIRA, I. A. ABRANTES, M. R. Prevalência de Staphylococcus aureus em manipuladores de alimentos das creches municipais da cidade do Natal/RN. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 3, p. 165-168, 2007.

XU, H.; LEE, S. F. The antibacterial principle of Caesalpina sappan. **Phytotherapy Research,** Volume 18, Issue 8, pages 647–651, 2004.

ZHAO, Y. N.; PAN, Y.; TAO, J. L.; XING, D. M.; DU, L. J. Study on Cardioactive Effects of Brazilein. **Pharmacology**, v. 76, 76-83, 2006.